

ESTRESSE SALINO AFETA A PERFORMANCE FOTOSSINTÉTICA  
DOS GENÓTIPOS CB 47-89 E CB 45-3 DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*Saccharum* sp.)

**WELLINGTON FERREIRA CAMPOS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO - 2009

ESTRESSE SALINO AFETA A PERFORMANCE FOTOSSINTÉTICA  
DOS GENÓTIPOS CB 47-89 E CB 45-3 DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*Saccharum* sp.)

**WELLINGTON FERREIRA CAMPOS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MARÇO - 2009

ESTRESSE SALINO AFETA A PERFORMANCE FOTOSSINTÉTICA  
DOS GENÓTIPOS CB 47-89 E CB 45-3 DE CANA-DE-AÇÚCAR  
(*Saccharum* sp.)

**WELLINGTON FERREIRA CAMPOS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aprovada em 12 de Março de 2009.

Comissão examinadora:

---

Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith (Doutor, Fisiologia Vegetal) – UENF

---

Prof. Vanildo Silveira (Doutor, Biotecnologia) – UENF

---

Prof. Ernany Santos Costa (Doutor, Fisiologia Vegetal) – UFF

---

Prof. Gonçalo A. de Souza Filho (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF  
Orientador

***Ao Mestre dos Mestres;***

***Aos meus pais, Valdemir e Irene;***

***Aos meus avós Marta e Pedro (em memória);***

***Aos meus amigos e mestres.***

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu Pai, meu Aba Pai, meu Paizinho a quem amo. A Cristo por ser meu maior Mestre e Salvador. Apenas a Deus e a Cristo dedico este trabalho, pois sem Eles, não teria feito nada. Eles são a razão da minha existência, da minha vida e do meu sucesso. Neles eternamente confiarei;

Aos meus maravilhosos e lindos pais, que amo infinitamente, Valdemir e Irene. Por confiarem e depositarem em mim todas as suas forças e amor e por apoiarem-me em todos os momentos da vida;

Aos meus avós Marta e Pedro (*em memória*), pois também depositaram em mim a educação que nunca tiveram, por confiar e estar sempre ao meu lado;

Aos meus tios e tias (Antonio, Lurdes, Benedito, Cemar, Luciene), primos e primas (Charles, Luciana, Cristiane e Bruno), simplesmente pelo fato de existirem e fazerem parte da minha vida tornado-a mais importante;

Aos meus amigos de longa data e que fazem parte da minha vida: Davi, Mário e Leonardo;

Aos meus especiais amigos e irmãos, Leandro Mattos e Nelson, pela amizade abençoada por Deus, pelo companheirismo e cumplicidade;

Aos meus amigos de república e de coração Thiago Freitas, Nelson, Adriano e Wagner pelo companheirismo, compreensão, convivência, aprendizado e pelos inúmeros momentos de alegria e tristeza. De vocês sempre me lembrarei;

Aos amigos e irmãos em Cristo: Paulo (líder de excelência), Osniir (paizão na fé) e Apóstolo Luciano por me acolher como sua ovelha;

Às minhas amigas Valéria, Janice, Roberta e Guive, por estarem ajudando-me a qualquer momento e por me ouvirem, com vocês aprendi lições incríveis. Em especial, a Roberta que caminhou fielmente ao meu lado e ensinou-me lindas lições ao longo de dois anos de intensa amizade. De alguém tão especial como você “betinha” jamais me esquecerei, obrigado por tudo;

Aos meus amigo(a)s e colegas de batalha diária Andréa, Keila, Paula, Francisco, Pedro, Carlos Eduardo, Thiago, Juliana, Fernanda, Vitória, Luisa, Aline, Beatriz, Marcos Vinícius, Alan, Ana Lídia, Patrícia Rangel, Frederico, Natália, Adriane, Mariana, Paulo, Pitter, Helaine, Mariana Lugon, Fernanda Bueno, pelo prazer de compartilhar de suas presenças no dia-a-dia, trabalhando, dando força, aconselhando, brincando e etc;

Ao meu orientador Gonçalo Apolinário de Souza Filho, pelo aprendizado, acolhimento, apoio e crescimento profissional;

A todas as pessoas do LMGV e LBT, que de alguma maneira contribuíram para minha aprendizagem e para o meu amadurecimento pessoal e profissional;

Ao prof. Ricardo Bressan por ser meu co-orientador, ajudando-me em todo o trabalho com tanta disposição e paciência e por ser amigo e companheiro

À professora Ângela Pierre Vitória pelos conselhos e apoio;

Aos professores Vanildo Silveira e Ernany Costa por aceitarem o convite de fazer parte da banca examinadora e pelos conselhos, esclarecimentos de dúvidas, amizade e crescimento profissional;

A todos os funcionários, colegas e professores, que embora não citados não deixaram de ser importantes para minha formação e realização deste trabalho;

A FAPERJ e UENF indispensáveis para o desenvolvimento desta dissertação;

**A DEUS, novamente, por me amar e por tudo isto e por todos!!!!!!!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. A cana-de-açúcar.....	03
2.1.1. Aspectos socioeconômicos.....	03
2.1.2. Aspectos botânicos.....	04
2.2. Estresse abiótico em plantas.....	05
2.2.1. Estresse salino.....	07
2.3. Fotossíntese e estresse salino.....	11
2.3.1. Fluorescência da clorofila <i>a</i> : a sonda da fotossíntese <i>in vivo</i> .....	12
2.4. ROS no metabolismo vegetal.....	17
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Material vegetal, condições de cultivo, de estresse e desenho experimental.....	22
4.2. Trocas gasosas.....	23
4.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	24
4.4. Peso de matéria fresca e seca do tecido radicular e da parte aérea.....	26
4.5. Peroxidação de lipídeos do tecido radicular e foliar.....	26
4.6. Análise estatística.....	26

5. RESULTADOS.....	27
5.1. Os genótipos CB 47-89 e CB 45-3 são afetados por NaCl 256 mM.....	27
5.2. Trocas gasosas dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino.	29
5.3. Fluorescência da clorofila <i>a</i> dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino.....	33
5.4. Peroxidação lipídica de folhas e raízes dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino.....	36
5.5. Crescimento dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino.....	38
6. DISCUSSÃO.....	40
7. RESUMO E CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

## RESUMO

CAMPOS, Wellington Ferreira; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2009. Estresse salino afeta a performance fotossintética dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). Professor Orientador: Gonçalo Apolinário de Souza Filho. Professores Conselheiros: Ricardo Enrique Bressan-Smith e Ângela Pierre Vitória.

O estresse salino é um dos mais importantes fatores ambientais que limitam a produtividade agrícola. Dentre as culturas afetadas pela salinidade está a cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), uma glicófita economicamente importante, considerada como moderadamente sensível ao estresse salino. Para obter genótipos adaptados à salinidade, por meio de melhoramento genético ou manipulação gênica, é necessário entender as respostas fisiológicas desta cultura ao estresse salino. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar e compreender as respostas fisiológicas dos genótipos de cana-de-açúcar CB 47-89 e CB 45-3 ao estresse salino. Inicialmente, ambos os genótipos foram plantados em areia com vermiculita (2:1, v:v) e submetidos ao estresse salino. Os resultados demonstraram que NaCl 256 mM foi suficiente para provocar queda na taxa fotossintética ( $P_n$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), *quenching* fotoquímico ( $qP$ ), rendimento máximo ( $F'_v/F'_m$ ) e efetivo ( $\Phi_{PSII}$ ) do PSII, e aumento do carbono interno ( $C_i$ ) e do *quenching* não-fotoquímico (NPQ) e da peroxidação lipídica dos genótipos. A queda de  $g_s$  restringiu a entrada de  $CO_2$ , diminuindo  $C_i$ . Tal restrição desequilibrou a geração e demanda de poder redutor no ciclo de Calvin. Este desequilíbrio prejudica o fluxo linear de elétrons e mantém  $Q_A$

reduzida, conseqüentemente, reduzindo qP. Como mecanismo de fotoproteção há o aumento de dissipação termal de energia, refletido na redução de  $F'_v/F'_m$  e aumento de NPQ. Sob redução da cadeia transportadora de elétrons, um segundo mecanismo de fotoproteção foi a transferência de elétrons no PSI e no PSII para  $O_2$ , aumentando a geração de ROS, indicado pela peroxidação lipídica. Apesar dos danos, ROS pode estar envolvido na fotoproteção como também na redução da  $g_s$ , para minimizar a perda de água, tendo assim, papel no mecanismo de adaptação em cana-de-açúcar. Por fim, houve o decréscimo do  $\Phi_{PSII}$  e de  $P_n$  nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse, porém não houve alteração na biomassa de ambos os genótipos. Portanto em cana-de-açúcar, a salinidade indiretamente afeta o funcionamento do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) e reduz  $P_n$ , por meio do fechamento estomático.

## ABSTRACT

CAMPOS, Wellington Ferreira; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March 2009; Salt stress affects the photosynthetic performance of the sugarcane (*Saccharum* sp.) genotypes CB 47-89 and CB 45-3; Advisor: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Committee Members: Ricardo Enrique Bressan-Smith and Ângela Pierre Vitória.

Salt stress is the environmental factor that limits crop production most. Among the crops affected by salinity is sugarcane (*Saccharum* sp.), an economically important glycophyte, considered moderately sensitive to salinity stress. To obtain genotypes adapted to salinity through genetic improvement or genetic manipulation, the physiologic response of this crop to salt stress must be known. The purpose of this study was to identify and understand the physiologic response of the sugarcane genotypes CB 47-89 and CB 45-3 to salt stress. Initially, both genotypes were planted in sand with substratum (2:1, v:v) and exposed to salt stress. The concentration of 256 mM NaCl was enough to cause a drop in the photosynthetic rate ( $P_n$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration ( $E$ ), photochemical quenching ( $qP$ ), maximum yield of PSII ( $F'_v/F'_m$ ) and effective quantum yield of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), and a rise of the intracellular  $CO_2$  concentration ( $C_i$ ), non-photochemical quenching (NPQ) and lipidic peroxidation of the genotypes. The drop of  $g_s$  restricted the entrance of  $CO_2$ , increasing  $C_i$ . This restriction unbalanced the generation and demand of reducing power in the Calvin cycle. This imbalance interferes with the linear electron flow and maintains  $Q_A$  low, consequently reducing  $qP$ . As a photoprotection mechanism the thermal energy

dissipation increases, reflected in the reduction of  $F'_v/F'_m$  and increase of NPQ. Upon reduction of the electron transport chain, a second photoprotection mechanism was electron transfer in the PSI and PSII from  $O_2$ , increasing the generation of reactive oxygen species (ROS), as indicated by lipidic peroxidation. In spite of the damages, ROS can be involved in photoprotection as well as in the reduction of  $g_s$ , to minimize water loss, playing a role in the adaptation mechanism of sugarcane. Finally,  $\Phi_{PSII}$  and  $P_n$  decreased in the genotypes CB 47-89 and CB 45-3 under stress but there was no alteration in the biomass of either genotype. Therefore, salinity in sugarcane affects the operation of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) and reduces  $P_n$  indirectly by stomata closing.

## 1. INTRODUÇÃO

O estresse salino está entre os principais estresses abióticos que limitam a produtividade e expansão agrícola (Allakhverdiev et al., 2000; Shao et al., 2007). De acordo com a FAO (2009a), mais de 800 milhões de hectares por todo mundo estão afetados pela salinidade.

Dentre as culturas economicamente importantes afetadas pela salinidade está a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), responsável por aproximadamente 60% da produção mundial de açúcar e etanol (Rocha et al., 2007). Estima-se que aproximadamente um milhão de hectares cultivados com cana-de-açúcar estão afetados pela salinidade. Tal cultura está entre as principais atividades agrícolas do Brasil e, no estado do Rio de Janeiro ocupa 15% da área agricultável. As regiões Norte e Noroeste Fluminense abrigam a maior parte das lavouras do estado, sendo elas afetadas pela salinidade (Unica, 2009).

Para superar tal problema, é necessário entender os mecanismos fisiológicos, metabólicos, genéticos, celulares e bioquímicos de resposta ao estresse salino. Segundo Rozeff (1995), a cana-de-açúcar é uma glicófita considerada sensível ao estresse salino. Neste sentido, espera-se que um melhor entendimento sobre os mecanismos supracitados, possa propiciar a obtenção de genótipos mais adaptados aos solos salinos, por meio do melhoramento genético ou manipulação gênica (Grennan, 2006).

Neste cenário, compreender como as espécies vegetais respondem fisiologicamente ao estresse salino é um dos passos mais importantes para

selecionar genótipos superiores (Netondo et al., 2004; Zhao et al., 2007b). De acordo com Kao et al. (2006), para desenvolver culturas resistentes ao estresse salino, é necessário conhecer o grau de tolerância dentro da cultura alvo.

Diferentes respostas à salinidade têm sido observadas em genótipos de arroz (Lee et al., 2003), sorgo (Netondo et al., 2004), trigo (El-Hendawy et al., 2005), soja (Kao et al., 2006), aveia (Zhao et al., 2007b) e *Citrus* (López-Climent et al., 2008). Em cana-de-açúcar, calos embriogêncios de um genótipo tolerante acumulam açúcar solúvel (Gandonou et al., 2006) e íons (Patade et al., 2008) para normalizar o balanço osmótico celular durante estresse salino.

Na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), as respostas ao estresse salino em plantas de cana-de-açúcar vêm sendo estudadas no âmbito da regulação gênica. Neste sentido, análises de macroarajo vêm sendo efetuadas para verificar as vias gênicas ativadas e reprimidas durante o estresse salino. Adicionalmente, a expressão de genes envolvidos no transporte iônico está sendo analisada por PCR semiquantitativo. Por fim, está em andamento a construção de uma biblioteca de subtração entre plantas estressadas e controle, para identificar genes ligados à tolerância ao estresse salino.

Portanto, o conhecimento das respostas fisiológicas ao estresse salino, e a identificação de características biológicas em cana-de-açúcar associada à tolerância a tal estresse, poderá ajudar melhoristas na obtenção de genótipos superiores, como também fisiologistas e agrônomos no desenvolvimento de melhores opções para combater os estresses abióticos. Além disso, contribuirá para o entendimento da regulação gênica em cana-de-açúcar sob estresse salino.

De acordo com as considerações anteriores, o objetivo deste trabalho foi identificar e compreender as respostas fisiológicas de dois genótipos de cana-de-açúcar ao estresse salino.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A cana-de-açúcar

#### 2.1.1. Aspectos socioeconômicos

A cana-de-açúcar é uma cultura economicamente importante, responsável por aproximadamente 60% da produção mundial de açúcar e etanol (Rocha et al., 2007). A safra mundial em 2008 totalizou quase 1,4 bilhões de toneladas, principalmente nos países da região intertropical (Unica, 2009).

Cultivada desde o Brasil colônia, a cana-de-açúcar obteve impulso com a criação, na década de 70, do Programa Nacional do Álcool (Proálcool). Este programa foi de grande importância econômica, porque destacou o Brasil entre os principais produtores e consumidores do etanol combustível (Rosillo-Calle e Cortez, 1998).

Durante sua implantação, o Programa Nacional do Álcool sofreu muitas críticas, em relação à redução das áreas de cultivo destinadas para produção de alimentos e à baixa eficiência dos motores movidos a álcool. Entretanto, o alto rendimento de matéria seca (45 toneladas ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>) (Tejera et al., 2006), a grande extensão territorial, a redução na emissão de CO<sub>2</sub> e o domínio do processo de fabricação de etanol, ainda mantêm o Proálcool, como um programa promissor. De acordo com Goldemberg (2007), o Proálcool é um exemplo mundial e pode ser empregado em outros países sem sérios danos aos ecossistemas.

No Brasil, a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar é de 16 bilhões de litros por ano, requerendo aproximadamente 3 milhões de hectares de terra. Porém, a competição entre área para produção de alimentos e combustível não é substancial. A cana-de-açúcar cobre 10% da área cultivada e 1% da área total disponível para agricultura no país (Goldemberg, 2007).

Segundo a FAO (2009b), o Brasil, maior produtor mundial de cana-de-açúcar, apresentou em 2007, 671 milhões de hectares de área plantada. A produção, naquele ano, foi de 75.593,7 kg/ha, totalizando aproximadamente 514 milhões de toneladas.

O estado de São Paulo é o maior produtor nacional, sendo responsável por 59% da produção brasileira. Todavia, a região Centro-Oeste vem crescendo, e o estado de Mato Grosso do Sul aumentou sua produção em 39,5% em 2008 (IBGE, 2009).

O município de Campos dos Goytacazes, situado na região Norte Fluminense, alcançou cerca de 95 mil ha de área colhida, 4 milhões de toneladas de produção total, 89 milhões de reais de faturamento, com uma participação de 1% da produção nacional, em 2005 (IBGE, 2007).

### **2.1.2. Aspectos botânicos**

De acordo com NCBI (2009), a classificação botânica da cana-de-açúcar é: divisão Embryophyta siphonogama, filo Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Poales, família Poaceae, tribo Andropogoneae, gênero *Saccharum* e espécies *S. arundinaceum*, *S. baldwinii*, *S. brevibarbe*, *S. fulvum*, *S. giganteum*, *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. edule*, *S. sinense*, *S. ravennae*, *S. robustum* e *S. spontaneum*.

Segundo Daniels e Roach (1987), até o fim do século 19, variedades de cana-de-açúcar eram principalmente clones da espécie *S. officinarum*. Esta espécie possui alto conteúdo de açúcar e foi domesticada a partir da espécie *S. robustum*. Para obter variedades altamente produtivas e resistentes a doenças, melhoristas realizaram cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* e então, retrocruzaram os híbridos com *S. officinarum* (Berding e Roach, 1987). Atualmente, os cultivares modernos são originários destes genótipos interespecíficos, seguido por poucos ciclos de intercruzamento e seleção.

O genoma de cana-de-açúcar tem alto grau de ploidia (Sreenivasan et al., 1987). Clones de *S. officinarum* normalmente têm  $2n=80$  cromossomos e *S. spontaneum*, tem entre  $2n=40$  e  $2n=128$  cromossomos. Estudos mostram que *S. officinarum* tem um número básico de cromossomos de  $x=10$ , indicando que estas plantas são octaplóides, e que *S. spontaneum* tem um número básico de cromossomos de  $x=8$ , indicando que o nível de ploidia entre estas espécies varia entre 5 e 16 (D'Hont et al., 1998; Ha et al., 1999). Como consequência da diferença no número básico de cromossomos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, duas organizações cromossômicas distintas co-existem nos atuais cultivares (Grivet et al., 1996). As cultivares de cana-de-açúcar modernas podem ter entre  $2n=100$  e  $2n=130$  cromossomos.

O tamanho do genoma de cana-de-açúcar é amplo. Por exemplo, o tamanho do genoma não replicado de uma célula somática é 7440 Mpb em *S. officinarum* ( $2n=80$ ). Contudo, como *S. officinarum* é octaplóide, o tamanho do genoma haplóide é oito vezes menor, aproximadamente 930 Mpb. O tamanho do genoma haplóide de *S. spontaneum* é 750 Mpb (D'Hont e Glaszmann, 2001).

A cana-de-açúcar é uma planta que se desenvolve caracteristicamente em forma de touceiras. Sua estrutura é composta por uma parte subterrânea constituída por raízes e rizomas (Cesnik e Miocque, 2004), e uma parte aérea composta por caules constituídos de nós e internós. Suas folhas são alternadas ao longo do caule com bainha e colar, e sua inflorescência é do tipo panícula, onde se encontram as flores que são hermafroditas (Lima, 1984).

A reprodução da cana-de-açúcar ocorre por meio da propagação assexuada, por meio das gemas laterais, ou por micropropagação, usando cultura *in vitro* de meristemas apicais. Acredita-se que a produção de mudas por cultura de tecidos elimina microrganismos patogênicos e aumenta a longevidade do canavial (Hendre et al., 1983).

## **2.2. Estresse abiótico em plantas**

As plantas estão freqüentemente expostas às condições ambientais adversas, que influenciam fortemente seu desenvolvimento (Shao et al., 2007). Concomitantemente, a produtividade e expansão agrícola são limitadas, havendo,

portanto, a necessidade de compreender como as plantas percebem, respondem e adaptam-se a tais estresses (Grennan, 2006).

De acordo com Bray et al. (2000), os estresses abióticos reduzem em média 50% a produtividade das principais espécies cultivadas. Em comparação, estima-se que a perda causada por patógenos é tipicamente de 10 a 20% (Kreps et al., 2002). Jones e Jones (1989) definem estresse como uma força adversa ou uma condição que inibe o funcionamento normal de um sistema biológico.

As plantas como organismos sésseis, precisam resistir aos estresses abióticos, que ocorrem isoladamente e simultaneamente, tais como temperatura (frio e calor), disponibilidade de água (seca e encharcamento), toxicidade iônica (salinidade e metais pesados), deficiência de nutrientes, estresse oxidativo, estresse osmótico, estresse mecânico e exposição aos raios ultravioleta do tipo B (UV-B) (280-320 nm) (Zhu, 2001; Mahajan e Tuteja, 2005; Bohnert et al., 2006; Shao et al., 2007).

Como consequência dos diferentes estresses abióticos há várias respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Centenas de genes são induzidos, mitigando seus efeitos, levando ao ajustamento celular e à tolerância (Kreps et al., 2002; Mahajan e Tuteja, 2005; Grennan, 2006; Sreenivasulu et al., 2007).

Possivelmente, a habilidade de resposta e resistência foi a força que dirigiu a especiação (Grennan, 2006) ao longo da evolução e durante a domesticação artificial (melhoramento vegetal) (Shao et al., 2007). Logo, a compreensão dos mecanismos de tolerância também auxilia na compreensão da diversidade ecológica, e da distribuição das espécies (Bohnert et al., 2006) como também, a utilização sustentável dos recursos vegetais (Shao et al., 2007).

Entretanto, tolerância (ou susceptibilidade) aos estresses abióticos é um fenômeno muito complexo, pois depende da fase do desenvolvimento vegetal e da ocorrência simultânea de outros estresses (Chinnusamy et al., 2004). Tem sido demonstrado que múltiplas vias de sinalização são ativadas durante o estresse abiótico, conduzindo a respostas similares para diferentes causas. Por exemplo, seca, frio, e salinidade causam o acúmulo de osmoprotetores e antioxidantes (Hasegawa et al., 2000).

Os estudos de Kreps et al. (2002), Rabbani et al. (2003), Ma et al. (2006) suportam a hipótese de que os estresses abióticos, inicialmente, disparam um

conjunto comum de vias que são subseqüentemente, modificadas para serem estresse específico.

Apesar das diferenças entre as espécies vegetais e respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares aos vários estresses abióticos, há um modelo comum de sinalização (Zhu, 2001; Mahajan e Tuteja, 2005; Shao et al., 2007). Neste modelo, a sinalização inicia-se com o reconhecimento dos sinais ambientais por sensores presentes na membrana ou no citoplasma. Em seguida, o sinal é transduzido, resultando na geração de mensageiros secundários (Espécies Reativas de Oxigênio - ROS,  $\text{Ca}^{2+}$  e inositol-1,4,5-trifosfato) que irão modular o nível de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Proteínas sensíveis às alterações na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tornam-se ativas e interagem com outras proteínas iniciando, freqüentemente, uma cascata de fosforilação. Finalmente, tal cascata atinge as proteínas envolvidas na proteção celular e fatores de transcrição que controlam um conjunto específico de genes. Os produtos desses genes participam da síntese de moléculas regulatórias tais como ABA, etileno e ácido salicílico, que amplificam o sinal inicial.

De acordo com Mahajan e Tuteja (2005), Grennan (2006) e Shao et al. (2007), os produtos gênicos ativados na resposta a estresses são divididos em dois grupos. No primeiro, estão os genes da fase inicial envolvidos na transdução de sinais e na regulação da expressão (fatores de transcrição) de genes estresse específicos. No segundo, estão os da fase tardia, geralmente associados aos mecanismos de tolerância. Dentre eles estão os genes que codificam e modulam as proteínas da síntese metabólica, antioxidantes, proteínas estabilizadoras de membrana e síntese de osmoprotetores, síntese de chaperonas e detoxificação.

### **2.2.1. Estresse salino**

Salinidade é o principal fator ambiental limitante da produtividade e expansão agrícola (Allakhverdiev et al., 2000). Segundo Wang et al. (2003), o aumento das terras agriculturáveis afetadas pela salinidade resultará na perda de 30% de terras nos próximos 25 anos e mais de 50% até 2050.

Alta taxa de evaporação e baixa taxa de precipitação tornam as regiões áridas e semi-áridas da Ásia, África e América do Sul impróprias para o desenvolvimento agrícola. Contorna-se esta limitação com sistemas de irrigação.

Entretanto, o uso inadequado das técnicas de irrigação e drenagem, freqüentemente culminam na salinização do solo. Como resultado, observa-se perdas de produtividade e inviabilização do cultivo de espécies economicamente importantes (Mahajan e Tuteja, 2005; Sahi et al., 2006).

Segundo Blumwald (2000), solos salinos provocam estresse osmótico, resultante das altas concentrações de soluto no solo, e estresse iônico, ocasionado pela queda na razão  $K^+/Na^+$ , alterando homeostase celular. Embora  $Na^+$  seja um micronutriente não essencial, em níveis elevados torna-se tóxico para o crescimento vegetal (Blumwald, 2000; Sahi et al., 2006).

O  $Na^+$  é tóxico para o metabolismo celular e energético, interferindo negativamente na síntese e funcionamento de algumas proteínas (Niu et al., 1995; Blumwald, 2000), causa desbalanço iônico e osmótico (Blumwald, 2000; Sahi et al., 2006), induz a produção de ROS e desorganiza as membranas (Moller et al., 2007), inibe a fotossíntese e reduz o crescimento (Brugnoli e Bjorkman, 1992; Kao et al., 2006; Zhao et al., 2007b), inibe a divisão e expansão celular (West et al., 2004) e causa deficiência nutricional (Flowers et al., 1977; Greenway e Munns, 1980).

Enquanto  $Na^+$  em excesso é deletério, na mesma situação, o  $K^+$  é essencial, pois desempenha papel importante na manutenção do balanço osmótico, no controle estomático e atua como co-fator de muitas enzimas (Mahajan e Tuteja, 2005). Portanto, a homeostase de  $K^+$  e  $Na^+$  intracelular é fundamental para a biossíntese e atividade de muitas enzimas, para manter o potencial de membrana e apropriada homeostase celular (Zhu, 2003).

Os efeitos deletérios do estresse salino são minimizados por mecanismos que envolvem a compartimentalização e exclusão iônica, controle da captação de íons pela raiz e transporte para as folhas, cascatas de transdução de sinais, síntese de osmoprotetores, mudança no processo fotossintético, alteração na estrutura da membrana, indução de enzimas antioxidantes e síntese de fitormônios (Hasegawa et al., 2000; Parida e Das, 2005).

Neste cenário, sob altas concentrações de  $Na^+$  no ambiente extracelular, as células vegetais tentam manter baixas concentrações de  $Na^+$  citosólico e alta razão  $K^+/Na^+$  (Blumwald, 2000; Zhu, 2003). Para tanto, elas coordenadamente excluem e/ou compartimentalizam  $Na^+$ , por meio de transporte secundário, mediado por canais (IRK, ORK, VIC, NSC, SV, VK, FV) e transportadores (HKT,

HAK, SOS1 e LCT1 NHX, ITR, HAK, SOS1, e LCT1), e pelo transporte ativo primário, mediado por H<sup>+</sup>-ATPases (H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática, H<sup>+</sup>-ATPase vacuolar e H<sup>+</sup>-pirofosfatase) (Maathuis et al., 1997; Serrano et al., 1999; Hasegawa et al., 2000; Chauhan et al., 2000; Rodriguez-Navarro, 2000; Serrano e Rodriguez-Navarro, 2001; Zhu, 2003).

Segundo Blumwald (2000), a exclusão e compartimentalização de Na<sup>+</sup> são essenciais para tolerância ao estresse salino. Além de diminuir a concentração de Na<sup>+</sup> no citoplasma, a compartimentalização contribui para o ajuste osmótico e mantém a captação de água (Zhu, 2003). Geralmente a compartimentalização ocorre no vacúolo (Hasegawa et al., 2000), mas pode ocorrer em outras organelas, como plastídeos e mitocôndria (Zhu, 2003).

Em trigo, exclusão de Na<sup>+</sup> é um dos principais mecanismos que conferem tolerância à salinidade (Gorham et al., 1990; Munns et al., 2006). Em *Arabidopsis*, a família AtNHX de antiportes Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> participam da compartimentalização de Na<sup>+</sup> (Blumwald, 2000) e o antiporter Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> da membrana plasmática, codificado pelo gene SOS1, exclui Na<sup>+</sup> (Shi et al., 2003).

O cálcio (Ca<sup>2+</sup>), como sinalizador tem papel fundamental nas respostas ao estresse salino. Este por sua vez, provoca o aumento transiente de Ca<sup>2+</sup> citosólico (Knight et al., 1997), disparando uma série de vias que culminam na adaptação ao estresse. Dentre elas está a via SOS (*Salt Overly Sensitive*), que resulta na exclusão de Na<sup>+</sup> e restaura a homeostase celular (Zhu et al., 1998; Zhu, 2002).

Segundo Quintero et al. (2002), a via SOS funciona da seguinte maneira: o estresse salino é reconhecido por um sensor hipotético de membrana, o qual dispara o aumento de Ca<sup>2+</sup> citosólico e ativa a proteína SOS3. Esta, por sua vez, interage com SOS2/CIPK24 (proteína quinase serina/treonina) formando o complexo SOS3-SOS2, que é levado para a membrana plasmática. SOS2 fosforila e ativa SOS1 levando à exclusão de Na<sup>+</sup>.

O complexo SOS3-SOS2 também funciona no seqüestro de Na<sup>+</sup> para os compartimentos intracelulares, interagindo com um antiporter Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> vacuolar e influenciando sua atividade de troca Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (Qiu et al., 2002). SOS2 também interage com um antiporter CAX1 (H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) e regula sua atividade que resulta na manutenção da homeostase de Ca<sup>2+</sup> (Cheng et al., 2004).

Além da via SOS, a via CDPK (Calcium Dependent Protein Kinase), a qual desempenha importantes papéis no estresse osmótico (Sanchez-Barrena et al., 2005) e a via MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), importante para a co-interação entre estresse abiótico e biótico (Nakagami et al., 2005), também estão envolvidas na sinalização sob estresse salino.

A ativação gênica durante o estresse leva a ativação de vias biossintéticas de metabólitos, conhecidos como osmoprotetores, que não inibem as reações metabólicas normais (Ford, 1984; Breesan et al., 1998). Dentre eles estão os açúcares frutose e sacarose e os açúcares complexos (trealose e frutanos), glicina-betaína, prolina, ectoina, manitol e sorbitol. Além disso, o acúmulo destes metabólitos reduz o potencial hídrico da célula ocasionando o ajuste osmótico, evitando a perda de água e facilitando a captação de água do meio extracelular (Delauney e Verma, 1993; Louis e Galinski, 1997).

Outro metabólito produzido durante o estresse salino são as poliaminas. Elas estão envolvidas na estabilização de membranas e detoxificação de radicais livres, ajustamento osmótico, nutrição mineral e regulação da senescência (Velikova et al., 1998; Aziz et al., 1999; Prakash e Prathapasenan, 1988; Krishnamurthy, 1991; Tamai et al., 1999 citados por Ndayiragije e Lutts, 2006).

Zhao et al. (2007a) analisaram os efeitos de poliaminas na atividade dos canais iônicos de protoplasto de raízes de cevada. Segundo estes autores, as poliaminas restringiram o efluxo de  $\text{Na}^+$  na raiz e evitaram a perda de  $\text{K}^+$  das folhas, melhorando a homeostase  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ .

Durante o estresse salino ROS são geradas, ocasionando danos à membrana, a atividade de várias enzimas, a aquisição de nutrientes e ao funcionamento do aparelho fotossintético. Muitos osmoprotetores como manitol, frutanos, trealose, prolina, glicina-betaína, ectonina desempenham papel na detoxificação celular por seqüestro de ROS ou por evitar danos nas estruturas celulares (Zhu, 2001). Outro efeito ocasionado pela entrada de  $\text{Na}^+$  é a inibição do crescimento celular, muitas vezes ligado à inadequada fotossíntese, devido ao fechamento estomático e conseqüente limitação de  $\text{CO}_2$  para as reações de carboxilação (Brugnoli e Bjorkman, 1992). Entretanto, o estresse pode inibir e regular diretamente a divisão e expansão celular (West et al., 2004). O metabolismo de ROS e as respostas fotossintéticas durante estresse salino serão detalhados nos próximos tópicos.

### 2.3. Fotossíntese e estresse salino

Compreender o fluxo de CO<sub>2</sub> na fotossíntese permite desvendar a etapa fotoquímica (captação de fótons para geração de ATP e NADPH<sub>2</sub>, e a dissipação de energia na forma de calor ou fluorescência) e bioquímica (fixação de CO<sub>2</sub> em compostos orgânicos) do processo fotossintético (Taiz e Zeiger, 2004; Szabo et al., 2005).

Durante estresse salino, a fotossíntese e o crescimento celular são afetados (Munns et al., 2006) diretamente com a queda na disponibilidade de CO<sub>2</sub> (Flexas et al., 2004, 2007) e alterações no metabolismo fotossintético (Lawlor e Cornic, 2002), ou indiretamente com o estresse oxidativo. Este último pode afetar seriamente a maquinaria fotossintética (Ort, 2001).

Na raiz, o estresse osmótico causado pela salinidade resulta na biossíntese de ABA. Este fitormônio é translocado para a parte aérea, onde é acumulado e redistribuído intracelularmente nas células-guarda. Nestas células, o ABA provoca o efluxo de íons, perda de turgescência e, eventualmente, o fechamento estomático, que reduz a perda de água pela epiderme foliar. Porém, restringe o crescimento celular (Bray, 1997; Schroeder et al., 2001; Wilkinson e Davies, 2002; Wang e Song, 2008). ABA pode também ser sintetizado nas células foliares e translocado pela planta (Wilkinson e Davies, 2002).

Ao reduzir a transpiração, o fechamento estomático mediado por ABA, limita a difusão de CO<sub>2</sub> para o cloroplasto, alterando a fotoquímica e o metabolismo do carbono. Estes efeitos variam conforme a intensidade e duração do estresse como também com a idade foliar e a espécie vegetal (Lawlor e Cornic, 2002; Munns, 2002; Chaves et al., 2003, 2009; Flexas et al., 2004, 2007; Galmés et al., 2007).

O fechamento estomático e a conseqüente queda na taxa fotossintética têm sido observados por diferentes autores. Netondo et al. (2004) avaliando o efeito de diferentes concentrações de NaCl em genótipos de sorgo, observaram que alta concentração de NaCl provocou fechamento estomático reduzindo, então, a taxa fotossintética.

Sob diferentes concentrações de NaCl, a taxa fotossintética e a condutância estomática da halófito *Plantago coronopus* foi fortemente afetada (Koyro, 2006). Resultados semelhantes foram obtidos por Moradi e Ismail (2007).

Estes autores, contrastando genótipos de arroz, observaram uma substancial queda na fotossíntese, condutância estomática e transpiração em resposta ao estresse salino, com maior redução ao longo do tempo de exposição.

Zhao et al. (2007b) também observaram uma significativa redução na taxa fotossintética e na condutância estomática de dois genótipos de aveia submetidos a diferentes concentrações de NaCl.

Da mesma maneira, em genótipos de *Citrus*, o estresse salino provocou significativa queda na fotossíntese e na condutância, havendo entre os dois uma correlação positiva, sugerindo que a condutância, pelo menos em parte, promove a redução na taxa fotossintética (López-Climent et al., 2008).

Neste sentido, na etapa bioquímica da fotossíntese, o fornecimento de CO<sub>2</sub> para a rubisco é prejudicado pelo fechamento estomático, o que predispõe o aumento de dissipação de energia no aparelho fotossintético e a down-regulação da fotossíntese (Flexas et al., 2006; Chaves et al., 2009).

Em plantas C<sub>4</sub>, como a cana-de-açúcar, o reduzido fluxo de CO<sub>2</sub> para as células da bainha dos feixes vasculares, é compensado pela enzima PEPcase (fosfoenolpiruvato carboxilase) (Taiz e Zeiger, 2004) que concentra CO<sub>2</sub> no ambiente de atuação da ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco), minimizando ou mesmo não permitindo, o processo de fotorrespiração que limita a eficiência das plantas C<sub>3</sub>.

Todavia, sob prolongado tempo de estresse, a baixa concentração intracelular de CO<sub>2</sub> reduz a atividade carboxilase da rubisco (Meyer e Genty, 1998). Adicionalmente, a limitação de CO<sub>2</sub> causa alterações na fotofosforilação, um decréscimo na produção de ATP e leva a queda na regeneração de RuBP (Tezara et al., 1999). Assim, pela baixa atividade do ciclo de Calvin há um excesso de poder redutor gerado na etapa fotoquímica da fotossíntese (Genty et al., 1989).

### **2.3.1. Fluorescência da clorofila *a*: a sonda da fotossíntese *in vivo*.**

O uso da fluorescência da clorofila *a* para examinar a performance fotossintética e estresse em plantas, está amplamente difundido em estudos fisiológicos e ecofisiológicos (Baker, 2008). Maxwell e Johnson (2000) afirmam

que nenhum estudo sobre performance fotossintética vegetal, em condições de campo está completo sem dados de fluorescência da clorofila *a*.

O princípio por trás das análises de fluorescência da clorofila *a*, baseia-se na imperfeição da conversão de energia luminosa em energia química, durante o processo fotossintético. Neste processo, a energia luminosa excita as moléculas de clorofila tornando-as instáveis e, ao retornarem ao estado inicial, dissipam parte de sua energia para o processo fotossintético (fotoquímico), em excesso a energia pode ser dissipada na forma de calor ou pode ser re-emitida como luz (fluorescência da clorofila *a*). Os três processos ocorrem em competição, tal que qualquer aumento na eficiência de um, resulta no decréscimo dos outros dois. Conseqüentemente, mensurar a fluorescência da clorofila *a*, fornece informações sobre a eficiência fotoquímica e dissipação de calor (Maxwell e Johnson, 2000; Taiz e Zeiger, 2004; Baker, 2008).

Baseado neste princípio, o uso das variáveis da fluorescência da clorofila *a* é bastante empregado no estudo da fotossíntese. Além de não invasivo, este método permite a análise quantitativa da absorção e aproveitamento da energia luminosa através do PSII, podendo ser relacionadas com a capacidade fotossintética (Van Kooten e Snel, 1990; Mouget e Tremblin, 2002).

Kautsky et al. (1960) foram os primeiros a observar alterações na fluorescência da clorofila *a*. Estes autores descobriram que, ao transferir tecido fotossintético adaptado ao escuro para luz, há um incremento na fluorescência da clorofila *a*. Tal aumento é conseqüência da redução do acceptor de elétrons primário do PSII, quinona A ( $Q_A$ ). Quando reduzida,  $Q_A$  não recebe outro elétron da clorofila (P680) do centro de reação PSII, até que o primeiro seja transferido para o próximo acceptor na via, quinona B ( $Q_B$ ). Neste período, o centro de reação está 'fechado'. Em algum momento, uma proporção de centros de reação fechados resulta na redução da eficiência fotoquímica e assim, um correspondente aumento na fluorescência.

Há uma queda, após o incremento no nível de fluorescência. Tal fenômeno chama-se *quenching*, e pode ser explicado de duas maneiras. Primeiramente, há um aumento na taxa de elétrons transportados do PSII, uma vez que, a luz ativa enzimas envolvidas no metabolismo do carbono e na abertura estomática, resultando na redução de  $NADP^+$ , síntese de ATP e fixação de  $CO_2$ . Este *quenching* chama-se *quenching* fotoquímico, e decresce à medida que  $Q_A$  é

reduzida. Simultaneamente, há um aumento na dissipação de energia na forma de calor. Este último processo é chamado *quenching* não fotoquímico (Maxwell e Johnson, 2000; Baker, 2008).

A aplicação das técnicas de fluorescência da clorofila *a* junto com o desenvolvimento de modernos fluorímetros portáteis, tem fornecido maneiras para analisar a performance fotossintética em condições de campo e laboratorial (Maxwell e Johnson, 2000). Atualmente, dados quantitativos de fluorescência são coletados por meio de sistemas (fluorímetro) não modulados e modulados. Os sistemas modulados (Quick e Horton, 1984) baseiam-se na aplicação de luz modulada que excitam moléculas de clorofila dos centros de reação PSII, em uma dada área do tecido foliar previamente adaptada ao escuro.

Na área adaptada ao escuro,  $Q_A$  está oxidada, conseqüentemente, o PSII está aberto. Quando esta área é exposta a baixa intensidade luminosa ( $0,1 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) resulta na fluorescência inicial ( $F_0$ ). Em seguida, é aplicado um pulso de alta intensidade luminosa (em geral acima de  $4000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), reduzindo completamente  $Q_A$  e fechando o PSII, neste momento a fluorescência máxima ( $F_m$ ) é observada. A área foliar, agora é exposta à contínua luz actínica, gerando um nível de fluorescência chamado  $F'$ , o qual eleva para o nível de fluorescência máxima ( $F_m'$ ), quando aplica-se breve pulso de luz saturante que maximiza a redução de  $Q_A$  (Baker, 2008).

A diferença entre  $F_m$  e  $F_0$  é definida como a fluorescência variável ( $F_v$ ), e representa o incremento da fluorescência a partir de  $F_0$  até  $F_m$ , ou seja, o fluxo de elétrons do centro de reação PSII até  $Q_A$ . A razão  $F_v/F_m$  estima o rendimento quântico máximo do PSII (Maxwell e Johnson, 2000; Baker, 2008), isto é, a eficiência quântica se todos os centros de reação PSII estiverem abertos.

A razão  $F_v/F_m$  pode ser usada como indicador da performance fotossintética (Maxwell e Johnson, 2000). Apesar disso, não fornece rigorosos valores, uma vez que, nem todos os estados de excitação das clorofilas são os mesmos (Baker, 2008). Todavia, podem variar entre 0,75 e 0,85 em plantas cujo aparelho fotossintético está intacto (Bolhàr-Nordenkampf et al., 1989). Contudo, sob estresse biótico ou abiótico, a queda deste valor freqüentemente é observada, e reflete a presença de fotoinibição dos centros de reação PSII (Björkman e Demming, 1987).

Na presença de luz, o estresse pode resultar no aumento dos processos de *quenching* não fotoquímico, os quais diminuem  $F_m$ . Tal *quenching* possivelmente não recupera durante curto período de adaptação ao escuro e resulta no decréscimo de  $F_v/F_m$  (Adams e Demmig-Adams, 2004, 2006).

O *quenching* não fotoquímico (NPQ) está linearmente relacionado à dissipação de calor (Bilger e Björkman, 1990). Durante estresse, o fluxo de elétrons fotossintéticos é prejudicado pelo desequilíbrio entre geração e utilização de poder redutor. Assim, sob excesso de energia de excitação há a dissipação de energia na forma de calor (Szabo et al., 2005).

Em sorgo, diferentes concentrações de NaCl aumentaram NPQ. Segundo Netondo et al. (2004), a queda na condutância estomática reduz a assimilação de  $CO_2$ , diminuindo a demanda por NADPH e ATP, que por sua vez, reduz o fluxo linear de elétrons e a taxa de oxidação de  $Q_A$ , conseqüentemente, elevando a dissipação térmica de energia.

Aumento no NPQ pode estar freqüentemente acoplado a fotoinativação dos centros de reação PSII (Melis, 1999) ocasionando danos oxidativos e perda dos centros de reação PSII (Aro et al., 1994), ambos estão associados com um aumento em  $F_0$  (Bradbury e Baker, 1986; Osmond, 1994).

Outra variável importante da fluorescência é o rendimento quântico efetivo do PSII ( $\Phi_{PSII}$ , ou  $\Delta F/F'_m$ ,  $F'_q/F'_m$ ) (Genty et al., 1989), que estima a proporção de energia absorvida pela clorofila associada ao PSII (P680), destinada para a fotoquímica. O  $\Phi_{PSII}$  pode dar uma medida da taxa do transporte linear de elétrons e assim, uma indicação global da fotossíntese. Sob condições controladas, há uma relação linear entre esta variável e a eficiência de fixação de carbono. Entretanto, uma discrepância entre estas duas variáveis pode ocorrer sob certas condições de estresse (Fryer et al., 1998).

O rendimento quântico efetivo é dado pelo produto de duas variáveis da fluorescência,  $qP$  e  $F'_v/F'_m$  (Baker, 2008). O *quenching* fotoquímico,  $qP$ , embora, superficialmente muito similar ao  $\Phi_{PSII}$ , tem significado um pouco diferente. Enquanto  $\Phi_{PSII}$  é a proporção de energia absorvida usada na fotoquímica,  $qP$  indica a proporção de centros de reação PSII que estão abertos, ou seja, a capacidade do aparelho fotossintético de manter uma taxa relativa de redução e oxidação de  $Q_A$  (Maxwell e Johnson, 2000).

A razão  $F'_v/F'_m$  estima o rendimento máximo do PSII, que pode ser obtida na folha adaptada a luz, quando  $Q_A$  está totalmente oxidada. Conseqüentemente, esta variável pode ser usada para acessar a contribuição do *quenching* não fotoquímico para alterações no  $\Phi_{PSII}$  (Baker, 2008).

Determinando  $qP$  e  $F'_v/F'_m$  torna-se possível descobrir qual dos dois processos foi responsável por alterações no  $\Phi_{PSII}$ . Alterações no  $qP$  deve-se ao fechamento dos centros de reação, isto é, a capacidade do centro de reação excitado de direcionar os elétrons para a cadeia transportadora. Já alguma alteração em  $F'_v/F'_m$ , deve-se a alterações na eficiência do *quenching* não fotoquímico (Maxwell e Johnson, 2000). Embora  $F'_v/F'_m$ , possa ser usado para avaliar a contribuição da alteração do *quenching* não fotoquímico no  $\Phi_{PSII}$ , níveis de *quenching* não fotoquímico são freqüentemente acessados pela variável NPQ (Bilger e Björkman, 1990).

A contribuição relativa de  $qP$  e  $F'_v/F'_m$  para alterações no  $\Phi_{PSII}$  pode mudar com o aumento do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (Kramer et al., 2004). Geralmente aumento em NPQ, indicado por decréscimo de  $F'_v/F'_m$ , saturam em níveis de luz muito menores do que decréscimo de  $qP$ , demonstrando que o decréscimo na capacidade de oxidar  $Q_A$ , e não o aumento em NPQ, é o principal fator que determina amplas alterações no  $\Phi_{PSII}$  sob alta intensidade luminosa (Baker, 2008).

Aumento no  $\Phi_{PSII}$  durante indução da fotossíntese em folha de milho, primeiramente está associado com aumento em  $qP$  e não a alterações em  $F'_v/F'_m$  (Oxborough e Baker, 1997). Este resultado demonstra que a capacidade de processar os produtos da cadeia transportadora de elétrons (NADPH e ATP), é mais importante do que o *quenching* não fotoquímico na regulação da indução da fotossíntese em milho (Baker, 2008).

Muitos estresses ambientais causam efeitos na assimilação de  $CO_2$ . Por exemplo, a reposta primária sob estresse salino é queda na condutância estomática (Chaves et al., 2009), que restringe a entrada de  $CO_2$ , conseqüentemente diminuindo a fotossíntese (Wilkinson e Davies, 2002). Em sorgo (Netondo et al., 2004), *Plantago coronopus* (Koyro, 2006), arroz (Moradi e Ismail, 2007), aveia (Zhao et al., 2007b) e citrus (López-Climent et al., 2008), o estresse salino causou fechamento estomático.

Queda na condutância estomática restringindo o fornecimento de  $\text{CO}_2$  para os locais de carboxilação, alterações na eficiência de carboxilação, taxa de regeneração da ribulose 1,5-bifosfato, fotorrespiração, e taxa de transporte de carboidrato dentro da célula podem influenciar a taxa de utilização de NADPH e ATP, e conseqüentemente o  $\Phi_{\text{PSII}}$ . Todavia, os mecanismos específicos pelos quais uma restrição no metabolismo pode resultar no decréscimo de  $\Phi_{\text{PSII}}$  não estão completamente elucidados (Baker, 2008).

Uma vez que a fixação de  $\text{CO}_2$  é afetada pela restrição de  $\text{CO}_2$  para rubisco, há o aumento de NADPH e ATP, que diminui o fluxo linear de elétrons e a taxa de oxidação de  $Q_A$ , o qual pode ser monitorada por decréscimo em  $qP$ . Todavia, acidificação do lúmen tilacoidal com o aumento do nível de ATP, resulta no aumento do *quenching* não fotoquímico e um decréscimo no  $F'_v/F'_m$ . (Baker, 2008).

#### 2.4. ROS no metabolismo vegetal

Nos diferentes compartimentos da célula vegetal, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são inevitavelmente e continuamente produzidas, como subprodutos das vias metabólicas aeróbicas, como a respiração e fotossíntese (Apel e Hirt, 2004; Moller et al., 2007). Dentre os tipos de ROS gerados estão superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ ), e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Nas células vegetais, os cloroplastos e peroxissomos são as principais fontes de ROS (Foyer e Noctor, 2003). Sob alto fluxo de fótons fotossintéticos, a absorção de energia excede a capacidade de assimilação de  $\text{CO}_2$ , gerando  $^1\text{O}_2$  no PSII (Asada, 2006). Simultaneamente, a hiper-redução do PSII favorece a redução direta de  $\text{O}_2$  pelo PSI e a subseqüente produção de  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HO}^\cdot$  (Foyer e Noctor, 2003; Pfannschmidt, 2003; Asada, 2006). O  $\text{O}_2^-$  gerado pela redução de  $\text{O}_2$  no PSI, é rapidamente convertido dentro do cloroplasto a  $\text{H}_2\text{O}_2$  por uma CuZn-superóxido dismutase (Asada, 1999).

Os peroxissomos produzem ROS em várias vias metabólicas (del Rio et al., 2006), como a fotorrespiração. Neste caso, a atividade oxigenase da rubisco gera glicolato, que é translocado para o peroxissomo, onde é oxidado pela glicolato oxidase, gerando  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Apel e Hirt, 2004; Moller et al., 2007).

Nos tecidos não fotossintetizantes, a mitocôndria é a principal organela produtora de ROS, geralmente pela super-redução da cadeia transportadora de elétrons que leva a produção de  $O_2^-$  (Maxwell et al., 1999; Moller, 2001).

Além das organelas, a NADPH oxidase produz  $O_2^-$  na superfície externa da membrana plasmática (Pei et al., 2000; Zhang et al., 2001; Torres e Dangl, 2005). Reações catalisadas pelas peroxidases da parede celular, amino oxidases e outras enzimas contendo flavina também geram ROS (Neill et al., 2002a, 2002b).

Os diferentes tipos de ROS têm reatividades diferentes. Segundo Moller et al. (2007),  $O_2^-$  é convertido em  $H_2O_2$  pela SOD que, por meio da reação de Fenton pode gerar  $HO^-$ . Este por sua vez, reage com qualquer componente celular. Enquanto,  $O_2^-$  reage primariamente com centros protéicos Fe-S, e  $^1O_2$  particularmente com duplas ligações de ácidos graxos poliinsaturados.

Apesar das diferentes reatividades, os diferentes tipos de ROS têm em comum a capacidade de causar danos oxidativos nas proteínas, DNA e lipídios (Apel e Hirt, 2004). ROS podem danificar o DNA por diferentes vias. Dentre eles, o  $HO^-$  é o mais reativo,  $^1O_2$  ataca primariamente a guanina,  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  não reage com nenhuma base (Wiseman e Halliwell, 1996). Adicionalmente,  $HO^-$  também reage com carboidratos livres, tais como açúcares e poliols (Wagner et al., 2004).

A citotoxicidade de ROS ajuda a explicar a evolução de complexos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de detoxificação em plantas (Apel e Hirt, 2004). As enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase, ascorbato/glutaiona oxidase e glutathione peroxidase participam do sistema enzimático. Enquanto, os sistemas peroxiredoxina, tioredoxina, glutaredoxina, carotenos e tocoferol, estão entre os não enzimáticos (Mittler et al., 2004).

A despeito da citotoxicidade de ROS, evidências indicam que estas moléculas podem funcionar como sinalizadores em plantas, envolvendo-se na regulação do desenvolvimento e nas respostas aos estresses abióticos e bióticos (Wang e Song, 2008). ROS pode agir como molécula sinalizadora, pois são pequenos, difundem-se a curtas distâncias, têm mecanismos para produção rápida e controlada, e podem ser rapidamente removidos (Apel e Hirt 2004). O equilíbrio entre produção de ROS e atividade dos sistemas de detoxificação determina o tipo e a concentração de ROS, e assim, até que ponto a sinalização e danos ocorreram (Moller et al., 2007).

Apel e Hirt (2004) relatam três possibilidades para ROS agir como molécula sinalizadora em plantas. Primeiro, como mensageiro ROS pode modular a atividade de moléculas envolvidas na sinalização ou transcrição. Segundo, muitas alterações na expressão gênica têm sido atribuídas a citotoxicidade de ROS. E terceiro, ROS dispara as respostas aos estresses em plantas modulando a expressão gênica de maneira indireta, por exemplo, pelas alterações no estado redox celular (Foyer e Noctor, 2000; Neill et al., 2002b).

Apesar dos mecanismos para reequilibrar o nível de ROS durante os estresses abióticos, as células vegetais sob outras circunstâncias, geram ROS como moléculas sinalizadoras para controlar processos como defesa contra patógenos, morte celular programada e regulação estomática (Apel e Hirt, 2004).

Por exemplo, evidências indicando que  $H_2O_2$  regula o movimento estomático, de maneira similar a ABA (Wang e Song 2008). Aplicação exógena de ABA resultou na rápida geração de  $H_2O_2$  em células-guarda de *Vicia faba* (Miao et al., 2000) e *Arabidopsis* (Pei et al., 2000). Posteriormente, Zhang et al. (2001) por meio de ensaios com fluorescência, mostraram que, aparentemente a geração de  $H_2O_2$  é essencial para o fechamento estomático induzido por ABA.

O ABA e  $H_2O_2$  regulam o movimento estomático por meio de vias comuns. Fosforilação protéica, NADPH oxidase, concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  livre, óxido nítrico, pH citosólico e o estado redox celular, interligam ABA e  $H_2O_2$  na sinalização para regulação das células-guarda (Wang e Song, 2008).

Em certas circunstâncias, diferentes fatores ambientais tais como alta luminosidade, seca, salinidade, estresse mecânico, patógenos, herbívoros, baixa e alta temperatura causam o desequilíbrio entre produção e remoção de ROS. Como resultado deste distúrbio, há um aumento na geração de ROS (Elstner, 1991; Prasad et al., 1994; Tsugane et al., 1999; Moller et al., 2007).

ROS pode afetar as respostas aos estresses de duas maneiras. Uma gama de moléculas reage com ROS, provocando danos irreversíveis que levam a necrose tecidual e até mesmo à morte celular (Rebeiz et al., 1988; Girotti, 2001). Por outro lado, ROS influencia a expressão gênica e as vias de transdução de sinais. Sugerindo que as células vegetais usam ROS, como indicador ambiental e biológico no controle gênico frente ao estresse (Dalton et al., 1999).

Dentre os fatores ambientais que causam o desequilíbrio entre produção e remoção de ROS e, conseqüente aumento na geração de ROS, está o estresse

salino. Trabalhos mostram que este estresse aumenta o conteúdo de  $H_2O_2$  e a peroxidação de lipídios de membranas, assim rompendo sua permeabilidade ou induzindo estresse oxidativo nos tecidos vegetais (Gomez et al., 1999; Hernandez et al., 2000; Jain et al., 2001; Demiral e Turkan, 2005; Mandhania et al., 2006).

Evidências mostram que danos na membrana sob estresse salino estão relacionados a aumento na geração de ROS (Fadzilla et al., 1997; Gomez et al., 1999; Hernandez et al., 2000). Peroxidação lipídica medida como a quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), é produzida quando ácidos graxos poliinsaturados na membrana sofrem oxidação pelo acúmulo de ROS. Neste sentido, a peroxidação lipídica é freqüentemente usada para indicar aumento de ROS (Gomez et al., 1999; Hernandez et al., 2000).

A peroxidação lipídica foliar de genótipo de milho tolerante a salinidade não foi afetada durante estresse salino, todavia, no genótipo sensível houve significativo aumento (Neto et al., 2006). Adicionalmente, em raízes do cultivar de arroz Begunbitchi, o acúmulo de MDA foi maior do que na cultivar Lunishree, indicando que o estresse salino causou alta taxa de peroxidação lipídica em Begunbitchi (Khan e Panda, 2008). O estresse salino também causou aumento na peroxidação lipídica foliar de duas cultivares de *Sesamum indicum* (Koca et al. 2007).

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral**

Identificar e analisar as respostas fisiológicas ao estresse salino em dois genótipos de cana-de-açúcar, correlacionando-as com possíveis mecanismos de adaptação a este estresse.

#### **Objetivos específicos**

- Caracterizar fisiologicamente dois genótipos (CB 47-89 e CB 45-3) de cana-de-açúcar quanto às respostas ao estresse salino, no âmbito das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a*;
- Verificar se os genótipos são contrastantes quanto às respostas ao estresse salino.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal, condições de cultivo, de estresse e desenho experimental

As análises fisiológicas foram realizadas em plantas após 60 dias de plantio. Para tanto, o material de propagação (mini-toletes) de dois genótipos (CB 47-89 e CB 45-3) de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*), foi gentilmente cedido pelo senhor Batista da Fazenda Santa Maria no município de Campos dos Goytacazes/RJ.

De acordo com informações cedidas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Campus Leonel Miranda - Campos dos Goytacazes/RJ) e pela Pesagro-RIO (Campos dos Goytacazes/RJ), no município de Campos dos Goytacazes/RJ, o genótipo CB 47-89 é geralmente cultivado em áreas de baixada, normalmente afetadas pela salinidade. Todavia, o genótipo CB 45-3 não tem alto desempenho nestas áreas. Portanto, supostamente o genótipo CB 47-89 é resistente ao solo salino, enquanto o genótipo CB 45-3 é suscetível.

Os mini-toletes foram plantados em substrato, composto por uma mistura de areia lavada e vermiculita (2:1, v:v). Após brotamento, as plantas foram irrigadas periodicamente com solução nutritiva Yoshida (Yoshida, 1975). Quando necessário, houve irrigação com água potável, no intervalo entre as adições de solução nutritiva. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, pertencente

ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Após 60 dias de plantio, o conjunto de plantas controle foi irrigado com solução nutritiva. Contudo, o grupo de plantas sob estresse foi irrigado com solução nutritiva contendo NaCl 256 mM. A temperatura de crescimento e de estresse foi de 31°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).

A concentração de NaCl (256 mM) usada para causar respostas fisiológicas nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 em um curto intervalo de tempo (268 horas) foi determinada em um ensaio preliminar. Considerando que o genótipo CB 47-89 é tolerante ao estresse salino, apenas plantas desse genótipo foram utilizadas neste ensaio, uma vez que, caso alguma concentração de NaCl cause danos nele, possivelmente causará na supostamente sensível (CB 45-3). Neste sentido, plantas do genótipo CB 47-89 foram tratadas com quatro concentrações de NaCl: 85, 170, 256 e 340 mM.

Os ensaios foram montados em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado) com 04 tratamentos: CB 47-89/Controle, CB 45-3/Controle, CB 47-89/NaCl 256 mM e CB 45-3/NaCl 256 mM. A distribuição e escolha das plantas foram efetuadas respeitando observações fenotípicas para obter tratamentos homogêneos.

## 4.2. Trocas gasosas

Na casa-de-vegetação, as análises de trocas gasosas foram efetuadas na região mediana da primeira folha completamente expandida, abaixo do cartucho foliar. Dentre as variáveis de trocas gasosas analisadas estão a taxa de fotossíntese líquida ( $P_n$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), a concentração interna (ou intracelular) de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{L L}^{-1}$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e a transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Tais variáveis foram obtidas, por meio do analisador de gases por infravermelho (IRGA, Infrared Gas Analyzer), modelo Ciras II (Portable Photosynthesis Systems, Hitchin, Inglaterra) (Fig. 01).

Os genótipos CB 47-89 e CB 45-3 não foram anteriormente caracterizados no âmbito das trocas gasosas. Neste sentido, antes de investigar as respostas fisiológicas ao estresse salino, foi feita uma curva de resposta ao fluxo de fótons fotossintetizantes (FFF) para determinar o fluxo ótimo de cada

genótipo. A curva de FFF iniciou-se com  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e finalizou com  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A fonte de fótons foi uma lâmpada alógena (LED) do próprio equipamento e o  $\text{CO}_2$ , também fornecido pelo equipamento, foi fixado em  $380 \mu\text{L L}^{-1}$ .

Posteriormente, o FFF ótimo de cada genótipo foi fixado para definir o intervalo do dia, onde a fotossíntese fosse máxima para ambos os genótipos. Para tanto, iniciou-se a coleta das variáveis às 07h30min e finalizou-se às 17h30min, com intervalo de uma hora entre elas. O intervalo ótimo, por sua vez, foi utilizado para coletar os dados de trocas gasosas durante o estresse salino. Para determinar as curvas supracitadas foram utilizadas apenas plantas de cada genótipo na condição controle.

Após os ensaios preliminares acima descritos, as respostas das trocas gasosas ao estresse salino foram coletadas entre 8h30min e 12h30min, a partir do início do estresse (0 hora) e nos seguintes intervalos: 24, 72 e 120 horas. O último tempo (120 horas) foi considerado o ponto máximo de estresse, onde  $P_n$  foi próximo ou igual a zero. No ensaio com estresse foi utilizado FFF de  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $380 \mu\text{L L}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ . A umidade relativa do ar na câmara de medição foi fixada em 80% e a temperatura foi  $31^\circ\text{C} (\pm 2^\circ\text{C})$ , para os ensaios preliminares e com estresse salino.

As curvas de resposta das trocas gasosas ao FFF, às horas do dia e ao estresse salino foram efetuadas com três plantas. Os valores foram obtidos a partir da média da triplicata, feita em cada uma das três plantas.

### **4.3. Fluorescência da clorofila a**

Análise da fluorescência da clorofila a foi efetuada com um fluorímetro portátil de pulso modulado, modelo Fluorescence Monitoring System (FMS-2) (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, Inglaterra) (Fig. 01) seguindo a metodologia do pulso de saturação, adaptada de Schreiber et al. (1994). As leituras foram efetuadas na região mediana da primeira folha completamente expandida, abaixo do cartucho foliar, entre 08h30min e 10h, a partir do início do estresse (0 hora) e nos seguintes intervalos: 48, 96, 168 e 216 horas. Foram utilizadas 5 plantas por tratamento em cada um dos intervalos.

Antes das análises de fluorescência, as folhas foram adaptadas ao escuro por 30 minutos, para completa oxidação de  $Q_A$ . Tal adaptação, na realidade, correspondeu apenas a uma área circular do limbo foliar, de cerca de quatro milímetros de diâmetro, sendo obtida por meio de pinças especiais.

A área adaptada ao escuro foi exposta a luz de baixa intensidade ( $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por 5s para coletar a fluorescência inicial ( $F_0$ ), em seguida aplicou-se por 0,8s um pulso de luz saturante de  $10.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e foram determinadas as seguintes variáveis: fluorescência máxima ( $F_m$ ), fluorescência variável ( $F_v$ ) e o rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ). Após 30 segundos, as folhas foram então adaptadas à luz, por um período de 10s, utilizando-se uma luz actínica de  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Através de um segundo pulso saturante de mesma intensidade, foram determinadas as variáveis:  $F_t$ ,  $F_0'$ ,  $F_m'$ ,  $F_v'$ ,  $\Phi_{\text{PSII}}$ , qP e NPQ. Estas últimas foram calculadas de acordo com as seguintes fórmulas (Maxwell e Johnson, 2000):  $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_t)/F_m'$ ,  $qP = (F_m' - F_t)/(F_m' - F_0')$  e  $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ , onde:  $F_t$ : fluorescência no *steady state* (equilíbrio);  $F_m'$ : fluorescência máxima obtida em folhas adaptadas à luz;  $F_v'$ : fluorescência variável obtida em folhas adaptadas à luz;  $\Phi_{\text{PSII}}$ : rendimento quântico efetivo do PSII; qP: *quenching* fotoquímico; NPQ: *quenching* não-fotoquímico.

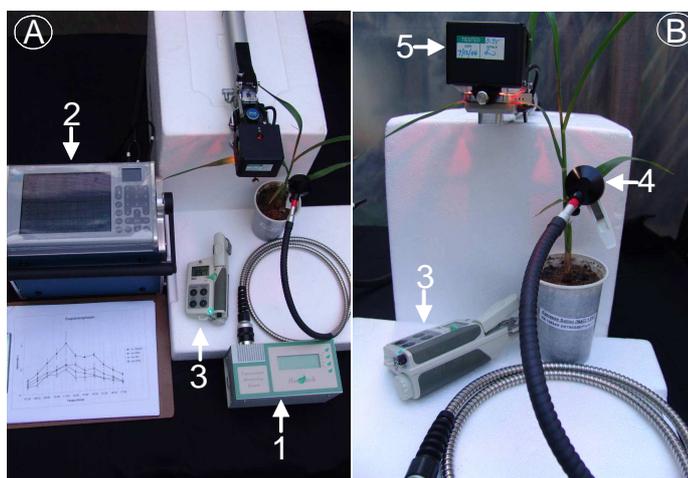


Figura 01. Aparelhos usados nas análises fisiológicas. (A) Visão geral dos aparelhos utilizados para análise de fluorescência da clorofila a (1, fluorímetro modelo FMS-2), trocas gasosas (2, IRGA, CIRAS-2) e intensidade de cor verde da folha (3, SPAD). (B) Visão detalhada dos aparelhos em contato com a planta: (4) sonda do fluorímetro acoplada à pinça de adaptação ao escuro e (5) câmara de medição do IRGA.

#### **4.4. Peso de matéria fresca e seca do tecido radicular e da parte aérea**

Após as avaliações de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a*, o peso de matéria fresca do tecido radicular e da parte aérea foi imediatamente coletado de quatro plantas por tratamento, a partir do início do estresse (0 hora) e nos seguintes intervalos: 48, 96, 168 e 216 horas. Em seguida, o peso da matéria seca foi determinado pela pesagem de ambos tecidos, após o processo de secagem em estufa com circulação forçada de ar a 70°C por 72 horas.

#### **4.5. Peroxidação de lipídeos do tecido radicular e foliar**

A peroxidação lipídica foi determinada pelo conteúdo de malondialdeído (MDA, produto da peroxidação lipídica) de acordo com Dhindsa e Matowe (1981), com algumas modificações. Essa reação colorimétrica ocorre entre MDA e o ácido tiobarbitúrico (TBA) gerando um composto de tonalidade avermelhada. Cerca de 250 mg de tecido fresco foliar e radicular foi macerado em 3 mL de TCA 0,1% (ácido tricloroacético). O homogenato foi centrifugado a 4500 rpm por 15 min. Em seguida, foi retirado 0,5 mL do sobrenadante e adicionado em 2 mL de solução de TCA 20% contendo TBA 0,5%. A mistura foi aquecida a 95°C por 30 min. e então, resfriada rapidamente em gelo. A amostra foi então centrifugada a 4500 rpm por 15 min. e a absorbância do sobrenadante foi lida a 535 nm e o seu valor subtraído do valor da absorbância inespecífica a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . As leituras de absorbância foram realizadas em leitor de micro-placa de 96 poços ( $\mu$ Quant, BIO-TEK).

#### **4.6. Análise estatística**

Os dados foram organizados e os gráficos gerados no programa Microsoft Excel. Posteriormente os dados foram analisados no programa GENES 9.0, onde foi feito Teste *t* para comparação de médias em nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Os genótipos CB 47-89 e CB 45-3 são afetados por NaCl 256 mM

O rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) foi utilizado para avaliar os danos causados por diferentes concentrações de NaCl no aparelho fotossintético do genótipo CB 47-89, ao longo de 268 horas.

Segundo a figura 02, sob 85 e 170 mM de NaCl o  $F_v/F_m$  não foi alterado. Todavia, as concentrações de 256 e 340 mM causaram queda nesta variável, respectivamente, em 196 e 144 horas. No final de 268 horas de estresse, foram retiradas fotos das plantas de cada tratamento e posteriormente foi coletado o peso de matéria fresca e seca da parte aérea e radicular.

As plantas dos diferentes tratamentos em 0 hora (Fig. 02 C) não apresentaram sintomas de estresse, como amarelamento e redução de área foliar. Porém, após 268 horas de estresse, novamente em comparação ao controle, observou-se que os maiores danos fenotípicos foram provocados por NaCl 256 e 340 mM, sendo que na última concentração houve maior necrose e redução da área foliar (Fig. 02 D).

O peso de matéria fresca (Fig. 02 A) e seca (Fig. 02 B) da raiz não foi alterado em nenhuma das concentrações de NaCl, após 268 horas. A parte aérea teve seu peso de matéria fresca reduzido principalmente com NaCl 256 e 340 mM, mas o peso de matéria seca não foi significativamente alterado nas diferentes concentrações. Somando-se o peso de matéria fresca da raiz com o de

folha, obteve-se o peso de matéria fresca da planta inteira, o qual foi reduzido principalmente com NaCl 256 e 340 mM. Da mesma maneira, o peso de matéria seca da planta inteira foi obtido, e este não foi alterado em nenhuma das concentrações, evidenciando que não houve perda de biomassa. Juntos estes dados indicam que em NaCl 256 e 340 mM houve maior perda de água ao longo de 268 horas de estresse, uma vez que, não houve perda de biomassa.

Juntos os dados fenotípicos, de  $F_v/F_m$ , peso de matéria fresca e seca mostram que NaCl 340 mM causou um efeito mais drástico. Possivelmente esta concentração estaria superando a capacidade de resposta da planta frente ao estresse, o que poderia, então, mascarar os resultados. Portanto, a concentração escolhida para os próximos ensaios foi NaCl 256 mM.

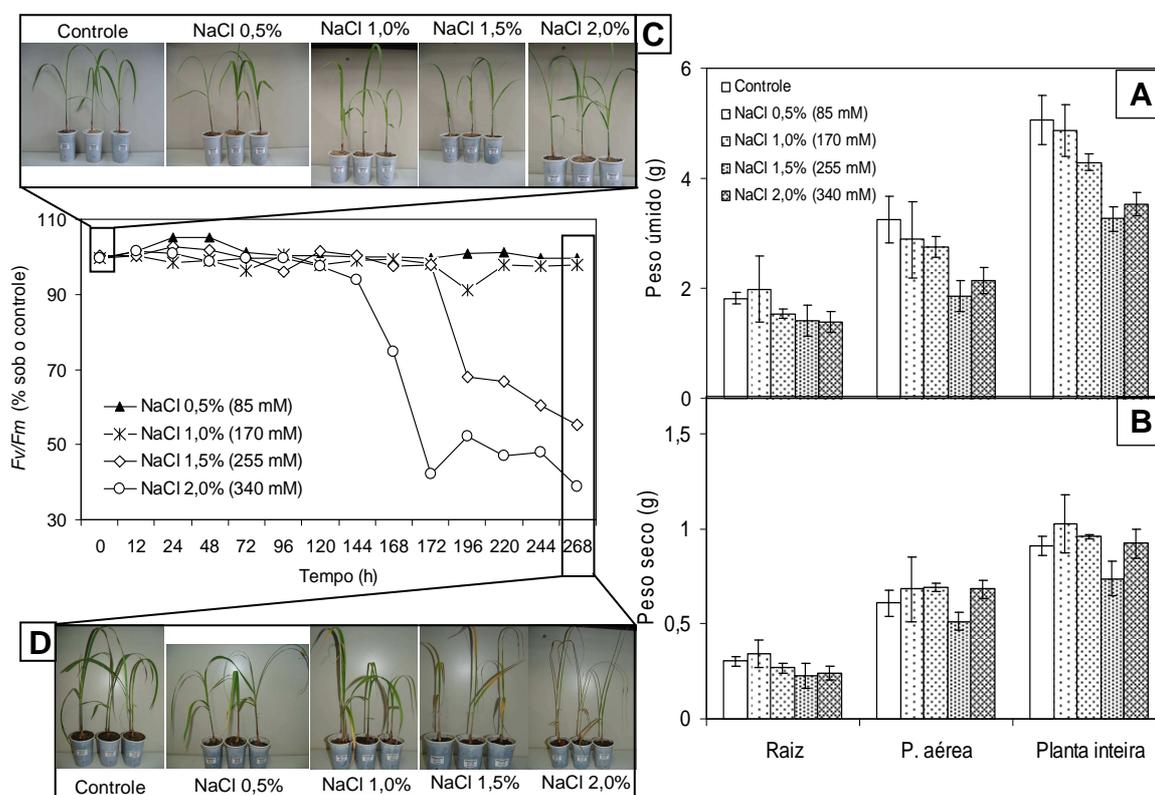


Figura 02. Efeito de diferentes concentrações de NaCl (85, 170, 255, 340 mM) no rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) e no peso de matéria fresca e seca de plantas do genótipo CB 47-89. Após 144 horas de estresse, NaCl 340 mM causa queda no  $F_v/F_m$  e em 196 horas, NaCl 256 mM causa queda no  $F_v/F_m$ . Contudo, com NaCl 85 e 170 mM não houve tal queda, após 268 horas de estresse. Fotos representam o efeito fenotípico das diferentes concentrações de NaCl em 0 (C) e 268 (D) horas de estresse. Peso de matéria fresca (A) e seca (B) da raiz e da parte aérea (P. aérea) foram coletados após 268 horas de estresse. Barras verticais representam o desvio padrão ( $n=3$ ).

## 5.2. Trocas gasosas dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino

Na curva de resposta ao FFF a taxa de fotossíntese líquida ( $P_n$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ) e transpiração ( $E$ ), independentemente de FFF, foi significativamente maior no genótipo CB 47-89 que no genótipo CB 45-3 (Fig. 03). Entre 400 e 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de FFF, o carbono interno ( $C_i$ , Fig. 03) foi maior no genótipo CB 45-3 que no CB 47-89. Porém, entre 1000 e 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de FFF o carbono interno é significativamente igual entre os dois genótipos. Apesar de dispor da mesma quantidade de  $C_i$  a partir de 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a  $P_n$  do genótipo CB 45-3 ainda é menor que a do genótipo CB 47-89 (Fig. 03). Isto indica que estes dois genótipos são diferentes no âmbito da assimilação de  $\text{CO}_2$ , sendo o genótipo CB 47-89 mais eficiente que CB 45-3.

A  $P_n$ ,  $g_s$  e  $E$ , foram significativamente maiores com 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de FFF em ambos os genótipos (Fig. 03). Uma vez que, 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de FFF é o máximo do aparelho, não foi possível testar fluxos maiores de fótons. Possivelmente, fluxos maiores de fótons resultariam em maior  $P_n$ ,  $g_s$  e  $E$ . Portanto, em condições artificiais de luz, 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de FFF é o valor ótimo para ambos os genótipos. Este fluxo de fótons junto com 380  $\mu\text{L L}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ , foram usados para determinar o intervalo ótimo do dia para coleta dos dados, e para as análises das trocas gasosas durante estresse salino.

De acordo com a figura 04, a  $P_n$ ,  $g_s$  e  $E$  foi significativamente maior no genótipo CB 47-89 do que no genótipo CB 45-3, ao longo do dia. Entretanto, o  $C_i$  foi significativamente igual entre os genótipos no mesmo período. Da mesma maneira, apesar de dispor da mesma quantidade de  $C_i$  ao longo do dia, a  $P_n$  do genótipo CB 45-3 ainda é menor que a do genótipo CB 47-89 (Fig. 04). Portanto, os dados da curva de FFF junto com os dados de intervalo do dia, indicam que independentemente de FFF e do horário, os dois genótipos são diferentes no âmbito da assimilação de  $\text{CO}_2$ , sendo o genótipo CB 47-89 mais eficiente que CB 45-3.

A condutância estomática ( $g_s$ , Fig. 04) permanece estável entre 08h30min-14h30min para o genótipo CB 47-89, e entre 08h30min-16h30min para CB 45-3. A transpiração ( $E$ , Fig. 04) do genótipo CB 45-3 alcançou maior pico em 11h30min, enquanto a faixa para CB 47-89 ficou entre 09h30min-14h30min. O carbono interno ( $C_i$ , Fig. 04) do genótipo CB 45-3 sofre queda entre 07h30min-

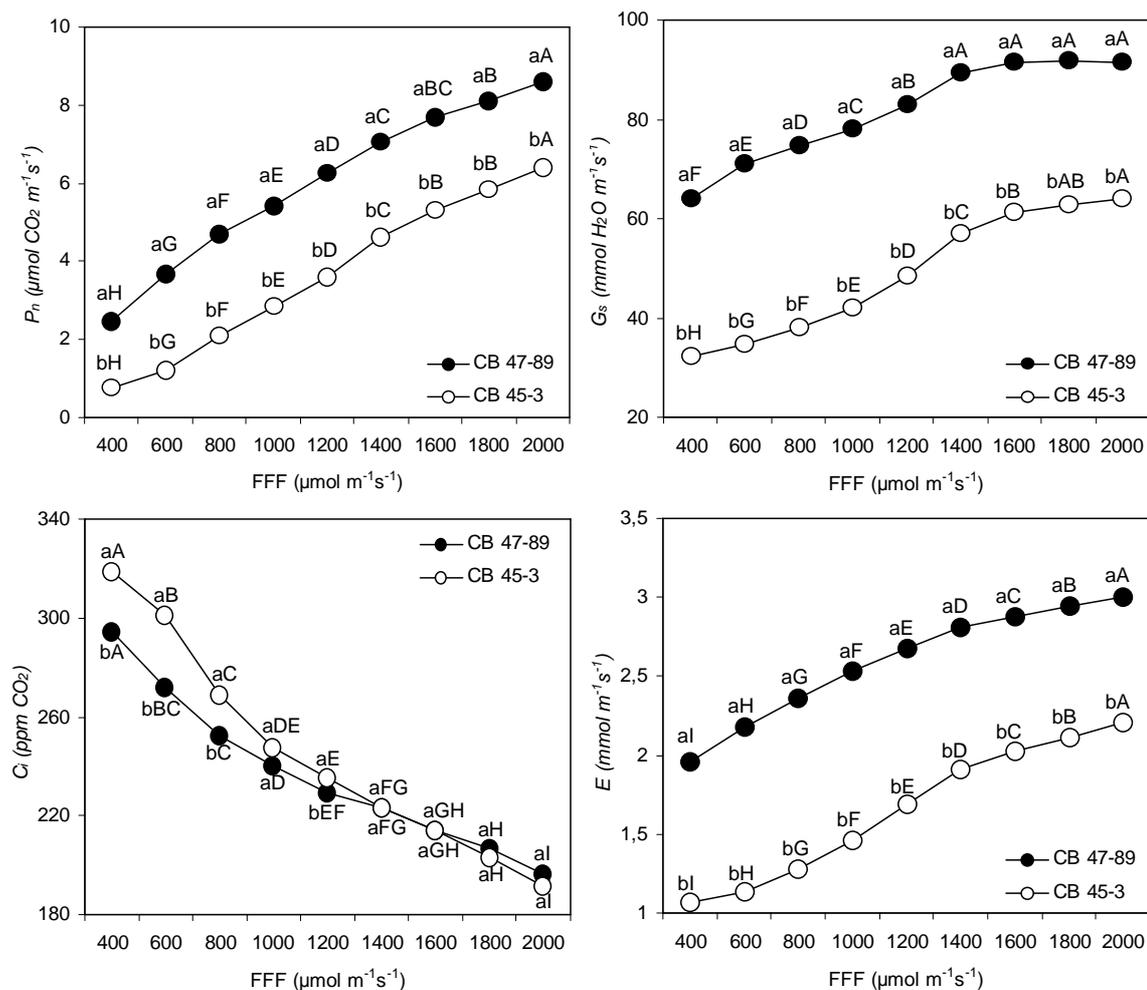


Figura 03. Respostas das trocas gasosas durante curva de resposta ao fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (FFF) em plantas dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob condição controle. Enquanto, carbono interno ( $C_i$ ) diminui com o aumento de FFF, a taxa de fotossíntese líquida ( $P_n$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e transpiração ( $E$ ) sobem. Sendo que em 2000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  a taxa de fotossíntese líquida ( $P_n$ ) é máxima para ambos os genótipos. Todavia, CB 47-89 tem maior  $P_n$ ,  $g_s$  e  $E$  que CB 45-3. Cada ponto representa a média de 03 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre genótipos. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre FFF (Teste  $t$ , com 5% de probabilidade).

11h30min e volta a subir entre 11h30min-17h30min. No genótipo CB 47-89  $C_i$  (Fig. 04) cai entre 07h30min-14h30min e volta a subir entre 14h30min-17h30min. A  $P_n$  do genótipo CB 47-89 foi significativamente maior entre 08h30min e 13h30min, enquanto em CB 45-3 foi entre 10h30min-12h30min (Fig. 04), sendo estas, as faixas ótimas para coleta de dados durante estresse salino.

Uma vez determinado que, 2000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de FFF, e os intervalos entre 08h30min-13h30min (CB 47-89) e 10h30min-12h30min (CB 45-3) são as

condições mínimas para alcançar a taxa fotossintética máxima em condições artificiais, iniciou-se a investigação das trocas gasosas frente ao estresse salino.

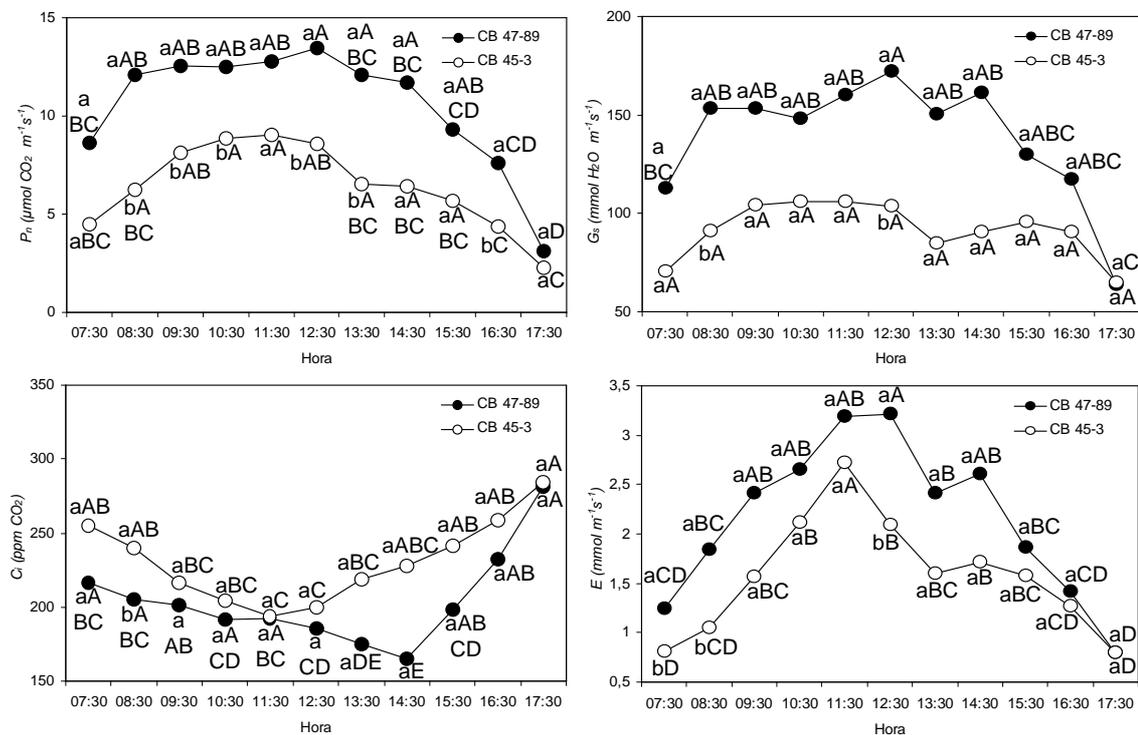


Figura 04. Respostas das trocas gasosas no decorrer das horas do dia, em plantas dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob condição controle. A taxa de fotossíntese líquida ( $P_n$ ), condutância estomática ( $g_s$ ) e transpiração ( $E$ ) são maiores no genótipo CB 47-89 que no genótipo CB 45-3, ao longo do dia. A  $P_n$  do genótipo CB 47-89 foi maior entre 08h30min e 13h30min, enquanto em CB 45-3 foi entre 10h30min-12h30min, sendo estas, as faixas ótimas para coleta de dados. Cada ponto representa a média de 03 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre genótipos. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre horários (Teste  $t$ , com 5% de probabilidade).

No ensaio com estresse salino, as trocas gasosas das plantas sob condições normais (Controle) são significativamente diferentes entre os genótipos CB 47-89 e CB 45-3 (Fig. 05). O genótipo CB 47-89 tem maior  $g_s$ ,  $E$  e  $P_n$ , que o genótipo CB 45-3, corroborando com o observado nas curvas de respostas ao FFF e ao intervalo do dia (Fig. 03 e 04). Além disso, em ambos os genótipos,  $g_s$ ,  $E$  e  $P_n$  significativamente aumentam ao longo de 120 horas, na condição controle.

Ainda na condição controle, apenas em 24 e 72 horas o carbono interno ( $C_i$ ) é significativamente diferente entre os genótipos CB 47-89 e CB 45-3, corroborando com a figura 03, onde o  $C_i$  entre os dois genótipos é igual, sob 2000

$\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$  de fótons. Todavia, ao longo de 120 horas o  $C_i$  aumenta nos dois genótipos, assim como a  $g_s$ , E e  $P_n$  (Fig. 05).

O estresse salino causou significativa queda na  $g_s$ , E e  $P_n$  e aumento no  $C_i$  nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 ao longo de 120 horas (Fig. 05). As maiores quedas e aumento ocorreram entre 0, 24 e 72 horas, e permaneceu constante até 120 horas, isto é, não diferindo entre 72 e 120 horas.

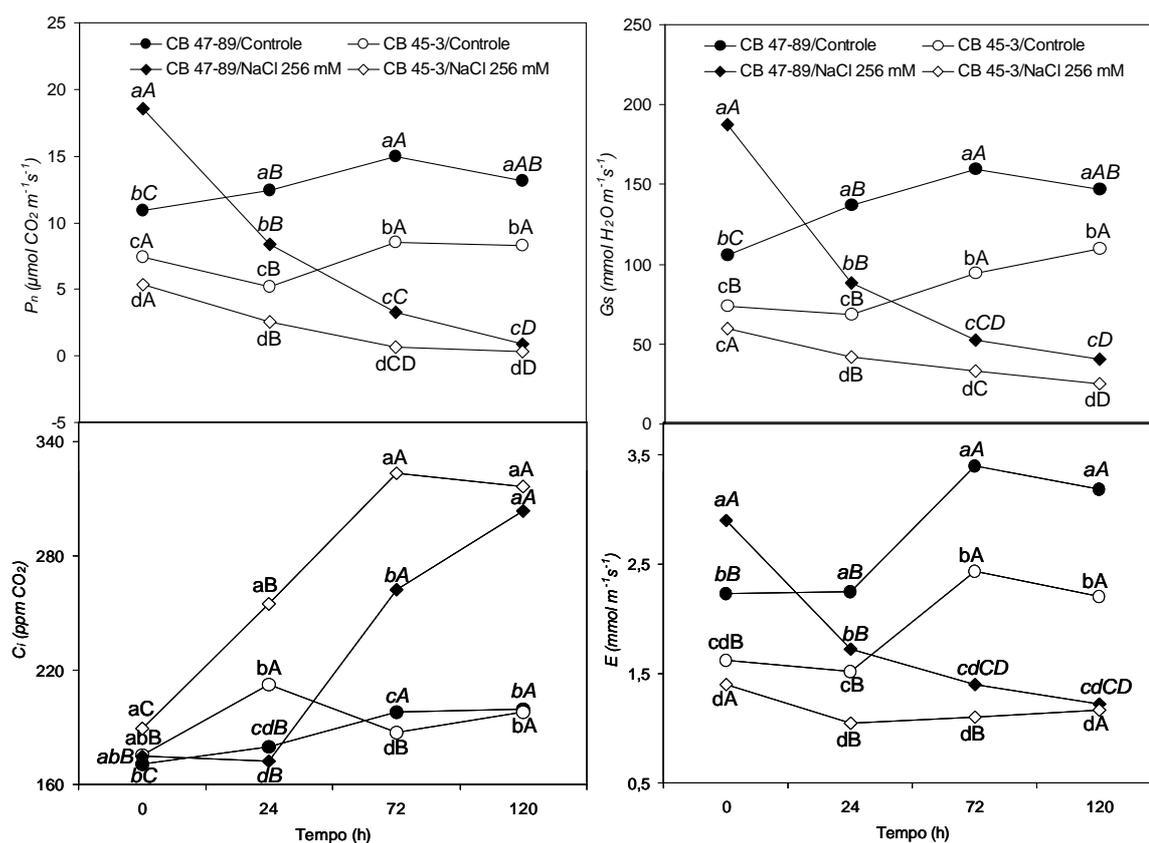


Figura 05. Trocas gasosas nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino. Ao longo de 216 horas, o estresse salino (NaCl 256 mM) causa queda na condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração (E) e taxa fotossintética ( $P_n$ ) e aumenta o carbono interno ( $C_i$ ) nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3. Cada ponto representa a média de 03 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tempos (Teste  $t$ , com 5% de probabilidade). Letras em *itálico* referem-se ao genótipo CB 47-89.

Comparando-se cada genótipo tratado com NaCl com seu respectivo controle, observa-se que o estresse salino causou maior queda na taxa fotossintética do genótipo CB 47-89 do que no CB 45-3 (Fig. 05). Possivelmente, este resultado esteja ligado à significativa diferença entre os dois genótipos na

condição controle (Fig. 03, 04 e 05). Apesar disso, ao final de 120 horas de estresse a  $P_n$  do genótipo CB 47-89 é significativamente superior ao do genótipo CB 45-3.

De acordo com a figura 05, a taxa fotossintética após 120 horas chega próximo a zero nos genótipos tratados com NaCl. Conseqüentemente, neste mesmo tempo o  $C_i$  atinge seu valor máximo, principalmente no genótipo CB 45-3. Todavia,  $g_s$  e  $E$  não chegam a zero, em nenhum dos genótipos tratado com NaCl. Possivelmente, os estômatos não estejam totalmente fechados, tendo ainda uma pequena fenda que permita entrar  $CO_2$ , corroborando com o fato da  $P_n$  não ter chegado a zero em 120 horas. Adicionalmente, neste mesmo tempo, o  $C_i$  não atinge seu valor máximo ( $380 \mu L L^{-1}$ ). Isso sugere uma entrada mínima de  $CO_2$  através do estômato.

### **5.3. Fluorescência da clorofila a dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino**

O rendimento quântico efetivo do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) de ambos os genótipos, sob estresse salino (NaCl 256 mM), reduziu em relação à condição controle, em 48, 96 e 168 horas (Fig. 06). Entre os genótipos tratados com NaCl não há diferença significativa no  $\Phi_{PSII}$ . A exceção de 0 e 96 horas, o  $\Phi_{PSII}$  é diferente entre os genótipos na condição controle. Diferentemente das trocas gasosas o  $\Phi_{PSII}$  é maior no genótipo CB 45-3 do que em CB 47-89, porém essa diferença não reflete na taxa fotossintética ( $P_n$ , Fig. 03 e 04). Ao longo de 216 horas,  $\Phi_{PSII}$  não se altera nos genótipos tratados com NaCl. Entretanto, na condição normal,  $\Phi_{PSII}$  aumenta a partir de 48 horas nos dois genótipos (Fig. 06).

Enquanto  $\Phi_{PSII}$  é a proporção de energia absorvida usada na geração de NADPH e ATP, o *quenching* fotoquímico (qP) indica a proporção de centros de reação PSII que estão abertos (Maxwell e Johnson, 2000).

O estresse salino, em relação à condição controle reduziu o qP em 96, 168 e 216 horas. Entre os genótipos tratados com NaCl não houve diferença significativa no qP. Assim como o  $\Phi_{PSII}$ , em 96, 168 e 216 horas, o qP é maior no genótipo CB 45-3 que em CB 47-89. Ao longo de 216 horas, o qP do genótipo CB 47-89 tratado com NaCl cai bruscamente em 96 horas, porém nas horas seguintes aumenta um pouco. O genótipo CB 45-3 tratado com NaCl, ao contrário

de CB 47-89, não altera o qP ao longo de 216 horas. Na condição normal, qP se altera significativamente entre alguns tempos nos dois genótipos (Fig. 06).

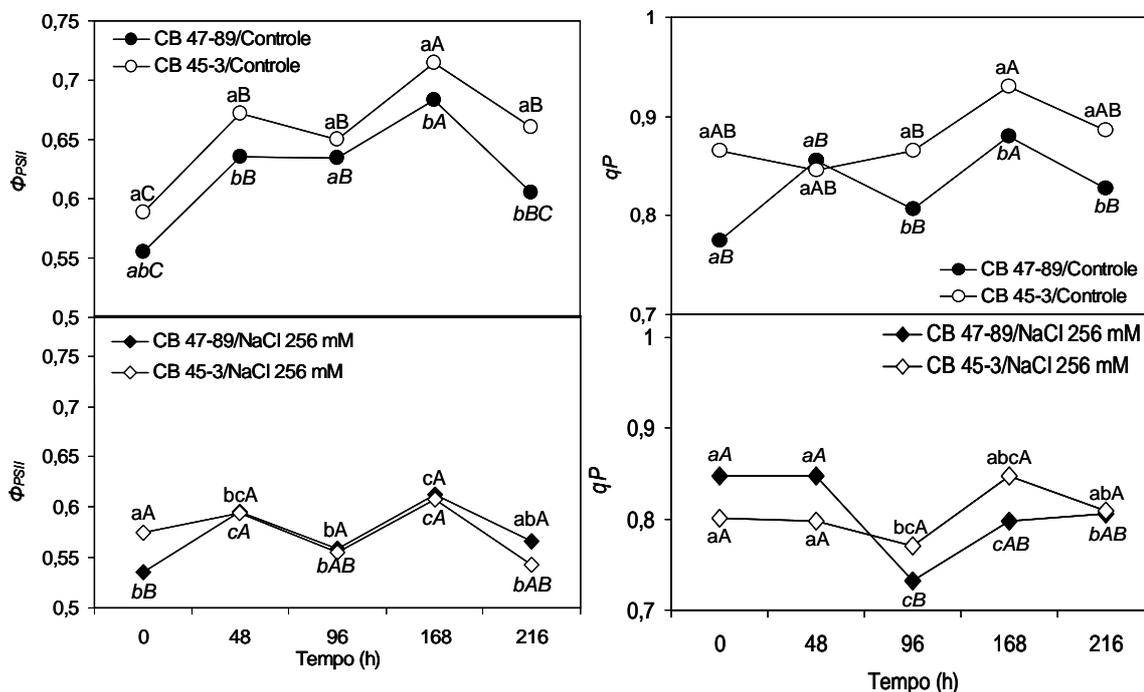


Figura 06. Rendimento quântico efetivo do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) e *quenching* fotoquímico (qP) nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino. O  $\Phi_{PSII}$  dos dois genótipos nos tempos 48, 96 e 168 horas foi reduzido pelo estresse salino (NaCl 256 mM). Da mesma maneira o estresse salino, em relação à condição controle reduziu o qP em 96, 168 e 216 horas. Cada ponto representa a média de 05 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tempos (Teste *t*, com 5% de probabilidade). Letras em *itálico* referem-se ao genótipo CB 47-89.

Valores de  $F_v/F_m$  refletem o rendimento quântico máximo do PSII, isto é, a eficiência quântica se todos os centros de reação PSII estiverem abertos. (Maxwell e Johnson, 2000). De acordo com a figura 07, apenas em 168 horas, o estresse salino, em relação à condição controle reduz o  $F_v/F_m$  de ambos os genótipos. Entre os genótipos tratados com NaCl não há diferença significativa em  $F_v/F_m$ . A razão  $F_v/F_m$  também não altera entre os genótipos na condição controle. Ao longo de 216 horas,  $F_v/F_m$  aumenta em 48 horas e permanece estável até 216 horas nos genótipos não tratados e tratados com NaCl.

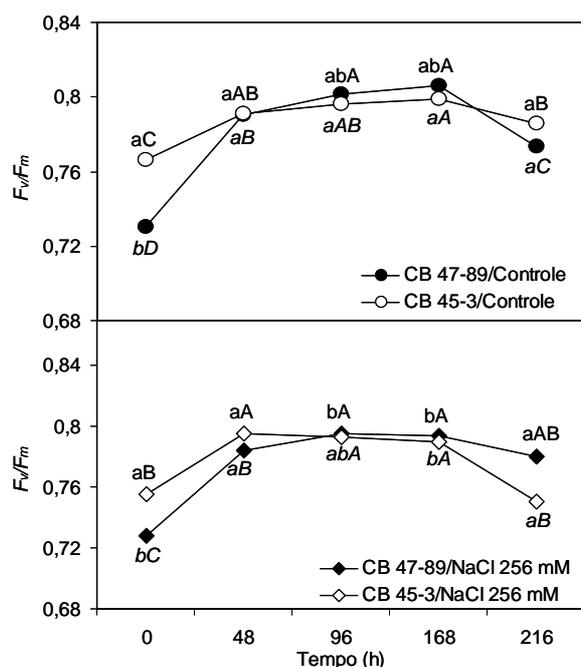


Figura 07. Rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino. Apenas em 168 horas, o estresse salino (NaCl 256 mM) causa queda na  $F_v/F_m$  de ambos os genótipos. Cada ponto representa a média de 05 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tempos (Teste  $t$ , com 5% de probabilidade). Letras em *itálico* referem-se ao genótipo CB 47-89.

Ao contrário de  $F_v/F_m$ , o rendimento máximo do PSII ( $F_v'/F_m'$ ) em relação ao controle sofreu queda nos dois genótipos após 48, 96 e 168 horas de estresse. Entre os genótipos tratados com NaCl não há diferença significativa no  $F_v'/F_m'$ . A razão  $F_v'/F_m'$  também não altera entre os genótipos na condição controle. Ao longo de 216 horas,  $F_v'/F_m'$  aumenta em 48 horas e permanece estável até 216 horas nos genótipos não tratados e tratados com NaCl (Fig. 08).

O *quenching* não fotoquímico (NPQ), variável relacionada à dissipação de calor (Bilger e Björkman, 1990), em relação à condição controle, aumentou em 96 e 216 horas após início do estresse. Entre os genótipos tratados com NaCl não há diferença significativa no NPQ. O NPQ também não altera entre os genótipos na condição controle. Ao longo de 216 horas, NPQ aumenta a partir de 48 horas nos genótipos tratados com NaCl. Entretanto, na condição normal, NPQ não altera ao longo de 216 horas nos dois genótipos (Fig. 08).

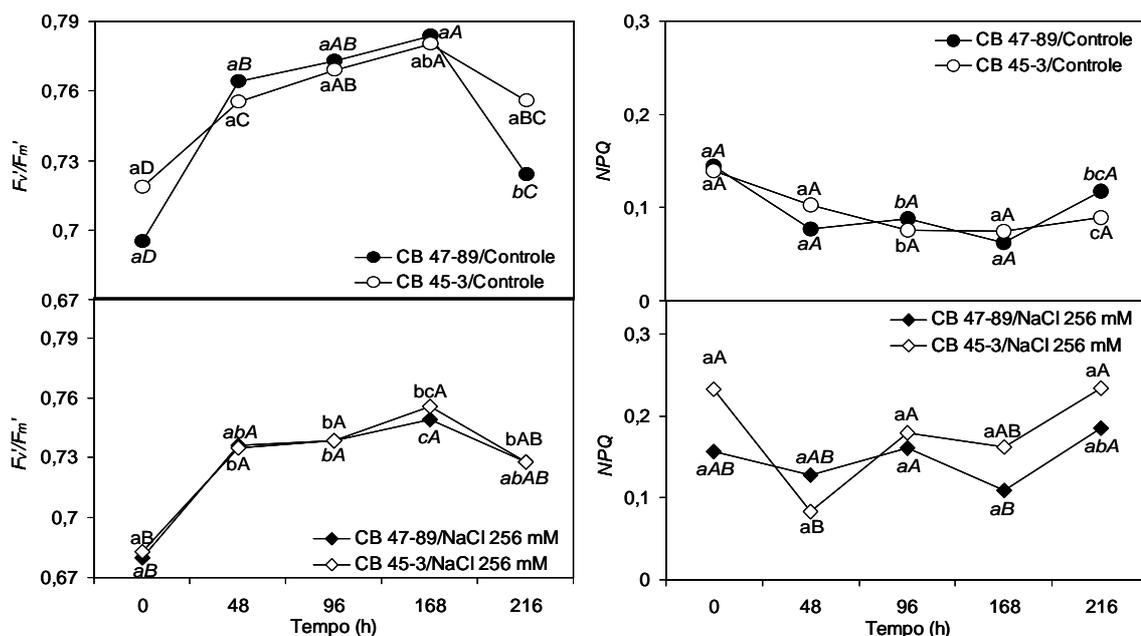


Figura 08. Rendimento máximo do PSII ( $F_v'/F_m'$ ) e *quenching* não fotoquímico (NPQ) nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino. Sob estresse salino (NaCl 256 mM)  $F_v'/F_m'$  é reduzida nos dois genótipos nos tempos 48, 96 e 168 horas. Todavia, o estresse salino aumenta NPQ de ambos os genótipos em 96 e 216 horas. Cada ponto representa a média de 05 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tempos (Teste *t*, com 5% de probabilidade). Letras em *itálico* referem-se ao genótipo CB 47-89.

#### 5.4. Peroxidação lipídica de folhas e raízes dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino

Para avaliar se o estresse salino aumenta os níveis de ROS, realizou-se peroxidação lipídica nos tecidos radicular e foliar dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3. De acordo com a figura 09, a peroxidação lipídica em raiz não foi alterada entre os quatro tratamentos, nos tempos de 0, 48 e 96 horas. Em 168 horas, entretanto, há diferença entre os genótipos CB 47-89 e CB 45-3 tratados com NaCl. Apesar disso, comparando-se com seus respectivos controles, não houve alteração na peroxidação. Isto sugere que dentro deste tempo, a diferença entre os genótipos tratados com NaCl, esteja ligada às suas diferenças fenotípicas e não ao efeito do estresse salino.

Com exceção do tratamento CB 47-89/Controle, após 216 horas, não há modificação na peroxidação lipídica de raiz entre os tratamentos CB 45-

3/Controle, CB 47-89/NaCl 256 mM e CB 45-3/NaCl 256 mM (Fig. 09). Isto indica que as ROS causaram danos nas membranas celulares de raízes do genótipo CB 47-89 sob estresse.

Para avaliar os danos causados por ROS, ao longo do tempo, no tecido radicular dos genótipos tratados com NaCl, comparou-se independentemente cada tratamento entre tempos. Verificou-se que, nas raízes do genótipo CB 47-89 tratado com NaCl, a peroxidação não foi alterada (Fig. 09). Apesar da significativa diferença entre plantas CB 47-89 tratadas e não tratadas com NaCl em 216 horas,

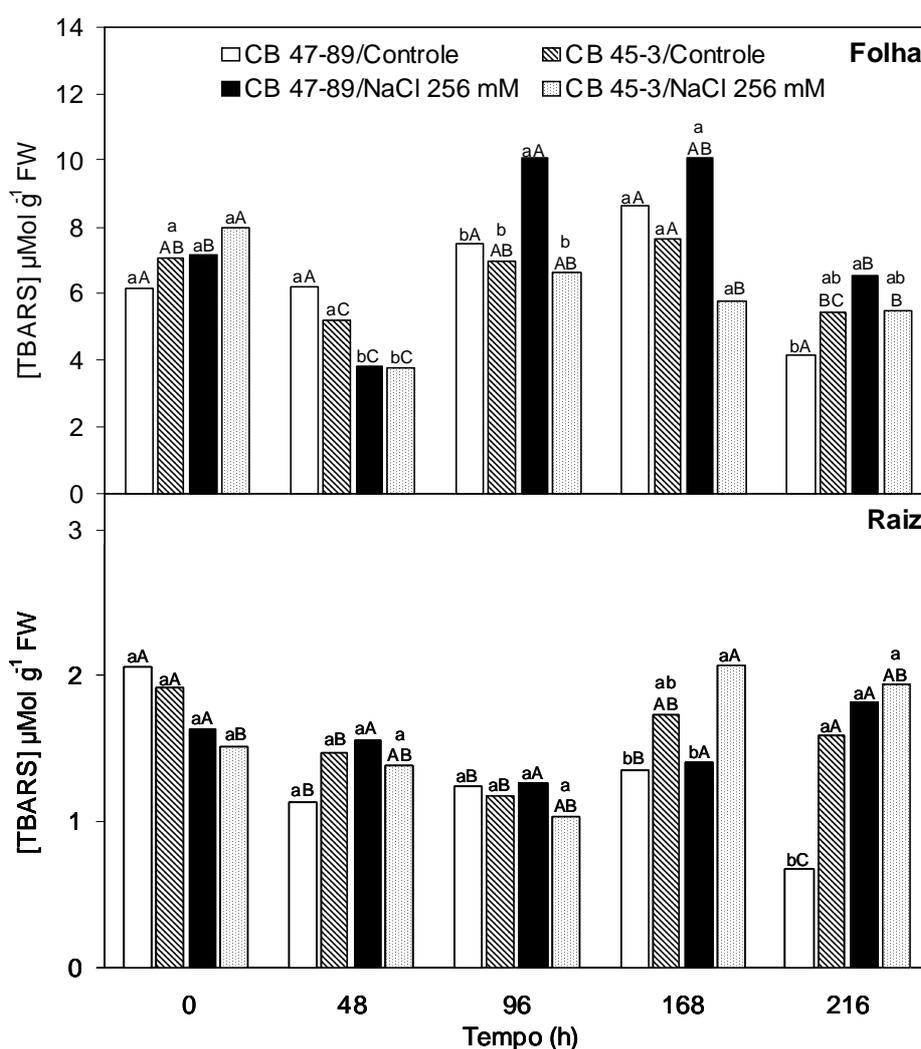


Figura 09. Peroxidação lipídica de folhas e raízes dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3. Ao longo de 216 horas, o estresse salino (NaCl 256 mM) provoca alterações na concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  PF) em folhas e raízes dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3. Cada barra representa a média de 03 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tempos (Teste *t*, com 5% de probabilidade).

este resultado sugere que ao longo do tempo de exposição ao agente estressante, a peroxidação lipídica neste genótipo não é afetada.

Da mesma maneira, apesar de não haver diferença entre plantas CB 45-3 não tratadas e tratadas com NaCl dentro de cada tempo, há significativa diferença ao longo de 216 horas, nas plantas tratadas, uma vez que, a peroxidação radicular no tempo 0 é menor que nos tempos de 168 e 216 horas (Fig. 09).

A peroxidação lipídica foliar em 0 e 168 horas não foi alterada entre os tratamentos (Fig. 09). No tempo de 48 horas, todavia, há alteração entre plantas não tratadas e tratadas com NaCl de ambos os genótipos. Neste tempo, a peroxidação das plantas tratadas diminuiu em relação aos respectivos controles. Apesar disso, nas horas seguintes há um aumento na peroxidação de ambos os genótipos tratados com NaCl.

Em 96 horas há um significativo aumento na peroxidação foliar das plantas CB 47-89 tratadas com NaCl (Fig. 09). Assim como em raiz, a peroxidação lipídica de folha em 216 horas, não foi alterada entre os tratamentos CB 45-3/Controle, CB 47-89/NaCl 256 mM e CB 45-3/NaCl 256 mM (Fig. 09). Contudo, houve significativo aumento entre plantas CB 47-89 não tratadas e tratadas com NaCl, sugerindo aumento no nível de ROS causando maiores danos nas membranas celulares deste genótipo que em CB 45-3.

Segundo a figura 09, ao longo do tempo, a peroxidação lipídica em folhas do genótipo CB 47-89 tratado com NaCl, após 48 horas, sofreu queda em relação a 0 hora. Em seguida, houve significativo aumento em 96 e 168 horas. Porém, em 216 horas a peroxidação cai, tornando-se igual ao tempo de 0 hora.

Assim como nas folhas do genótipo CB 47-89, a peroxidação lipídica no genótipo CB 45-3 tratado com NaCl, após 48 horas, sofre queda em relação a 0 hora (Fig. 09). Em seguida, no tempo de 96 horas a peroxidação aumenta tornando-se igual a 0 hora. Posteriormente, em 168 e 216 horas diminuiu em relação a 0 hora.

### **5.5. Crescimento dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino**

Para avaliar os danos causados pela restrição de CO<sub>2</sub>, durante estresse salino, na biomassa dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3, foi coletado o peso de matéria fresca e seca do tecido radicular e da parte aérea. O peso de matéria

fresca da raiz de ambos os genótipos não foi significativamente alterado, entre os tratamentos dentro de cada tempo, e ao longo das horas (Fig. 10 B). Todavia, apenas em 168 e 216 horas, o peso de matéria fresca da folha de ambos os genótipos tratados com NaCl, sofreu significativa redução em relação aos seus respectivos controles (Fig. 10 A). Apesar de o estresse salino causar queda na  $P_n$ ,  $g_s$  e  $E$  (Fig. 05), não houve significativa alteração no peso seco de raízes (Fig. 10 D) e folhas (Fig. 10 C) de ambos os genótipos.

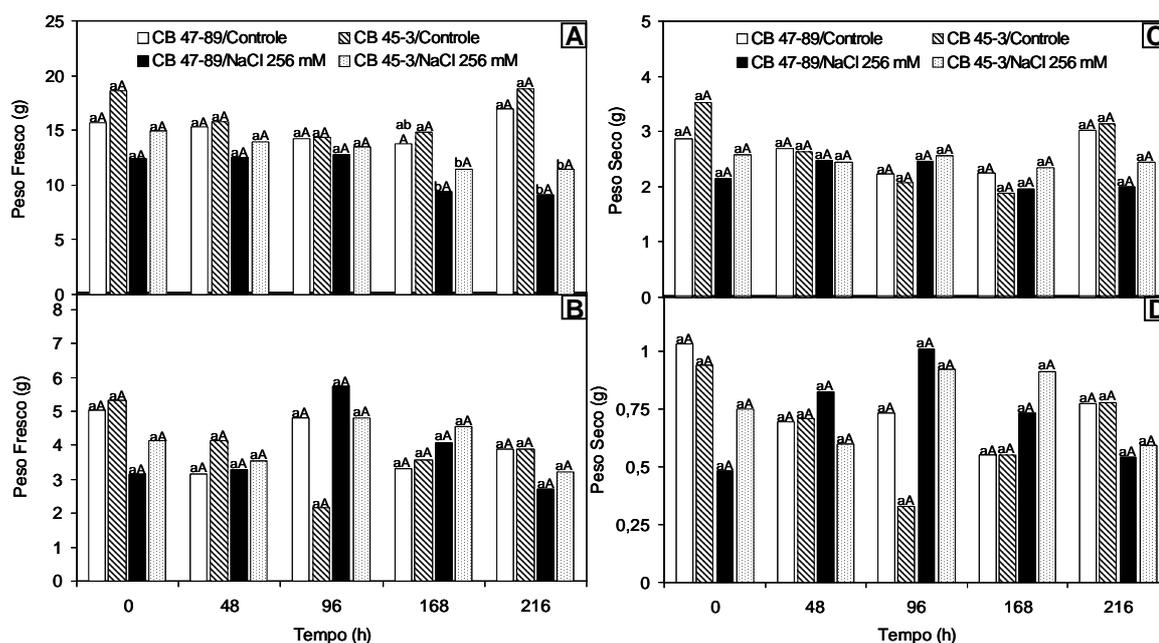


Figura 10. Peso da matéria fresca e seca de folhas e raízes dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse salino. Em 168 e 216 horas o estresse salino (NaCl 256 mM) causou redução do peso fresco de folha (A) de ambos os genótipos. Ao longo de 216 horas o peso fresco de raiz (B) e o peso seco de folha (C) e de raiz (D) de ambos os genótipos não foi alterado pelo estresse salino. Cada barra representa a média de 04 repetições. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tratamentos. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tempos (Teste  $t$ , com 5% de probabilidade).

## 6. DISCUSSÃO

A condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ) e taxa fotossintética ( $P_n$ ) dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3, sofreu significativa queda ao longo de 120 horas de estresse salino (Fig. 05). Tais efeitos foram similares às respostas em sorgo (Netondo et al., 2004), trigo (El-Hendawy et al., 2005), *Plantago coronopus* (Koyro, 2006), arroz (Moradi e Ismail, 2007; Khan e Panda, 2008), aveia (Zhao et al., 2007b), e citrus (López-Climent et al., 2008). Todavia, contrariam os dados de Lu et al. (2003), pois as trocas gasosas na halófita *Suaeda salsa* não foram afetadas pela salinidade.

Apesar de o estresse salino causar a redução das trocas gasosas nos dois genótipos de cana-de-açúcar, as respostas entre eles são diferentes. Ao longo de 120 horas de estresse,  $P_n$ ,  $E$  e  $g_s$  são significativamente maiores no genótipo CB 47-89 que no CB 45-3. Enquanto o  $C_i$  é menor no genótipo CB 47-89 do que no CB 45-3 (Fig. 05). Juntos estes resultados sugerem que o genótipo CB 47-89 tenha maior eficiência fotossintética do que o CB 45-3, durante estresse salino.

A redução da taxa fotossintética ( $P_n$ ) de ambos os genótipos, pode ser atribuída ao efeito do estresse salino na condutância estomática ( $g_s$ ) (Fig. 05). Adicionalmente, o significativo aumento de carbono interno ( $C_i$ , Fig. 05), indica que a fotossíntese foi substancialmente afetada por NaCl. Nestas condições, a biossíntese de ABA aumenta, ocasionando queda em  $g_s$ , limitando a entrada de

CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente aumentando C<sub>i</sub> e reduzindo P<sub>n</sub>. (Wilkinson e Davies, 2002).

De acordo com Netondo et al. (2004), López-Climent et al. (2008) e Khan e Panda (2008), há uma correlação positiva entre g<sub>s</sub> e assimilação de CO<sub>2</sub> sob estresse salino. Esta correlação sugere que nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3, a g<sub>s</sub> é o fator primário limitante da fotossíntese, pois restringe a difusão de CO<sub>2</sub>.

Plantas C<sub>4</sub>, como a cana-de-açúcar, atenuam o reduzido fluxo de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>, Fig. 05) minimizando a fotorrespiração (Taiz e Zeiger, 2004). Todavia, prolongado fechamento estomático, acompanhado da baixa concentração intracelular de CO<sub>2</sub> (Fig. 05) reduz a atividade carboxilase da rubisco (Meyer e Genty, 1998). Queda na capacidade de carboxilação, a qual leva a inibição do transporte de elétrons, é indicado por variáveis da fluorescência da clorofila a.

O rendimento quântico efetivo do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 decresceu (Fig. 06) durante o estresse salino, enfatizando a queda na taxa fotossintética (P<sub>n</sub>, Fig. 05). Apesar disso, o rendimento quântico máximo do PSII (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, Fig. 07) não foi alterado, indicando que o estresse salino não causou fotoinibição do PSII. Juntos estes dados sugerem que o decréscimo do  $\Phi_{PSII}$  (Fig. 06) está associado à redução na atividade da cadeia transportadora de elétrons e não a fotoinibição.

Uma vez que a energia absorvida no centro de reação do PSII ( $\Phi_{PSII}$ , Fig. 06), não está sendo destinada para o processo fotoquímico, implica no aumento da dissipação termal e re-emissão de energia (fluorescência) (Maxwell e Johnson, 2000; Baker, 2008). Neste sentido, as variáveis qP e F'<sub>v</sub>/F'<sub>m</sub> indicam quais dos processos estão alterando o  $\Phi_{PSII}$  (Baker, 2008).

Nos dois genótipos, qP (Fig. 06) e F'<sub>v</sub>/F'<sub>m</sub> (Fig. 08) sofrem queda durante estresse salino, indicando que a energia absorvida não está sendo direcionada para a cadeia transportadora de elétrons, pois os centros de reação PSII estão fechados (Q<sub>A</sub> reduzida), logo a energia está sendo dissipada na forma de calor, conseqüentemente aumentando o *quenching* não-fotoquímico (NPQ, Fig. 08) dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3. López-Climent et al. (2008) também verificaram queda no  $\Phi_{PSII}$  e aumento em NPQ, sugerindo que o estresse salino em *Citrus* provocou a dissipação termal de energia e concluíram que nesta espécie a redução do  $\Phi_{PSII}$  está associada ao aumento de NPQ.

Todavia, a contribuição relativa de  $qP$  e  $F_v'/F_m'$  para alterações no  $\Phi_{PSII}$  (Fig. 06) altera com o FFF. Normalmente, o aumento em NPQ (Fig. 08), indicado pelo decréscimo de  $F_v'/F_m'$  (Fig. 08), satura com FFF ( $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) menor do que o decréscimo de  $qP$ , demonstrando que a queda de  $qP$  (Fig. 06), e não o aumento em NPQ, é o principal fator que determina alterações no  $\Phi_{PSII}$  sob alto FFF (Kramer et al., 2004; Baker, 2008), como  $2000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Fig. 03).

Netondo et al. (2004) correlacionaram o aumento da dissipação termal de energia com a queda na condutância estomática de sorgo sob estresse salino. De acordo com esses autores, o aumento em NPQ associa-se à queda na assimilação de  $\text{CO}_2$ , uma vez que decresce a demanda de produtos do transporte de elétrons (NADPH e ATP), e assim aumenta a dissipação termal de energia.

Segundo Baker (2008), a demanda de NADPH e ATP são os maiores fatores que determinam o  $\Phi_{PSII}$ . Adicionalmente, assim como em milho (Oxborough e Baker, 1997), possivelmente a capacidade de regenerar ADP e  $\text{NADP}^+$ , é mais importante do que o *quenching* não fotoquímico na regulação da fotossíntese de cana-de-açúcar sob estresse salino.

Neste sentido, juntos os dados indicam que nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3, o estresse salino, por meio do fechamento estomático restringe a entrada de  $\text{CO}_2$ , conseqüentemente alterando o equilíbrio entre a geração de poder redutor (ATP e NADPH) e sua demanda no ciclo de Calvin. Este desequilíbrio prejudica o fluxo linear de elétrons (Szabo et al., 2005), mantendo PSII fechado ( $Q_A$  reduzida), conseqüentemente, reduzindo o *quenching* fotoquímico ( $qP$ , Fig. 06). Concomitantemente, o excesso de energia é dissipado na forma de calor (Netondo et al., 2004; Szabo et al., 2005), refletindo na redução de  $F_v'/F_m'$  e aumento do *quenching* não-fotoquímico (Fig. 08). Por fim, há o decréscimo do  $\Phi_{PSII}$  e da taxa fotossintética nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 sob estresse.

Meloni et al. (2003) relatam que a redução na taxa fotossintética associa-se com redução na biomassa. Apesar disso, o estresse salino, não alterou o peso seco de raízes (Fig. 10 D) e folhas (Fig. 10 C) dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3. Contrariando os dados apresentados por Kao et al. (2006), Zhao et al. (2007b) e Khan e Panda (2008), que observaram queda na biomassa de genótipos de soja, aveia e arroz, respectivamente, sob condições salinas. Contrariam também os dados de Patade et al. (2008), pois verificaram significativa redução na taxa de crescimento de calos de cana-de-açúcar tratados com NaCl.

A redução no peso fresco de folha em 168 e 216 horas (Fig. 10 A), o inalterado peso seco de folha (Fig. 10 C) e o fato da  $g_s$  e da  $E$  não chegarem a zero (Fig. 05), indicam pequena perda de água durante estresse salino. Isto reforça a possibilidade dos estômatos não estarem totalmente fechados, havendo ainda uma pequena fenda que permita a saída de água (Fig. 10 A) e entrada de  $CO_2$ , o que corrobora com o fato da  $P_n$  não ter chegado a zero em 120 horas e o  $C_i$  não ter atingido seu valor máximo ( $380 \mu L L^{-1}$ ) (Fig. 05). Porém, possivelmente esta pequena concentração de  $CO_2$  não seja suficiente para ser concentrada pela PEPcase, e assim, a atividade carboxilase da rubisco caia.

A peroxidação lipídica foliar do genótipo CB 45-3 e principalmente do genótipo CB 47-89 (Fig. 09) aumentou durante estresse salino. Isto indica que houve aumento na geração de ROS, que então, oxidaram os ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) de membrana, gerando complexas misturas de lipídios hidroperóxidos (Mueller, 2004; Halliwell, 2006).

Evidências mostram que danos na membrana durante estresse salino estão relacionados a aumento na geração de ROS (Fadzilla et al., 1997; Gomez et al., 1999; Hernandez et al., 2000). A peroxidação lipídica também aumentou em folhas de milho (Neto et al., 2006) e de *S. indicum* (Koca et al., 2007) durante estresse salino.

A redução da taxa fotossintética (Fig. 05) de CB 47-89 e CB 45-3 associa-se ao aumento de ROS nestes genótipos. Uma vez que,  $Q_A$  reduzida ( $qP$ , Fig. 06) favorece a geração de oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) no PSII (Macpherson et al., 1993; Hideg et al., 1998, 2002; Fryer et al., 2002; Pospisil et al., 2004; Asada, 2006) e de superóxido ( $O_2^-$ ) no PSI (Foyer e Noctor, 2003; Pfannschmidt, 2003). A CuZn-superóxido desmutase (SOD) converte  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  (Asada, 1999), que por meio da reação de Fenton gera  $HO^-$  (Moller et al., 2007). Ambos  $^1O_2$  e  $HO^-$  são altamente reativos com AGPs na membrana do tilacóide (Mueller, 2004; Halliwell, 2006).

Neste cenário, além da redução na demanda de poder redutor, a peroxidação lipídica (Fig. 09) possivelmente, esteja interferindo indiretamente no fluxo linear de elétrons. Extensa peroxidação lipídica reduz a fluidez da membrana e causa danos secundários nas proteínas membranares (Halliwell e Gutteridge, 1999), desorganizando a cadeia transportadora de elétrons, conseqüentemente, diminuindo  $qP$  (Fig. 06) e aumentando NPQ (Fig. 08).

Além dos danos nas membranas celulares, ROS pode provocar danos na estrutura de algumas proteínas. Em folhas expostas à baixa temperatura, o HO<sup>-</sup> gerado na reação de Fenton, possivelmente provoque a degradação do PSI (Scheller e Haldrup, 2005), aumentando a concentração de Fe<sup>2+</sup> livre. Fe<sup>2+</sup> difunde da membrana do tilacóide para o estroma do cloroplasto podendo levar a geração de HO<sup>-</sup>, o qual pode atacar proteínas do estroma tais como a rubisco.

Nakano et al. (2006) verificaram que ROS provoca a degradação da rubisco, os dados sugerem o envolvimento de HO<sup>-</sup> e O<sub>2</sub><sup>-</sup>, e indicam que Fe<sup>2+</sup> participa da geração de ROS, por meio da reação de Fenton. Adicionalmente, a geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, provavelmente causa fragmentação da proteína D1 (Okada et al., 1996). Durante estresse por excesso de luz, a produção de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> aumenta drasticamente ocasionando a fotoinibição do PSII (Hideg et al., 2002).

Aumento no NPQ (Fig. 08) pode estar freqüentemente acoplado a fotoinativação dos centros de reação PSII (Melis, 1999). Porém, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> (Fig. 07) e F<sub>0</sub> (dado não mostrado) dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 não foram significativamente alterados pelo estresse salino, indicando que, apesar do aumento na peroxidação lipídica (Fig. 09), não houve fotoinativação.

Portanto, a peroxidação lipídica e a queda na demanda do poder redutor, e não a fotoinativação, podem estar colaborando para a desorganização e redução na atividade da cadeia transportadora de elétrons e concomitantemente, redução no qP (Fig. 06) e aumento do NPQ (Fig. 08) dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 tratados como NaCl.

Neste cenário, os genótipos CB 47-89 e CB 45-3 podem estar usando duas estratégias para proteger o aparelho fotossintético contra fotoinibição. Primeiro, aumentam a dissipação termal do excesso de energia na antena do PSII (Fig. 08). Segundo, o PSII pode transferir elétrons para vários aceptores dentro do cloroplasto (Ort e Baker, 2002). Durante a baixa disponibilidade de CO<sub>2</sub> dentro da folha (C<sub>i</sub>, Fig. 05), a redução de O<sub>2</sub> por PSI (Mehler, 1951) e a via fotorrespiratória podem desempenhar um essencial papel foto-protetor.

Por exemplo, a atividade oxigenase da rubisco de plantas C<sub>3</sub> constitui a principal alternativa para escape de elétrons. Assim, sustentando a parcial oxidação de Q<sub>A</sub> e prevenindo a fotoinativação do PSII, sob baixa concentração de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>, Fig. 05). Além da fotorrespiração, redução de oxigênio no PSI também sustenta os níveis de fluxo linear de elétrons. Cerca de 30% do total de elétrons

transportado pode estar envolvido na redução de  $O_2^-$  pela ascorbato peroxidase (Asada, 1999). Assim, ROS possivelmente esteja desempenhando papel foto-protetor nos genótipos CB 47-89 e CB 45-3 como alternativa de escape de elétrons.

O  $H_2O_2$  é gerado pela SOD (Asada, 1999) e pela atividade oxigenase da rubisco que aumenta o gliocolato, que ao ser oxidado pela glicolato oxidase gera  $H_2O_2$  (Apel e Hirt, 2004; Moller et al., 2007). Como sinalizador  $H_2O_2$  participa juntamente com ABA do fechamento estomático (Pei et al., 2000; Wang e Song, 2008). Além do possível papel foto-protetor de ROS, o  $H_2O_2$  pode estar contribuindo para redução da  $g_s$  (Fig. 05) dos genótipos CB 47-89 e CB 45-3. A drástica queda na  $g_s$  do genótipo CB 47-89 (Fig. 05), junto com o significativo aumento na peroxidação lipídica de folha (Fig. 09) sugerem um efeito aditivo entre ABA e geração de ROS, que culminou na queda da  $g_s$ . Esta é uma possível resposta adaptativa dos genótipos para evitar a perda de água durante o estresse salino.

Queda na  $g_s$ , mais do que meramente uma consequência negativa, pode representar um mecanismo adaptativo contra o excesso de sal (Flanagan e Jefferies, 1989; Clark et al., 1999). As halófitas *P. coronopus* (L.) (Koyro, 2006), *Beta vulgaris* ssp. *maritima* and *Spartina townsendii* toleram a salinidade combinando baixa  $P_n$ , mínima E, alta resistência estomática e mínimo  $C_i$  (Koyro, 2000, 2003). Esta estratégia tende a reduzir o sal translocado para o tecido foliar e ajuda a aumentar a longevidade, mantendo os sais em níveis subtóxicos, o que não ocorreria se E não reduzisse (Everard et al., 1994). Adicionalmente, o declínio na  $g_s$ , como mecanismo adaptativo, permite que a planta economize água e melhore a eficiência do uso de água (Chaves et al., 2009).

A significativa redução na peroxidação lipídica foliar após 48 horas em ambos os genótipos e o aumento nos tempos posteriores (Fig. 09), sugerem ativação do sistema de detoxificação. Entretanto, em milho a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) e glutathione redutase (GR) aumentou ao longo do tempo no tecido foliar tratado com NaCl (Neto et al., 2006), contrapondo-se à queda observada em 48 horas (Fig. 09).

O aumento da peroxidação lipídica após 48 horas em ambos os genótipos, sugere que ROS pode estar participando como sinalizador.

Geralmente observa-se que, a produção de ROS e seus danos aumentam durante estresses abióticos, sendo estas importantes moléculas sinalizadoras (Apel e Hirt, 2004; Foyer e Noctor, 2005; Gechev et al., 2006).

Diferentemente do genótipo CB 47-89 tratado com NaCl, CB 45-3 sofre aumento na peroxidação lipídica de raiz ao longo de 216 horas (Fig. 09), principalmente em 168 e 216 horas, que possuem respectivamente a primeira e segunda maior média. Isto sugere que, possivelmente, a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial das células radiculares do genótipo CB 45-3 esteja no estado de redução. Conseqüentemente, elevando a concentração de ROS ao longo do tempo, e assim, causando maiores danos nas membranas celulares.

Segundo Maxwell et al. (1999) e Moller (2001), nos tecidos não fotossintetizantes como a raiz, a principal fonte de ROS é a mitocôndria, geralmente pelo estado de redução da cadeia transportadora de elétrons, ocasionando a produção de  $O_2^-$ . Porém, a contribuição efetiva da mitocôndria para geração de ROS é baixa (Purvis, 1997). Devido à presença da alternativa oxidase (AOX), que compete com complexo citocromo  $bc_1$  pelos elétrons, reduzindo a produção de ROS. Dados mostram que  $H_2O_2$  induz a expressão de AOX (Wagner, 1995), e a super-expressão de AOX reduz a produção de ROS, adicionalmente células com reduzidos níveis de AOX acumulam cinco vezes mais ROS que células controle (Maxwell et al., 1999).

Além disso, os sistemas de detoxificação de ROS podem ser menos eficientes nas raízes de plantas CB 45-3 do que CB 47-89, ocasionando significativas alterações na peroxidação lipídica ao longo de 216 horas. Neto et al. (2006) observaram que, nas raízes de genótipo de milho tolerante à salinidade a atividade das enzimas catalase CAT e SOD diminuiu e das enzimas APX, GPX e GR permaneceu inalterada em comparação ao controle. Porém, nas raízes do genótipo sensível à salinidade, a atividade de todas as enzimas estudadas diminuiu. Entretanto, para confirmar a hipótese acima ensaios que avaliam a atividade cinética de enzimas antioxidantes seriam necessários.

## 7. RESUMO E CONCLUSÕES

O estresse salino afeta a taxa fotossintética dos genótipos de cana-de-açúcar estudados, por meio do fechamento estomático, restringindo assim, a difusão de CO<sub>2</sub>. Esta restrição, por sua vez, desequilibra a geração e demanda de poder redutor no ciclo de Calvin, reduzindo a atividade da cadeia transportadora de elétrons, conseqüentemente interferindo indiretamente no funcionamento do PSII. É possível inferir que um mecanismo de foto-proteção esteja atuando promovendo a dissipação térmica de energia e transferência de elétrons para O<sub>2</sub>, aumentando a geração de ROS.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado durante a redução dos fotossistemas e fotorrespiração, junto com ABA contribui para o fechamento estomático, evitando a perda de água. Sendo este um possível mecanismo adaptativo ao estresse salino em cana-de-açúcar. Apesar de afetar a taxa fotossintética, por meio do fechamento estomático, o estresse salino nos tempos avaliados, não alterou a biomassa de ambos os genótipos.

O genótipo CB 47-89 apresentou um melhor desempenho fotossintético e mostrou-se mais sensível ao estresse salino, conforme os dados de assimilação de carbono. Entretanto, mesmo apresentando as maiores quedas na taxa fotossintética sob estresse salino, o genótipo CB 47-89 ainda mostrou-se superior ao CB 45-3.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, W.W.III, Demmig-Adams, B. (2004) *Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment. In: Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Eds. Papageorgiou, G.C., Govindjee, 583–604p.
- Adams, W.W.III, Demmig-Adams, B. (2006) *Energy dissipation and photoinhibition: a continuum of photoprotection. In: Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment*. Eds. Demmig-Adams, B., WWAdams III, Mattoo, A.K., 49–64p.
- Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M., Murata, N. (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.*, 123:1047–1056.
- Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:373–399.
- Aro, E-M., Virgin, I., Anderson, B. (1994) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta*, 1143:113–134.
- Asada, K. (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50:601–639.
- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.*, 141:391–396.

- Baker, N.R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59:89—113.
- Berding, N., Roach, B.T. (1987) Germplasm collection, maintenance, and use. *In*: Heinz, D.J. (Eds.) (1987) *Sugarcane Improvement Through Breeding*. 143-210p.
- Bilger, W., Björkman, O. (1990) Role of the xanthophylls cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.*, 25:173–85.
- Björkman, O., Demming, B. (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 489-504.
- Blumwald, E. (2000) Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12:431-434.
- Bohnert, H.J., Gong, Q., Li, P., Ma, S. (2006) Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms—getting genomics going. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9:180–188.
- Bolh ar-Nordenkampf, H.R., Long, S.P., Baker, N.R.,  quist, G., Schreiber, U., Lechner, E. G. (1989) Chlorophyll *a* fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. *Funct. Ecol.*, 3:497-514.
- Bradbury, M., Baker, N.R. (1986) The kinetics of photoinhibition of the photosynthetic apparatus in pea chloroplasts. *Plant Cell Environ.*, 9:289–97.
- Bray, E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Tren. Plant Sci.*, 2: 48–54.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. (2000) Responses to abiotic stresses. *In*: Grisse, W., Buchanan, B., Jones, R. (Eds.) *Responses to Abiotic Stresses*, 1158–1249pp.
- Bresan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M. (1998) Plants use calcium to resolve salt stress. *Tren. Plant Sci.*, 3:411–412.
- Brugnoli, E., Bjorkman, O. (1992) Growth of cotton under continuous salinity stress: influence on allocation pattern, stomatal and nonstomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *Planta*, 187:335–347.

- Cesnik, R., Miocque, J. (2004). Melhoramento da cana-de-açúcar. *Embrapa Informação Tecnológica*. Brasília 24-49.
- Chauhan, S., Forsthoefel, N., Ran, Y., Quigley, F., Nelson, D.E., Bohnert, H.J. (2000) Na<sup>+</sup>/myo-inositol symporters and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiport in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.*, 24:511-522.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. of Bot.*, 103:551–560.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S. (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.*, 30:239–264.
- Cheng, N.H., Pittman, J.K., Zhu, J-K., Hirschi, K.D. (2004) The protein kinase SOS2 activates the *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/Ca<sup>+</sup> antiporter CAX1 to integrate Ca<sup>2+</sup> transport and salt tolerance. *J. Biol. Chem.*, 279:2922–2926.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu, J-K. (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *J. Exp. Bot.*, 55:225–236.
- Clark, H., Newton, P.C.D., Barker, D.J. (1999) Physiological and morphological responses to elevated CO<sub>2</sub> and a soil moisture deficit of temperate pasture species growing in an established plant community. *J. Exp. Bot.*, 50:233–242.
- D'Hont, A., Glaszmann, J.C. (2001) Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. *Proc. Int. Soc. Sugarcane Technol.*, 24:556-559.
- D'Hont, A., Ison, D., Alix, K., Roux, C., Glaszmann, J.C. (1998) Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome*, 41:221-225.
- Dalton, T.P., Shertzer, H.G., Puga, A. (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39:67–101.
- Daniels, J., Roach, B.T. (1987) Taxonomy and evolution. In: Heinz, D.J. (Eds.) (1987) *Sugarcane Improvement Through Breeding.*, 7-84p.

- del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B. (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol.*, 141:330–335.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S. (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*, 4:215–223.
- Demiral, T., Turkan, I. (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Env. Exp. Bot.*, 53:247–257.
- Dhindsa, R. S., Matowe, W. (1981). Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.*, 32:79–91.
- El-Hendawy, S.E., Hu, Y., Schmidhalter, U. (2005) Growth, ion content, gas exchange, and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerances. *Aust. J. Agric. Res.*, 56:123–134.
- Elstner, E.F. (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. *In: Pelland, E.J., Steffen, K.L. (Eds) (1991) Active Oxygen/Oxidative Stress in Plant Metabolism*, 13–25p.
- Everard, J.D., Gucci, R., Kahn, S.C., Flore, J.A., Loescher, W.H. (1994) Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiol.*, 106:281–292.
- Fadzilla, N.M., Finch, R.P., Burdon, R.H. (1997) Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *J. Exp. Bot.*, 48:325–331.
- FAO (Food Agriculture Organization) (2009a) *FAO Land and Plant Nutrition Management Service*. Disponível on-line: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>. Acesso em 26/02/2009.
- FAO (Food Agriculture Organization) (2009b) Disponível on-line: [fausta.fao.org](http://fausta.fao.org). Acesso em 26/02/2009.
- Flanagan, L.B., Jefferies, R.L. (1989) Effect of increased salinity of carbon dioxide assimilation, oxygen evolution and the isotopic ratio values of leaves of *Plantago maritima* L. developed at low and high sodium chloride. *Planta*, 178: 377–384.

- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, T.D. (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biol.*, 6:269–279.
- Flexas, J., Diaz-Espejo, A., Galmés, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H., Ribas-Carbo, M. (2007) Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO<sub>2</sub> concentration around leaves. *Plant, Cell & Env.*, 30:1284–1298.
- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Bota, J., Galmés, J., Henkle, M., Martínez-Cañellas, S., et al. (2006) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytol.*, 172:73–82.
- Flowers, T.J., Troke, P.F., Yeo, A.R. (1977) The mechanisms of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 28:89–121.
- Ford, C.W. (1984) Accumulation of low molecular weight solutes in water stress tropical legumes. *Phytochemistry*, 22:875–884.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytol.*, 146:359–388.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.*, 119:355–364.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: A re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.*, 28:1056–1071.
- Fryer, M.J., Andrews, J.R., Oxborough, K., Blowers, D.A., Baker, N.R. (1998) Relationship between CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthetic electron transport and active O<sub>2</sub> metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol.*, 116:571–80
- Fryer, M.J., Oxborough, K., Mullineaux, P.M., Baker, N.R. (2002) Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *J. Exp. Bot.*, 53:1249–1254.
- Galmés, J., Medrano, H., Flexas, J. (2007) Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytol.*, 175:81–93.

- Gandonou, C.B., Errabii, T., Abrini, J., Idaomar, M., Senhaji, N.S. (2006) Selection of callus cultures of sugarcane (*Saccharum* sp.) tolerant to NaCl and their response to salt tolerance. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 87:9–16.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I., Laloi, C. (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays.*, 28:1091–1101.
- Genty, B., Briantais, J-M., Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 990:87–92.
- Girotti, A.W. (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol.*, 63:103–113.
- Goldemberg, J. (2007) Ethanol for a sustainable energy future. *Science*, 315:808-810.
- Gomez, J.M., Hernandez, J.A., Jimenez, A., del Rio, L.A., Sevilla, F. (1999) Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long term NaCl stress of pea plants. *Free. Rad. Res.*, 31:S11–S18.
- Gorham, J., Wyn Jones, R.G., Bristol, A. (1990) Partial characterization of the trait for enhanced  $K^+$ - $Na^+$  discrimination in the genome of wheat. *Planta*, 180: 590–597.
- Greenway, H., Munns, R. (1980) Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31:149–190.
- Grennan, A.K. (2006) Abiotic Stress in Rice. An “Omic” Approach. *Plant Physiol.*, 140:1139-1141.
- Grivet, L., D’Hont, A., Roques, D., Feldmann, P., Lanaud, C., Glaszmann, J.C. (1996) RFLP mapping in cultivated sugarcane (*Saccharum* spp): genome organization in a highly polyploid and aneuploid interspecific hybrid. *Genetics*, 142:987-1000.
- Ha, S., Moore, P.H., Heinz, D., Kato, S., Ohmido, N., Fukui, K. (1999) Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor

- fluorescence *in situ* hybridization and imaging methods. *Plant Mol. Biol.*, 39:1165-1173.
- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.*, 141:312–322.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford Univ. Press. 3rd eEd.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J-K., Bohnert, H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51:463–499.
- Hendre, R.R., Iyor, R.S., Kotwalm, M., Kluspe, S.S., Mascarenhas, A.F. (1983). Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture. *Sugarcane*, 1: 5-8.
- Hernandez, J.A., Jimenez, J., Mullineaux, P., Sevilla, F. (2000) Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long term stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ.*, 23:853–862.
- Hideg, É., Barta, C., Kalai, T., Vass, I., Hideg, K., Asada, K. (2002) Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photo inhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiol.*, 43:1154–1164.
- Hideg, É., Kalai, T., Hideg, K., Vass, I. (1998) Photoinhibition of photosynthesis *in vivo* results in singlet oxygen production. Detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves. *Biochemistry*, 37:11405–11411.
- IBGE (2007). *Produção Agrícola Municipal 2005*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15/10/07.
- IBGE (2009). *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 08/01/09.
- Jain, M., Mathur, G., Koul, S., Sarin, N.B. (2001) Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Plant Cell Rep.*, 20:463–468.
- Jones, H.G., Jones, M.B. (1989) Introduction: some terminology and common mechanisms. In: Jones, H.G., Flowers, T.J., Jones, M.B. (Eds.) *Plants Under Stress*. Cambridge University Press, Cambridge, 1-10pp.

- Kao, W.-Y., Tsai, T.-T., Tsai, H.-C., Shih, C.-N. (2006) Response of three *Glycine* species to salt stress. *Env. Exp. Bot.*, 56:120-125.
- Kautsky, H., Appel, W., Amann, H. (1960) Chlorophyllfluoreszenz und kohlenzureassimilation. *Biochemische Zeitschrift*, 322: 277-292.
- Khan, M.H., Panda, S.K. (2008) Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiol. Plant*, 30:81–89.
- Knight, H., Trethewey, A.J., Knight, M.R. (1997) Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant J.*, 12:1067–1078.
- Koca, H., Bor, M., Özdemir, F., Türkan, I. (2007) The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Env. Exp. Bot.*, 60:344–351.
- Koyro, H-W. (2000) Effect of high NaCl-salinity on plant growth, leaf morphology, and ion composition in leaf tissues of *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. *J. Appl. Bot.*, 74:67–73.
- Koyro, H-W. (2003) Study of potential cash crop halophytes in a quick check system task. *Veg. Sci.*, 38:5–17.
- Koyro, H-W. (2006) Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). *Env. Exp. Bot.*, 56:136–146.
- Kramer, D.M., Johnson, G., Kierats, O., Edwards, G.E. (2004) New fluorescence parameters for determination of  $Q_A$  redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth. Res.*, 79:209–218.
- Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H-S., Zhu, T., Wang, X., Harper, J.F. (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.*, 130:2129-2141.
- Lawlor, D.W., Cornic, G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Env.*, 25:275–294.

- Lee, K.S., Choi, W.Y., Ko, J.C., Kim, T.S., Gregorio, G.B. (2003) Salinity tolerance of japonica and indica rice (*Oryza sativa* L.) at the seedling stage. *Planta*, 216: 1043–1046.
- Lima, G. A. (1984). *Cultura da cana-de-açúcar*. 1ª edição. Fortaleza 15-35.
- López-Climent, M.F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R.M., Gómez-Cadenas, A. (2008) Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Env. Exp. Bot.*, 62:176-184.
- Louis, P., Galinski, E.A. (1997) Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *E. coli*. *Microbiology*, 143:1141-1149.
- Lu, C., Qiu, N., Wang, B., Zhang, J. (2003) Salinity treatment shows no effects on photosystem II photochemistry, but increases the resistance of photosystem II to heat stress in halophyte *Suaeda salsa*. *J. Exp. Bot.*, 54:851-860.
- Ma, S., Gong, Q., Bohnert, H.J. (2006) Dissecting salt stress pathways. *J. Exp. Bot.*, 57:1097-1107.
- Maathuis, F.J.M., Ichida, A.M., Sanders, D., Schroeder, J.I. (1997) Roles of higher plant K<sup>+</sup> channels. *Plant Physiol.*, 114:1141-1149.
- Macpherson, A.N., Telfer, A., Barber, J., Truscott, T.G. (1993) Direct detection of singlet oxygen from isolated photosystem II reaction centres. *Biochim. Biophys. Acta*, 1143:301–309.
- Mahajan, S., Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stress: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444:139-158.
- Mandhania, S., Madan, S., Sawhney, V. (2006) Antioxidant defense mechanism under salt stress in wheat seedlings. *Biol. Plant.*, 227:227–231.
- Maxwell, D.P., Wang, Y., McIntosh, L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:8271–8276.
- Maxwell, K, Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51:659-668.

- Mehler, A.H. (1951) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 33:339–351.
- Melis, A. (1999) Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci.*, 4:130–135.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J. (2003) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under sal stress. *Env. Exp. Bot.*, 49:69-76.
- Meyer, S., Genty, B. (1998) Mapping intercellular CO<sub>2</sub> mole fraction (C<sub>i</sub>) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging: significance of C<sub>i</sub> estimated from leaf gas exchange. *Plant Physiol.*, 116:947–957.
- Miao, Y.C., Song, C-P., Dong, F.C., Wang, X.C. (2000). ABA-induced hydrogen peroxide generation in guard cells of *Vicia faba*. *Acta Phytophysiologica Sinica* 26: 53–58 (in Chinese).
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Tren. Plant Sci.*, 9:490–498.
- Moller, I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52:561–591.
- Moller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58:459–481.
- Moradi, F., 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*, 99:1161–1173.
- Mouget, J., Tremblin, G. (2002) Suitability of the fluorescence monitoring system (FM, Hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. *Aquatic Botany*, 74:219-231.
- Mueller, M.J. (2004) Archetype signals in plants: The phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7:441–448.

- Munns R, James RA, Laüchli A (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.*, 57: 1025–1043.
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Env.*, 25: 239–250.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., Hirt, H. (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Tren. in Plant Sci.*, 10: 339-346.
- Nakano, R., Ishida, H., Makino, A., Mae, T. (2006) *In vivo* fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. *Plant Cell Physiol.*, 47:270–276.
- NCBI (2009). Taxonomia da cana-de-açúcar. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=128810&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Acesso em: 26/02/09.
- Ndayiragije, A., Lutts, S. (2006) Do exogenous polyanines have an impact on the response of a salt-sensitive rice cultivar to NaCl? *J. Plant Physiol.*, 163:506-516.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T. (2002b) Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 388–395.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., Hancock, J.T. (2002a) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.*, 53: 1237–1247.
- Neto, A.D.A., Prisco, J.T., Enéas-Filho, J., Abreu, C.E.B., Enéas, G-F. (2006) Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Env. Exp. Bot.*, 56:87-94.
- Netondo, G.W., Onyango, J.C., Beck, E. (2004) Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Sci.*, 44:806-811.

- Niu, X., Zhu, J-K., Narasimham, M.L., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (1995) Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression is regulated by NaCl in halophyte (*Atriplex nummularia* L.) cell cultures. *Planta*, 190:433-438.
- Okada, K., Ikeuchi, M., Yamamoto, N., Ono, T., Miyao, M. (1996) Selective and specific cleavage of the D1 and D2 proteins of photosystem II by exposure to singlet oxygen: factors responsible for the cleavage of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1274:73–79.
- Ort, D.R. (2001) When there is too much light. *Plant Physio.*, 125:29–32.
- Ort, R.D., Baker, N.R. (2002) A photoprotective role for O<sub>2</sub> as an alternative electronic sink in photosynthesis? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5:193–198.
- Osmond, C.B. (1994) *What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants.* In: Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to the Field. Eds. Baker, N.R., Bowyer, J.R., 1–24p.
- Oxborough, K., Baker, N.R. (1997) Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and nonphotochemical components—calculation of qP and F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> without measuring F<sub>o</sub>. *Photosynth. Res.*, 54:135–142.
- Parida, A.K., Das, A.B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecot. Env. Saf.*, 60:324-349.
- Patade, V.Y., Suprasanna, P., Bapat, V.A. (2008) Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. *Plant Growth Regul.*, 55:169–173.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schroeder, J.I. (2000) Calcium channels activated by hydrogenperoxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406:731–734.
- Pfannschmidt, T. (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science*, 8:33–41.
- Pospisil, P., Arato, A., Krieger-Liszskay, A., Rutherford, A.W. (2004) Hydroxyl radical generation by photosystem II. *Biochemistry*, 43:6783–6792.

- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R. (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell.*, 6:65–74.
- Purvis, A.C. (1997) Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol. Plant.*, 100:165–170.
- Qiu, Q.S., Guo, Y., Dietrich, M.A., Schumaker, K.S., Zhu, J-K. (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:8436-8441.
- Quick, W.P., Horton, P. (1984) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplasts, I. Factors affecting the observation of oscillations in the yield of chlorophyll fluorescence and the rate of oxygen evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 220:361-370.
- Quintero, F.J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J-K., Pardo, J.M. (2002) Reconstitution in yeast of the Arabidopsis SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:9061-9066.
- Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses. *Plant Physiol.*, 133:1755–1767.
- Rebeiz, C.A., Montazer-Zouhour, A., Mayasich, J.M., Tripathy, B.C., Wu, S-M., Rebeiz, C. (1988) Photodynamic herbicides. Recent developments and molecular basis of selectivity. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.*, 6:385–436.
- Rocha, F.R., Papini-Terzi, F.S., Nishiyama Jr, M.Y., Vêncio, R.Z.N., Vicentini, R., Duarte, R.D.C, Rosa Jr, V.E., Vinagre, F., Barsalobres, C., Medeiros, A.H., Rodrigues, F.A., Ulian, E.C., Zingaretti, S.M., Galbiatti, J.A., Almeida, R.S., Figueira, A.V.O., Hemerly, A.S., Silva-Filho, M.S., Menossi, M., Souza, G.M. (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics*, 8:71-93.
- Rodriguez-Navarro, A. (2000) Potassium transport in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta*, 1469:1-30.

- Rosillo-Calle, F., Cortez, L.A.B. (1998) Towards ProAlcool II—a review of the Brazilian bioethanol programme. *Biomass and Bioenergy*, 14:115-124.
- Rozeff, N. (1995) Sugarcane and salinity—a review paper. *Sugarcane*, 5:8-19.
- Sahi, C., Singh, A., Kumar, K., Blumwald, E., Grover, A. (2006) Salt stress response in rice: genetics, molecular biology, and comparative genomics. *Funct. Integr. Genomics* 6:263–284.
- Sanchez-Barrena, M.J., Martinez-Ripoll, M., Zhu, J-K., Albert, A. (2005) The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for salt stress response. *J. Mol. Biol.*, 345: 1253–1264.
- Scheller, H.V., Haldrup, A. (2005) Photoinhibition of photosystem I. *Planta*, 221:5–8.
- Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. (1994) Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D., Caldwell, M.M. (eds.) *Ecophysiology of photosynthesis*. New York: Springer Verlag, p. 49-70.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J.M., Waner, D. (2001) Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52: 627–658.
- Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Márquez, J.A., de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Proft, M., Ros, R., Montesinos, C. (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.*, 50:1023-1036.
- Serrano, R., Rodriguez-Navarro, A. (2001) Ion homeostasis during salt stress in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13:399-404.
- Shao, H.B., Guo, Q.J., Chu, L.Y., Zhao, X.N., Su, Z.L., Hu, Y.C., Cheng, J.F. (2007) Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54: 37-45.
- Shi, H., Lee, B.H., Wu, S.J., Zhu, J-K. (2003) Overexpression of a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.*, 21:81-85.

- Sreenivasan, T.V., Ahloowalia, B.S., Heinz, D.J. (1987) Cytogenetics. In: Heinz, D.J. (Eds.) (1987) *Sugarcane Improvement Through Breeding*, 211-253p.
- Sreenivasulu, N., Sopory, S.K., Kavi Kishor, P.B. (2007) Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene*, 388:1–13.
- Szabo, I., Bergantino, E., Giacometti, G.M. (2005) Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation. *Embo Reports*, 6:629–634.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2004) *Fisiologia vegetal*. Tradução de Eliane Romanato Santarém et al. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.
- Tejera, N., Ortega, E., Rodes, R., Liuch, C. (2006). Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: some implications in the association with endophytes. *J. Plant Physiol.*, 163:80-85.
- Tezara, W., Mitchell, V.J., Driscoll, S.D., Lawlor, D.W. (1999) Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401:914–917.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8:397–403.
- Tsugane, K., Kobayashi, K., Niwa, Y., Ohba, Y., Wada, K., Kobayashi, H. (1999) A recessive *Arabidopsis* mutant that grows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell.*, 11:1195–1206.
- Unica (2009). Qual a dimensão da cana-de-açúcar no Brasil e no mundo? União da Indústria de Cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br/FAQ>. Acesso em: 01/01/2009.
- Van Kooten, O., Snell, J.F.H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.*, 25:147-150.
- Wagner, A.M. (1995) A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett.*, 368:339–342.

- Wagner, D., Przybyla, D., op den Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, K.P., Wüsch, M., Laloi, C., Nater, M., Hideg, E., Apel, K. (2004) The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 306:1183–1185.
- Wang, P., Song, C-P. (2008) Guard-cell signaling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytologist*, 178:703-718.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218:1-14.
- West, G., Inzé, D., Beemster, G.T.S. (2004) Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiol.*, 135:1050-1058.
- Wilkinson, S., Davies, W.J. (2002) ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell & Env.*, 25:195–210.
- Wiseman, H., Halliwell, B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, 313:17–29.
- Yoshida, T. (1975). Microbial metabolism of flooded soil. *Soil Biochemistry*, 3:83-122.
- Zhang, X., Dong, F.C., Gao, J.F., Song, C-P. (2001) Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure. *Cell Research*, 11:37–43.
- Zhao, F., Song, C-P., He, J., Zhu, H. (2007a) Polyamines improve  $K^+/Na^+$  homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. *Plant Physiol.*, 145:1061-1072.
- Zhao, G.Q., Ma, B. L., Ren, C. Z. (2007b) Growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, and ion content of naked oat in response to salinity. *Crop Sci.*, 44:806-811.
- Zhu, J-K. (2001) Plant salt tolerance. *Tren. Plant Sci.*, 6:66-71.
- Zhu, J-K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 53:247–273.

- Zhu, J-K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opi. in Plant Biol.*, 6:441-445.
- Zhu, J-K., Liu, J., Xiong, L. (1998) Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell*, 10:1181–1191.