



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIA TUFINO SILVA GUERZONI

**“AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO DE
PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRANSFORMADAS COM
O GENE P5CS”**

JULIA TUFINO SILVA GUERZONI

**“AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO DE
PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRANSFORMADAS COM
O GENE P5CS”**

Dissertação apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: D^{ro.} Luiz Gonzaga Esteves Vieira

Londrina
2010

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G935a Guerzoni, Julia Tufino Silva.

Avaliação da tolerância ao estresse salino de plantas de cana-de-açúcar transformadas com o gene P5CS / Julia Tufino Silva Gerzoni. – Londrina, 2010.
82 f. : il.

Orientador: Luiz Conzaga Esteves Vieira.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Cana-de-açúcar – Melhoramento genético - Teses. 2. Plantas – Efeito do sal - Teses. 3. Plantas – Aminoácidos – Teses. 4. Plantas transgênicas Teses 5. Solos – Salinidade – Teses. 6. Prolina – Teses. I. Vieira, Luiz Gonzaga Esteves. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular III. Instituto Agrônômico do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 631.52:633.61

JULIA TUFINO SILVA GUERZONI

**“AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO DE
PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR TRANSFORMADAS COM O GENE
P5CS”**

Dissertação apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Luiz Gonzaga Esteves Vieira
IAPAR – Londrina - PR

Prof. Dr. Luiz Filipe Protasio Pereira
EMBRAPA – Londrina - PR

Prof. Dr. João Carlos Bepalhok Filho
UFPR – Londrina - PR

Londrina, 19 de março de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Nilson e Jussara. Ao meu marido Eduardo. E ao meu irmão Lucas que sempre estará comigo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Virgem Maria.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Programa de Pós-graduação Mestrado em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade concedida para a realização do curso. A Sueli Trindade Miranda pela disposição em esclarecer todas as dúvidas em relação ao curso de mestrado no decorrer destes dois anos.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), pela oportunidade concedida para a realização da minha dissertação de mestrado.

A RIDESA pela concessão da Bolsa, e a todos os professores Edelclaiton Daros, José Luiz Camargo Zambom, Paulo Afonso Graciano e Heroldo Weber por terem me apoiado na continuação da minha formação acadêmica. E ao professor João Carlos Bespalhok Filho por ter acompanhado diretamente o meu trabalho.

Ao orientador Prof. Dr. Luiz Gonzaga, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR, pelos ensinamentos, orientação, paciência e amizade durante toda a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Filipe que sempre esteve disposto a me ajudar e a esclarecer as dúvidas, dar sugestões e apoiar o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Dr. Celso Jamil Marur e ao Dr. Fábio S. de Souza pelas contribuições e disposição para fazer as coletas das análises fisiológicas durante o período do experimento, e pela incansável espera para que o sol aparecesse.

Aos amigos do LBI, que em todos os momentos me ajudaram de uma forma direta ou indireta no desenvolvimento do meu trabalho, seja com a concessão de materiais, uma mãozinha na realização dos trabalhos ou através de muitas risadas. Em especial a Gislaine, Sandra, Thiago e Lucia que colaboram diretamente para minhas análises.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecido, Sueli, Sr. João Batista, Fátima, Lucinéia, Cícera, por terem me acolhido no laboratório, pela ajuda, esclarecimento das minhas dúvidas e a amizade.

Em especial à minha grande amiga parceira de todas as horas Nathalia Belintani, que sempre esteve ao meu lado aprendendo, ensinado, sofrendo, vibrando com todos os resultados do meu projeto de dissertação e da minha vida.

À professora e amiga Dra Rosangela que não só me ajudou no ingresso ao curso de mestrado, como nas disciplinas do curso, como também me ajudou nas minhas análises, sempre me apoiando e torcendo por todo o meu trabalho e sucesso profissional.

Aos amigos do curso de mestrado pela boa amizade durante este tempo de convivência. Aos meus grandes amigos Adolfo e Camila, Franco e Claudinha, Thiago e Cecília, Renato e Mirian, Marcos e Renata, Roberto e Marta, Rodrigo e Lu, Fabrício, Gabriel e Camila, Carol e Gustavo, enfim por vocês estarem todos os finais de semana comigo, dando força para eu continuar o meu trabalho durante a semana.

Aos meu pais que sempre acreditaram em mim, me apoiaram em todas as minhas decisões e foram os primeiros a me incentivarem a fazer este curso. Pela minha nova família Sogro, Sogra e cunhados que sempre torcem por mim.

Ao meu marido Eduardo que teve que agüentar as minhas irritações e meu mau humor, pelo carinho amor e companheirismo nestes dias. E obrigada por sempre acreditar que eu seria capaz de chegar lá. A todos que deram sua parcela de contribuição para que este trabalho se realizasse.

Muito Obrigada

GUERZONI, Julia Tufino Silva. “**Avaliação da tolerância ao estresse salino de plantas de cana-de-açúcar transformadas com o gene p5cs**”. 2010 82 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, 2010.

RESUMO

A salinidade pode interferir na produção de cana-de-açúcar de duas maneiras: afetando o crescimento e o rendimento, como também reduzindo a concentração de sacarose no colmo. Plantas submetidas ao estresse salino podem acumular compostos orgânicos não tóxicos de baixo peso molecular, coletivamente conhecido como solutos ou osmólitos compatíveis, tais como a prolina, a qual pode atuar como um osmólito citoplasmático neutralizando o efeito do acúmulo de sal no vacúolo e como removedora de espécies reativas de oxigênio (ROS). Altos níveis de prolina permitem que as plantas mantenham crescimento em altas concentrações salinas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta ao estresse salino de plantas de cana-de-açúcar RB855156 transformadas com o gene *P5CS*, que codifica a enzima Δ 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase limitante na biossíntese de prolina em plantas, sob controle do promotor estresse induzido AIPC (ABA inducible promoter complex). Foram utilizados dois eventos de transformação obtidos através de bombardeamento de partículas utilizando o gene marcador de seleção *bar*. O ensaio de resistência ao estresse salino foi conduzido em plantas de cana-de-açúcar com quatro meses de idade. As plantas foram irrigadas a cada dois dias com 600 ml de solução de Hoagland diluída 1/10X e suplementada com doses de 100 mM, 150 mM e 200 mM de NaCl. No final do experimento as plantas transgênicas apresentaram em média 25% mais prolina livre nas folhas comparadas as plantas controles. Diferenças na peroxidação de lipídios nas folhas entre plantas transgênicas e controles foram observadas nos dias 9 e 18 sob estresse salino, os níveis de MDA nas plantas controle foram em média 16% maior do que nas plantas transgênicas. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a prolina contribuiu para o melhor desenvolvimento de plantas transgênicas com *P5CS* de cana-de-açúcar sob condições de estresse salino devido ao menor acúmulo de Na^+ nas folhas, proteção do aparelho fotossintético e capacidade de evitar danos oxidativos.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. Prolina. Tolerância à salinidade.

GUERZONI, Julia Tufino Silva. “**Evaluation of salt tolerance of plants to sugar cane transformed with the gene p5cs**”. 2010 82 f. Dissertation (Mester’s degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, 2010.

ABSTRACT

Salinity may interfere with sugarcane crop yield by affecting both growth and yield, as well as reducing the concentration of sucrose in the culms. Plants submitted to salt stress can accumulate non-toxic organic components of low molecular weight, collectively known as compatible solutes or osmolytes, such as proline, which may act as a cytoplasmic osmolyte, neutralizing the effect of the salt accumulation in the vacuole and as a reactive oxygen species (ROS) scavenger. High levels of proline might allow the plants to maintain their growth under high salt concentrations. The goal of this study was to evaluate the response to salt stress of sugarcane plants cv. RB855156 transformed with the *P5CS* gene, which encodes Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, the limiting enzyme of the proline biosynthesis pathway, under the control of stress-induced promoter *AIPC* (*ABA inducible promoter complex*). For this, two transformation events obtained by particle bombardment using the marker gene *bar* for selection were analyzed. Four-month-old sugar cane plants were watered every two days with 600 ml of 1/10X Hoagland solution and supplemented with 100 mM, 150 mM and 200 mM NaCl progressively. At the end of the experiment transgenic plants presented up to 25% more free proline in the leaves in comparison to control plants. Differences in lipid peroxidation in the leaves between transgenic and untransformed control plants were observed on the 9th and 18th day under salt stress, with the levels of MDA in control plants 16% higher than in transgenic plants. The results presented here suggest that proline contributed to the improved development of *P5CS* transgenic sugarcane under salt stress due to lower Na⁺ accumulation in leaves, protection of the photosynthetic apparatus and the ability to prevent oxidative damage.

Keywords: *Saccharum spp.* Proline. Tolerance to salinity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Três aspectos de tolerância à salinidade em plantas (homeostase, detoxificação e controle do crescimento) e os caminhos que os interligam; a homeostase é dividida em iônica e osmótica. A via SOS (Salt Overly Sensitive) é mediata pela homeostase iônica e tolerância ao Na^+ . Uma proteína ativa da cascata (MAPK), semelhante à via HOG1 de levedura, media a homeostase osmótica. Os dois estresses primários (iônico e osmótico) causam danos ou levam ao estresse secundário como a oxidação. Proteínas do estresse tais como RD29A, podem ajudar na detoxificação e na redução de danos. Os fatores de transcrição tais como CBF/DREB que media a expressão de alguns genes de proteínas do estresse em resposta ao estresse secundário causado por alta concentração de sal, frio, seca ou acido abscisico (ABA). A homeostase iônica e osmótica, e a via de detoxificação são propostas para manter ativa a divisão celular e a regulação da expansão para o controle do crescimento das plantas (Zhu, 2001)27
- Figura 2** – Vias de sinalização que regulam a expressão é atividade dos transportadores de íon para manter uma baixa concentração de Na no citoplasma sob estresse salino. Na^+ excessivo e hiperosmolaridade são percebidos por sensores desconhecidos. A hiperosmolaridade sugere que induz a síntese de ABA, no qual torna um regulador da transcrição de *AtNHX1* e outros genes transportadores de íon. O potencial negativo regulado pelo *AtHKT1* por SOS3-SOS2 e o AKT pelo Na intracelular é mostrado pelas linhas pontilhadas (Zhu, 2003).31
- Figura 3** – Biossíntese de prolina em plantas superiores via glutamato (Zhang et al.,1995).....33

- Figura 4** – Esquema do cassete inserido no vetor pBY505 (Wang e Wu, 1995) originando o plasmídeo pJS107 (Su et al., 1997). O cassete contém o complexo promotor artificial AIPC fusionado ao gene *P5CS* que codifica para biossíntese da prolina. E o promotor constitutivo *CaMV 35S* fusionado ao gene marcador de seleção de gufosinato de amônio, *bar*.39
- Figura 5** – Esquema do experimento com estresse salino. Os dias correspondem aos pontos de coleta das amostras.....40
- Figura 6** – Plantas de cana-de-açúcar – A - Brotação nas primeiras semanas; B - Folhas após 28 dias de estresse salino; C - Raízes após 28 dias de estresse salino; D - Altura das plantas de cana-de-açúcar dos eventos transgênicos e controle após 28 dias de estresse salino. As setas e as barras indicam a diferença de altura das plantas.....46
- Figura 7** – Concentração de prolina em plantas controle e transgênicas submetidas a 28 dias de estresse salino. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio. Valores seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre si dentro do mesmo dia do estresse. Valores seguidos pela letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre os diferentes dias de estresse47
- Figura 8** – Conteúdo de malondialdeído (MDA) em plantas controle e transgênicas submetidas a 28 dias de estresse salino. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio. Valores seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre si dentro do mesmo dia do estresse. Valores seguidos pela letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre os diferentes dias de estresse48
- Figura 9** – Rendimento fotoquímico (F_v/F_m) em plantas controle e transgênicas submetidas a 28 dias de estresse salino. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio.

	Valores seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre si dentro do mesmo dia do estresse. Valores seguidos pela letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre os diferentes dias de estresse. Coeficientes de variação = 24,5%.....	49
Figura 10	– A - Condutância estomática, B - Fotossíntese e C - Transpiração em plantas controle e transgênicas de cana-de-açúcar submetida a 28 dias de estresse salino. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio. Valores seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre si dentro do mesmo dia e entre os diferentes dias de estresse.....	51
Figura 11	– A - potencial total da água e B - potencial osmótico em plantas controle e transgênicas de cana-de-açúcar submetidas a 28 dias de estresse salino. Potenciais expressos em mega pascal (MPa). Os valores são apresentados com média das repetições \pm desvio médio (Tukey; $p < 0,05$). Coeficientes de variação = 15,1% e 22,8%.....	53
Figura 12	– Efeito do tratamento com salinidade após 28 dias de estresse das concentrações de A - potássio nas raízes; B - potássio nas folhas; C - sódio nas raízes; D - sódio nas folhas, em plantas controles e transgênicas. Quantidades expressas em mg.g-1. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Coeficiente de variação: 11,36%, 14,25%, 24,96% e 25,35% respectivamente.....	54
Figura 13	– Massa seca em gramas das folhas de cana-de-açúcar em plantas controle e transgênicas. Os valores são apresentados com média das repetições \pm desvio médio. Valores seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido Abscísico
AIPC	<i>ABA inducible promoter complex</i>
Brix	Sólidos solúveis totais
Ca⁺	Cálcio
CE	Condutividade elétrica
Cl⁻	Cloro
dS/m	Decis siemes por metro
Fv/Fm	Rendimento fotoquímico
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
K⁺	Potássio
MDA	Conteúdo de malondialdeído
mM	Mili molar
MPa	Mega pascal
Na⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
O⁻²	Superoxido
OH	Radicais de hidróxido
P5C	Δ 1-pirrolina-5-carboxilato
P5CR	Δ 1-pirrolina-5-carboxilato redutase
P5CS	Δ 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase
Pol	Teor de sacarose
ProDH	Prolina desidrogenase
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SOS	<i>Salt overly sensitive</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Ψ_s	Potencial osmótico
Ψ_t	Potencial total da água

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	CANA-DE-AÇÚCAR NO MUNDO E NO BRASIL	17
2.2	CANA-DE-AÇÚCAR	18
2.3	EFEITOS CAUSADOS NAS PLANTAS PELO ESTRESSE SALINO	21
2.4	ASPECTOS DA TOLERÂNCIA DAS PLANTAS À SALINIDADE	24
2.5	REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE IÔNICA	30
2.6	PROLINA, P5CS E AIPC	32
2.7	SALINIDADE NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR	36
2.8	ENGENHARIA GENÉTICA PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	ENSAIO DE RESISTÊNCIA AO ESTRESSE SALINO	39
3.2	DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROLINA	40
3.3	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE MALONDIALDEÍDO (MDA)	41
3.4	DETERMINAÇÃO DA TAXA DE FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA	42
3.5	DETERMINAÇÃO DA TAXA DE FOTOSÍNTESE, TRANSPIRAÇÃO E CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA	42
3.6	POTENCIAL DA ÁGUA E POTENCIAL OSMÓTICO	43
3.7	DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE SÓDIO E POTÁSSIO	43
3.8	DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA TOTAL DAS FOLHAS	43
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4	RESULTADOS	45
4.1	ENSAIO DE TOLERÂNCIA A SALINIDADE	46
4.1.1	Prolina	46
4.1.2	Conteúdo de Malondialdeído (MDA)	47
4.1.3	Fluorescência de Clorofila (F_v/F_m)	48
4.1.4	Condutância Estomática, Fotossíntese Líquida e Transpiração	49
4.1.5	Relações Hídricas nas Folhas	52

4.1.6	Concentração de Potássio e Sódio nas Folhas e Raízes.....	53
4.1.7	Massa Seca de Folhas de Cana-de-Açúcar	54
5	DISCUSSÃO	56
	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

A agroindústria sucroenergética constitui um dos setores do agronegócio mais importantes para a economia primária brasileira. O açúcar e o etanol, como fonte alimentícia e energética, têm historicamente importância mundial. A cana-de-açúcar se apresenta com uma *commodity* ambiental por ser uma fonte de energia renovável, sendo o etanol um combustível menos poluente e o açúcar um dos principais produtos de exportação do país. O Brasil é o maior produtor mundial e na safra de 2009, colheu cerca de 570 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (Alcopar, 2010).

As principais regiões de cultivo no país são sul, sudeste, centro-oeste, e nordeste. Na região sul, no Paraná, a cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas, sendo cultivada principalmente na região norte e noroeste do estado. É o segundo produtor nacional com produção na safra 2008/2009 de 44 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, possui vinte e duas usinas e oito destilarias, com impacto econômico sobre 126 municípios, onde são proporcionados 74 mil empregos diretos (Alcopar, 2010). No nordeste do Brasil a cana-de-açúcar também é um dos principais produtos agrícolas. Na safra de 2008/2009 estima-se que a produção de cana será de 63,9 milhões de toneladas, com produtividade média de 63 toneladas/hectare, obtidas em 1,16 milhões de hectares cultivados, totalizando 4,28 milhões de toneladas de açúcar, que corresponde a 13,69% da produção nacional, e 1,76 bilhões de litros de etanol, participando de 8,80% da produção brasileira (Conab, 2009).

A salinidade causa grandes prejuízos aos agricultores em diferentes regiões do mundo. A ocorrência de solos salinos é comum nas regiões áridas e semi-áridas em razão da baixa precipitação pluvial e alta taxa de evaporação. Nestas circunstâncias, os sais não são lixiviados, acumulando-se em quantidades prejudiciais ao crescimento normal das plantas. A agricultura intensiva e as práticas inadequadas de manejo da água tem causado uma salinização substancial de áreas agrícolas. Na América do Sul o total de área salina é de 129 milhões de hectares, segundo Rengasamy (2006). De acordo com Pereira (1983), os solos afetados por sais ocupam uma área de aproximadamente 9,1 milhões de hectares no nordeste brasileiro, espalhados em áreas de cultivo de cana-de-açúcar.

A salinidade afeta o crescimento das plantas pelo estresse osmótico como também pela toxicidade causada pelo acúmulo excessivo de sal na folhas. Muitas plantas respondem ao choque osmótico pela produção e acúmulo de compostos orgânicos não tóxicos de baixo peso molecular, coletivamente conhecidos como solutos ou osmólitos compatíveis, tais como a prolina. O acúmulo de prolina ocorre em eubactérias, protozoários, invertebrados marinhos e plantas depois de períodos de estresses. Em plantas a acumulação de prolina tem sido relatada após a ocorrência de vários estresses bióticos e abióticos tais como: salinidade, seca, alta e baixas temperaturas, metais pesados, infecção por patógenos, anaerobiose, deficiência de nutrientes, poluição atmosférica e radiação UV (Siripornadulsil et al., 2002). O nível de acumulação de prolina em plantas varia de espécie para espécie e pode ser 100 vezes maior do que em situações normais de crescimento (Verbruggen; Hermans, 2008).

A cana-de-açúcar cultivada sob irrigação em regiões de zonas áridas ou semi-áridas é freqüentemente sujeita à salinidade do solo. A cultura é moderadamente sensível à salinidade com um limite para a redução da produção em aproximadamente 7 dS/m (Rozeff, 1995). A salinidade do solo ou da água da irrigação reduz a produção da cana (Ginoza; Moore, 1985), reduzindo tanto a densidade como o peso do colmo. Cada aumento de salinidade, em dS/m, na zona radicular pode diminuir a densidade de colmos em 0,6 colmo/m², sendo que cada colmo perde em média 0,15 Kg, resultando em uma diminuição no rendimento de até 13,7 t/ha (Syed; El-Swaify, 1972).

Acredita-se que o acúmulo da prolina em plantas tem um papel adaptativo na tolerância ao estresse. A prolina atua como um osmólito compatível e é uma forma de armazenamento de carbono e nitrogênio (Hare; Cress, 1998). A salinidade e a seca são conhecidos como indutores de estresse oxidativo. Estudos *in vitro* mostraram que a prolina atua como removedor de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Smirnoff; Cumbes, 1989; Alia et al., 2001; Matysik et al., 2002) e, portanto, a acumulação de prolina pode também funcionar como um tampão citosólico no equilíbrio do pH e no estado redox celular (Maggio et al., 2002).

Com o decréscimo da diversidade genética das variedades comerciais, devido ao uso de variedades elite de cana-de-açúcar, diminuíram as opções disponíveis para enfrentar problemas através das técnicas tradicionais de cruzamento, apesar de que, essas técnicas continuarão essenciais no futuro. Uma

alternativa para criar novas variedades de cana-de-açúcar tolerantes ao estresse salino é a utilização da transformação genética. O uso desta tecnologia abre oportunidades para o aumento da tolerância à salinidade em plantas de importância econômica, como a cana-de-açúcar, através da incorporação de genes envolvidos na proteção aos estresses.

O objetivo deste trabalho foi avaliar plantas de cana-de-açúcar geneticamente modificadas com o gene *P5CS* (Δ 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase) de *Vigna aconitifolia* que codifica para a enzima-chave da biossíntese da prolina sob controle de um promotor estresse induzido AIPC (*ABA inducible promoter complex*), quanto à tolerância ao estresse salino.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR NO MUNDO E NO BRASIL

A cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, sendo cultivada desde a época da colonização. Do seu processo de industrialização obtêm-se produtos como o açúcar e o etanol (anidro e hidratado), podendo também ser empregada *in natura*, sob a forma de forragem para alimentação animal, ou como matéria prima para a fabricação de rapadura, melado e aguardente. Seus resíduos também têm grande importância econômica: o vinhoto pode ser transformado em adubo e o bagaço na co-geração de energia.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, liderando a lista dos 80 países produtores, segundo dados da Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO, 2010). Em 2008/2009, o país produziu aproximadamente 570 milhões de toneladas de cana, seguido pela Índia (265 milhões de toneladas) e pela China (85,6 milhões de toneladas) de acordo com a União das Agroindústrias Canavieiras (UNICA, 2010). A produção brasileira representa 34% do total global. A cana ocupa aproximadamente sete milhões de hectares, cerca de 2% de toda a terra arável do país (UNICA, 2010).

No Brasil, o agronegócio sucroenergético movimenta cerca de US\$ 87 bilhões por ano, o que corresponde a aproximadamente 4,6% do PIB (Produto Interno Bruto) nacional, sendo responsável ainda pela geração de 4,2 milhões de empregos diretos e indiretos, além de congregar em torno de 72 mil agricultores em todo o país (FEARP, 2010). Em 2009/2010, segundo projeção da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a produção deve atingir 610 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, e a produção de etanol deverá saltar para 26 bilhões de litros. A comercialização de produtos em 2009 permitiu às usinas um faturamento de cerca de US\$ 23 bilhões, sendo US\$ 12,4 bilhões com etanol, US\$ 9,7 bilhões com açúcar, US\$ 389 milhões com bioeletricidade, US\$ 67 milhões com levedura, aditivos e crédito de carbono. Para o mercado externo foram US\$ 2,37 bilhões em etanol e os principais compradores foram Estados Unidos (34%), Holanda (26%), Jamaica (8%) e El Salvador 7% (FEARP, 2010).

Segundo dados do Balanço Energético Nacional (BEN) em 2008, a participação da biomassa na matriz energética brasileira (oferta interna de eletricidade e combustíveis) foi de 45,3%, a partir da utilização de lenha e carvão vegetal (11,6%), produtos da cana-de-açúcar (16,4%) e outros (3,5%). Com a crise energética nova perspectiva é aberta para o aproveitamento do bagaço da cana-de-açúcar. Como a quantidade do bagaço produzida é muito elevada (aproximadamente 30% da cana-de-açúcar moída), existe um grande potencial para geração de eletricidade para venda comercial. Estima-se um potencial de geração de eletricidade a partir de bagaço de cana-de-açúcar em 4.000 MW utilizando-se tecnologias comercialmente disponíveis (BEN, 2010).

Mundialmente, a produtividade da cana-de-açúcar teve um aumento progressivo e em níveis notáveis no século passado. Este aumento na produtividade foi atribuído ao desenvolvimento e utilização de cultivares melhoradas com aumento da resistência a pragas e doenças, melhor gerenciamento da água, de nutrientes e outros recursos (Segato, 2006). A sustentabilidade deste ritmo de inovação na melhoria da produtividade e uma agricultura com menor impacto ambiental será, no futuro, um dos grandes desafios para manter a rentabilidade da indústria sucroalcooleira (BEN, 2010).

2.2 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar pertence à família *Gramineae* (*Poaceae*), tribo *Andropogoneae* e gênero *Saccharum*, sendo este gênero composto pelas espécies: *Saccharum officinarum* (alopoliplóide com $2n=80$) que apresenta elevado teor de açúcar e é uma das espécies que mais contribuíram com genes para as cultivares atuais (Ming et al., 1998); *Saccharum spontaneum* ($2n=40$ a 128), espécie autopoliplóide altamente polimórfica e não cultivada, sendo que a rusticidade das cultivares atuais é, em grande parte, devido aos genes desta espécie; *Saccharum robustum* ($2n=60$ a 205), bastante semelhante a *S. officinarum*, diferindo principalmente no tamanho do colmo; *Saccharum sinense* ($2n=111$ a 120), conhecida como cana da china; *Saccharum barberi* ($2n=81$ a 124), cana da Índia, que também contribuiu para a formação das variedades atuais (Segato et al., 2006).

Segundo Cesnik e Miocque (2004) as variedades atuais são provenientes de hibridações interespecíficas entre *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum* e *S. barberi*, e da hibridação intergenérica entre os gêneros *Saccharum*, *Ridium* e *Sclerostachya*. A cana-de-açúcar, classificada como *Saccharum* spp., possui número diplóide de cromossomos que varia entre 100-130 (D'Hont et al., 1996). Usando hibridização genômica *in situ*, Cuadrado et al. (2004) demonstraram que as cultivares modernas contém cerca de 15 a 20% de cromossomos de *S. spontaneum* e menos de 5% destes são recombinantes. Sua alta ploidia e a estrutura complexa do genoma criam desafios tanto para a aplicação de técnicas convencionais de melhoramento genético para o desenvolvimento de novos cultivares com maior produtividade e tolerância a estresses bióticos e abióticos (Hogarth, 1987), como também para o desenvolvimento de marcadores moleculares (Lakshmanan et al., 2005). Também, esta característica cria desafios para a obtenção de plantas transgênicas com estabilidade de expressão do transgene. Vários promotores de cana-de-açúcar foram isolados, tendo mostrado dirigir a atividade do transgene em calos ou em plântulas, porém não mostraram o mesmo padrão de expressão em plantas maduras (Mudge et al., 2009).

Como a maioria das Poaceas, a cana-de-açúcar é uma planta C4 e, portanto, apresenta maior eficiência na utilização e resgate de CO₂ da atmosfera (Camara, 1993). A cana-de-açúcar é adaptada a condições de alta intensidade luminosa, altas temperaturas e pouca escassez de água, uma vez que somente 30% de seu peso são representados pela matéria seca e 70% de água. (Casagrande, 1991). Sua capacidade em absorver água pelas folhas é maior do que em qualquer outra *Poacea*. A cana é uma espécie, portanto, ideal para cultivo em regiões tropicais (Segato et al., 2006).

Em cana-de-açúcar, grande parte do progresso na produtividade deve-se ao melhoramento genético convencional (Hogarth, 1987). Ganhos econômicos são atribuídos ao controle das principais doenças da cultura com clones selecionados para resistência a doenças (Hogarth, 1987). A contribuição significativa no rendimento da cultura é ainda apoiada pela estimativa de Cox e Hansen (1995) que relataram que a produtividade da cana-de-açúcar pode ser aumentada pela liberação de cultivares elites. Assim o melhoramento de cana tem significativa importância no crescimento da atividade canavieira não apenas pelo desenvolvimento de novas variedades, como também pelo aumento da

produtividade que teve ganhos próximo de 40 toneladas por hectare, segundo Oliveira e Vasconcelos (2006). Estas realizações no passado são importantes, mas está se tornando cada vez mais evidente que a utilização integrada de técnicas convencionais e moleculares permita as indústrias de açúcar e etanol criarem estratégias para superar os desafios do futuro.

Embora as pesquisas em biotecnologia da cana-de-açúcar começassem na década de 1960 com estudos de regeneração de plantas *in vitro* (Nickell, 1964; Heinz; Mee, 1969), vários esforços para melhorar a cultura da cana através de técnicas moleculares teve início somente na década passada. Estabelecimento de um sistema de transformação eficiente por Bower e Birch (1992) foi a primeira conquista importante para o desenvolvimento de um sistema integrado de melhoramento molecular/convencional de cana. A biotecnologia pode oferecer excelentes melhorias para a cultura da cana-de-açúcar, principalmente para os híbridos comerciais interespecíficas de *S. officinarum* e *S. spontaneum* (Bakker, 1999) que podem ser beneficiados devido ao seu genoma complexo e com base genética estreita que dificulta a aplicação de técnicas convencionais de melhoramento genético para a cultura visando o desenvolvimento de novos cultivares com maior tolerância a estresses abióticos (Hogarth, 1987).

Um exemplo é o projeto Genoma Cana conhecido pela sigla SUCEST (Sugar Cane ESTs), com base em 43 mil seqüências expressas de genes possibilitou a patente de 200 genes identificados em diversas variedades de cana que estão relacionados à produção de sacarose (Oliveira e Vasconcelos, 2006). Desta forma, tal complexidade e fatores somados tornam a cana-de-açúcar uma excelente candidata ao melhoramento por meio da engenharia genética (Roach, 1995). Atualmente a biotecnologia oferece mudas indexadas de cana-de-açúcar com a produção *in vitro* de mudas por meio de técnicas de cultura de tecido que é uma metodologia tradicional no setor sucro-alcooleiro no Brasil e no mundo permitindo a produção em grande escala de mudas saudáveis para a formação de viveiros (Segato et al., 2006).

2.3 EFEITOS CAUSADOS PELO ESTRESSE SALINO NAS PLANTAS

A salinidade tem um efeito significativo na produção agrícola, pois restringe não só a produtividade das culturas em um determinado ciclo de crescimento como também deteriora os solos e a água da irrigação agravando assim os efeitos prejudiciais da salinidade. Em muitos países ao redor do globo onde a água já é escassa e as secas são recorrentes, a salinidade do solo é um dos principais entraves na produtividade afetando negativamente grande parte das terras cultivadas além de reduzir o rendimento das culturas (Mahajan; Tuteja, 2005). As culturas de importância agrícola, em sua maioria, são glicófitas dependendo de água doce para atingir o seu potencial de rendimento, sendo que o seu crescimento e o metabolismo são afetados em baixas concentrações de sódio, de 50-100 mM de NaCl (Ward et al., 2003).

A salinidade, que normalmente aparece na forma de aumento de NaCl no solo, afeta as plantas de duas maneiras. Altas concentrações de sais no solo dificultam a absorção de água pelas raízes, e altas concentrações de sais na planta podem ser tóxicas, prejudicando o crescimento e o desenvolvimento das plantas, podendo reduzir a sua sobrevivência. Sais no exterior das raízes têm um efeito imediato sobre o crescimento celular associados ao metabolismo, enquanto que as concentrações tóxicas de sais, nas plantas, levam mais tempo para acumular, antes de afetar as funções fisiológicas (Munns; Tester, 2008). Os solutos dissolvidos na zona radicular causam um potencial osmótico negativo que reduz o potencial hídrico do solo, afetando diretamente o balanço hídrico das plantas de maneira similar ao efeito de um déficit hídrico do solo. Além dos efeitos secundários, incluindo patologias que inibem o crescimento das plantas e afeta o desenvolvimento, provoca a morte celular (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2001, 2002).

O efeito dos estresses abióticos sobre o crescimento das plantas esta associado a um crescimento mais lento em resposta ao estresse. (Bressan et al., 2002; Hohmann, 2002; Zhu, 2001, 2002, 2003). A diminuição da taxa de crescimento foliar, após um aumento na salinidade do solo é devido ao efeito osmótico que o sal gera em torno das raízes, fazendo com que as células das folhas percam água. Para compensar o estresse salino, as plantas iniciam um processo de ajustamento osmótico, para impedir a perda de turgidez celular, fazendo com que

estas continuem a crescer mais lentamente. As taxas de crescimento das células são reduzidas, levando a uma divisão celular mais lenta nas folhas, conferindo um menor tamanho e uma menor área de profundidade, de modo que as folhas ficam menores e mais espessas (Cramer, 2002, Fricke; Peters, 2002).

Os efeitos da toxicidade iônica ocorrem quando as concentrações de íons prejudiciais acumulam-se nas células. Sob condições normais o citosol das células das plantas superiores contém cerca de 100 mM de potássio (K^+) e menos que 10 mM de sódio (Na^+). Uma razão alta entre Na^+ e K^+ e concentrações altas de íons totais inibem a síntese de proteínas. Concentrações altas de Na^+ podem deslocar o íon Ca^{+2} da membrana plasmática, determinando uma mudança da sua permeabilidade, que pode ser constatada pela saída de K^+ das células. O sódio prejudica a homeostase iônica afetando de diversas maneiras o status nutricional da planta; um exemplo é a inibição da obtenção do K^+ mediante a competição por sítios de transporte de proteínas (Gramer et al., 1985).

A fotossíntese é inibida quando concentrações altas de Na^+ e Cl^- se acumulam nos cloroplastos. Uma vez que o transporte de elétrons na fotossíntese parece relativamente insensível aos sais, o metabolismo do carbono ou a fotofosforilação podem ser afetados (Taiz; Zeiger, 2009). Durante o estresse osmótico, a disponibilidade do CO_2 atmosférico é reduzida, pois aumenta o fechamento dos estômatos e conseqüentemente diminui o consumo de NADPH pelo ciclo de Calvin. A redução na taxa de fotossíntese aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), e aumenta a atividade das enzimas que detoxificam estas espécies como superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase, e as várias peroxidases (Apel e Hirt 2004; Foyer e Noctor, 2005; Logan, 2005).

O estresse salino, entre outros estresses ambientais, é conhecido como mediadores em gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) tais como superóxido (O_2^-) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxila (OH^-) (Hernández et al., 2001; Able et al., 2003). Os principais locais de produção de ROS nas células das plantas são as organelas com alta atividade metabólica oxidante ou que sustentam o fluxo de elétrons: cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Garczarska et al., 2004). Nos cloroplastos, ROS podem ser gerados pela transferência direta de excitação de energia na produção de oxigênio ou na redução do oxigênio na reação de Mehler (Meloni et al., 2003). Além disso, o H_2O_2 e O_2^- podem interagir na presença de determinados íons metálicos e quelatos para alta

produção de reativos de OH^\cdot . Nos cloroplastos, H_2O_2 é um poderoso inibidor do ciclo de Calvin. As espécies reativas de oxigênio podem facilmente reagir, causando peroxidação de lipídios e desnaturação de proteínas, sendo comum o efeito dos radicais livres na degradação das membranas das células (Yu e Rengel, 1999; Prochazkova et al., 2001).

Estresse salino, como muitos outros estresses abióticos, inibe o crescimento da planta. O crescimento mais lento é uma característica adaptativa para a sobrevivência das plantas sob estresse, pois permite que as plantas usem de vários recursos para combater o estresse (Zhu, 2001; Bressan et al., 2008; Taiz e Zeiger, 2009). Uma das causas na redução da taxa de crescimento sob estresse é a fotossíntese insuficiente devido ao fechamento dos estômatos e, conseqüentemente, redução da absorção de dióxido de carbono. O mais importante, no entanto, é que o estresse pode inibir a divisão e a expansão celular. Mesmo um pequeno estresse pode resultar em um crescimento mais lento e perdas significativa na produtividade das plantas (Zhu, 2001). Algumas plantas são tão sensíveis ao estresse que param completamente de crescer. Em contrapartida, algumas plantas por não serem responsivas ao estresse podem morrer por continuarem a crescer sob ambiente estressante (Zhu, 2001).

Uma ligação importante entre o estresse e a divisão celular foi revelada pela indução de *ICK1* (cyclin-dependent protein kinase) pelo ácido abscísico em *Arabidopsis* (Wang et al., 1998). O *ICK1* pode dificultar a divisão celular, reduzindo as atividades de ciclina-dependente da proteína quinase que ajuda a conduzir o ciclo celular. O estresse hídrico e salino pode inibir a divisão celular, causando o acúmulo de ácido abscísico, que, por sua vez, induz o *ICK1*. Estes estresses podem influenciar a divisão celular através da regulação da transcrição e/ou a regulação pós-transcricional de outros componentes da maquinaria do ciclo celular (Zhu, 2001). Outro fator importante envolvido com a redução do crescimento em plantas sob estresse é a redução da concentração de reguladores de crescimento durante condições estressantes, tais como a auxina, citocinina e giberelina, que estão envolvidos na regulação do alongamento e expansão celular.

A expressão constitutiva dos genes relacionados à resposta das plantas aos estresses, incluindo *CBF1*, *DREB1A*, *ATHB7* e *trealose sintase*, causa um crescimento lento em plantas transgênicas (Soderman et al., 1996; Liu et al., 1998). *CBF1*, *DREB1A* (Liu et al., 1998) e *ATHB7* (Soderman et al., 1996) são genes

induzido a frio ou a seca que não são expressos em condições normais de crescimento. O produto destes genes, provavelmente interfere na divisão celular ou a maquinaria da expansão resultando na inibição do crescimento e, portanto, eles podem representar um “sinal de estresse”. Em plantas transgênicas que produziram trealose, esta pode ser uma molécula de sinalização para o controle de crescimento, bem como para a tolerância ao estresse.

2.4 ASPECTOS DA TOLERÂNCIA DAS PLANTAS À SALINIDADE

As plantas podem ser divididas com base na sua capacidade de se adaptar às altas concentrações de sais. As halófitas são nativas de solos salinos e as glicófitas que são incapazes de tolerar sais no mesmo grau que as halófitas. Adaptações evolutivas resultaram nestas espécies que apresentam diferentes capacidades em tolerar níveis elevados de sal e completar seus ciclos de vida. Conseqüentemente, a adaptação das plantas em ambos os grupos exige respostas celulares que atenuam os componentes iônicos do estresse salino (Taiz; Zeiger, 2009).

Embora as halófitas e glicófitas difiram na sua capacidade de tolerar sal, o sistema citosólico e das organelas de ambas parece ser igualmente sensível ao Na^+ e Cl^- (Jacoby, 1999; Hasegawa et al., 2000; Flowers, 2004). A tolerância à salinidade em halófitas depende de vários aspectos fisiológicos interligados, incluindo: compartimentação de íons, produção de osmólitos, adaptação osmótica, seletividade de transporte de íons, respostas enzimáticas e excreção de sais. A habilidade das plantas em manter as concentrações de sódio baixas no citossol é um processo essencial associado com a habilidade das plantas em crescer sob ambientes com altas concentrações de sais (Adams et al., 1998; Taiz; Zeiger, 2009).

Em plantas, vários critérios têm sido relatados como indicadores da tolerância a salinidade, tais como, a porcentagem de folhas mortas (Ponnamperuma, 1977), o crescimento visível e o vigor (Srivastava; Jana, 1984), fluorescência da clorofila (Belkhodja et al., 1994), crescimento das plantas e produção de sementes (Francois, 1996). Outro aspecto relacionado à seleção de plantas tolerantes à salinidade é em relação aos diferentes estádios de desenvolvimento (Maas et al.,

1986), que pode levar a uma redução drástica da produtividade ou até mesmo a sua perda completa de acordo com a idade e estágio de crescimento das plantas quando submetidas ao estresse salino (Ashraf, 1994; Wilson et al., 2000)

O ajuste osmótico ou acumulação de solutos pelas células é um processo pelo qual o potencial hídrico celular é diminuído (Bohnert; Shen, 1999; Rontein et al., 2002; Taiz; Zeiger, 2009). A maior parte do ajuste se deve ao aumento da concentração de uma diversidade de solutos, tais como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e íons inorgânicos (Rhodes; Hanson, 1993). Enzimas citosólicas de células vegetais são inibidas por concentrações altas de íons, que são muitas vezes compartimentados nos vacúolos impedindo o contato com as enzimas e organelas. Por causa dessa compartimentalização de íons, outros solutos são acumulados no citoplasma a fim de manter o equilíbrio do potencial hídrico dentro da célula. Esses solutos, denominados compatíveis, são compostos orgânicos comumente acumulados e compreendem, entre outros, o aminoácido prolina, alcoóis de açúcar (sorbitol e manitol), e a amina quartenária glicina betaína. A síntese destes solutos ajuda as plantas a se ajustarem ao aumento da salinidade no solo (Rhodes; Hanson, 1993).

Tanto o ajustamento osmótico quanto a compartimentação de sódio nos vacúolos também foram mostrados em células de *Saccharomyces cerevisiae* (Hohmann, 2002). Ou seja, os mecanismos pelos quais as plantas atingem o equilíbrio osmótico e iônico são mediadas por mecanismos ortólogos de base bioquímica conservada e/ou funções fisiológicas que são intrinsecamente necessárias para os processos essenciais das plantas (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2000,2001; Van Camp, 2005). Esta afirmação foi confirmada pela seqüência de DNA genômico de duas glicófitas, *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*, que incluem todos os componentes pesquisados como essenciais para as plantas ou necessários para lidar com o estresse salino em diferentes modelos de espécies e culturas (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002).

Em plantas, vários critérios têm sido relatados como indicadores da tolerância a salinidade, tais como, a porcentagem de folhas mortas (Ponnamperuma, 1977), o crescimento visível e o vigor (Srivastava; Jana, 1984), fluorescência da clorofila (Belkhodja et al., 1994), crescimento das plantas e produção de sementes (Francois, 1996). Outro aspecto relacionado à seleção de plantas tolerantes a salinidade é em relação aos diferentes estádios de desenvolvimento (Maas et al.,

1986), que pode levar a uma redução drástica da produtividade ou até mesmo a sua perda completa de acordo com a idade e estágio de crescimento das plantas quando submetidas ao estresse salino (Ashraf, 1994; Wilson et al., 2000)

A capacidade das halófitas em tolerar ambientes salinos e, conseqüentemente, apresentar maior capacidade de sobrevivência, crescimento e desenvolvimento do que as glicófitas pode estar relacionado à expressão de alelos de genes que codificam proteínas que se mantêm ativas na presença de altas concentrações de sal (Waditee et al., 2002). Um exemplo para este caso é o gene da enzima L-mio-inositol-1-fosfato sintase que distingue o arroz (*O. sativa*) de um parente selvagem (*Porteresia coarctata*). Em *Porteresia*, esta enzima homodimérica mantém o seu estado de agregação em concentrações de sal mais elevadas, enquanto que a do arroz se desintegra em monômeros e torna-se enzimaticamente inativa em concentrações muito menores de sal. O aumento da tolerância ao sal em *Porteresia* é devido à superexpressão da L-mio-inositol-1-fosfato sintase e, também, pode estar relacionado à diferença encontrada em um domínio que discrimina as duas formas da enzima (Majee et al., 2004).

Outra hipótese para a maior tolerância à salinidade das halófitas, é que estas plantas poderiam controlar determinantes universais de tolerância de uma maneira a conferir a estas espécies um estado pré-adaptado, ou seja, uma “capacidade de resposta mais rápida” em ambientes salinos. Esta capacidade de resposta rápida foi verificada em *Thellungiella halophila* (agrião sal), que é tolerante à salinidade (Inan et al., 2004). O fato das halófitas mostrarem aumento no crescimento em concentrações moderadas de NaCl, pode estar relacionada à alta expressão constitutiva das vias de resposta ao estresse. Análises de etiquetas de seqüências expressas (ESTs) mostraram que o agrião sal apresenta expressão constitutiva para uma série de genes, e que a indução dessas transcrições é iniciada em maiores níveis do que em *Arabidopsis* em condições de estresse salino (Taji et al., 2004).

Outro caso que pode ser considerado é que algumas halófitas evoluíram adaptações especializadas, como por exemplo, o armazenamento de NaCl em glândulas de excreção de sal. Assim, essas espécies possuem determinantes únicos, com funções especializadas para mediar à adaptação a ambientes salinos, que estão faltando nas glicófitas. Essa exclusividade pode ser

revelada quando forem identificados os genes relevantes em mais plantas modelos de halófitas (Bressan et al., 2008).

Os sinais de estresse osmótico e iônico são percebidos e decodificados por todas as plantas através de diferentes vias de sinalização que são respostas para o controle do estresse. Estas vias controlam as respostas genéticas e coordenam os determinantes dos processos necessários para a adaptação. Ambas as condições de estresse que constituem perturbações ambientais alteram as condições normais do desenvolvimento celular (Zhu, 2001, 2002). Para atingir a tolerância à salinidade, três aspectos interligados das atividades da planta são importantes (Figura 1). Primeiro, o dano deve ser evitado ou atenuado. Em segundo lugar, as condições homeostáticas devem ser restabelecidas. Terceiro, o crescimento deve continuar, porém com uma taxa reduzida (Zhu et al., 1997).

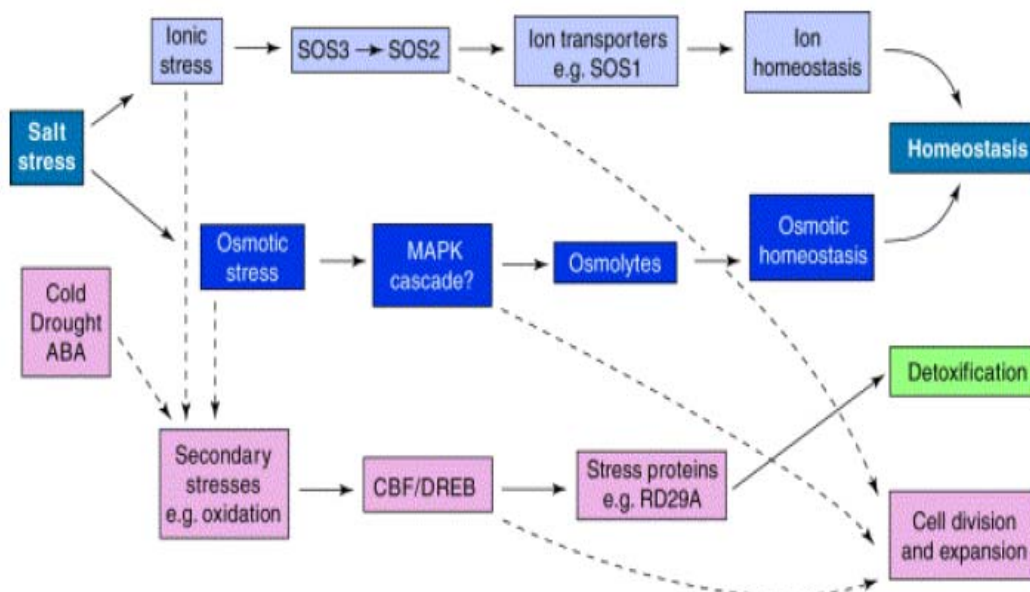


Figura 1 – Três aspectos de tolerância à salinidade em plantas (homeostase, detoxificação e controle do crescimento) e os caminhos que os interligam; a homeostase é dividida em iônica e osmótica. A via SOS (Salt Overly Sensitive) é mediada pela homeostase iônica e tolerância ao Na^+ . Uma proteína ativa da cascata (MAPK), semelhante à via HOG1 de levedura, media a homeostase osmótica. Os dois estresses primários (iônico e osmótico) causam danos ou levam ao estresse secundário como a oxidação. Proteínas do estresse tais como RD29A, podem ajudar na detoxificação e na redução de danos. Os fatores de transcrição tais como CBF/DREB que media a expressão de alguns genes de proteínas do estresse em resposta ao estresse secundário causado por alta concentração de sal, frio, seca ou ácido abscísico (ABA). A homeostase iônica e osmótica, e a via de detoxificação são propostas para manter ativa a divisão celular e a regulação da expansão para o controle do crescimento das plantas (Zhu, 2001).

A natureza do dano causado pelas altas concentrações de sais em plantas não é totalmente esclarecida. No entanto, os efeitos tóxicos causados pela salinidade na integridade da membrana celular, na atividade de várias enzimas, na aquisição de nutrientes e no funcionamento do aparato fotossintético são bem estudados (Zhu, 2001).

Uma importante causa de danos podem ser as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pelo estresse salino. As plantas sob estresse respondem com a produção de proteínas do estresse e osmólitos compatíveis que provavelmente detoxificam as plantas retirando os ROS ou prevenindo que eles causem danos às estruturas celulares (Zhu et al., 1997). Muitas plantas transgênicas melhoradas para tolerância ao sal têm sido obtidas usando as estratégia de detoxificação. Isto foi mostrado em plantas transgênicas superexpressando enzimas envolvidas na proteção oxidativa, tais como a glutathione peroxidase e a glutathione reductase (Allen et al., 1997). Também, a expressão da proteína regulatória NPK1, uma (MAP quinase), mostrou que esta proteína está envolvida nas respostas ao estresse oxidativo (Kovtun et al., 2000). Outro exemplo que mostra a possibilidade de aumentar a tolerância à salinidade foi obtido pela caracterização do gene *pst1* em *Arabidopsis*, que apresenta uma mutação em um regulador desconhecido de resposta ao estresse oxidativo. Plantas com o *pst1* são mais resistentes a altas concentrações de sal devido à maior capacidade de tolerar o estresse oxidativo (Tsugane et al., 1999).

Ao mesmo tempo, mecanismos que toleram o sal devem ser acompanhados pelo acúmulo de solutos compatíveis com o metabolismo celular. Os osmólitos devem aumentar no citosol e nas organelas para alcançar o ajustamento osmótico (Blumwald, 2000; Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2002, 2003). A produção de osmólitos, tais como manitol, trealose, ornitol, prolina e glicina betaína, também atua na detoxificação oxidativa pela remoção de ROS (Shen et al., 1997) Em plantas transgênicas de tabaco os níveis destes osmólitos são geralmente elevados o que resulta em um ajustamento osmótico, não somente na tolerância ao estresse salino como também para vários outros estresses tais como geadas, frio, calor e seca, que também geram ROS (Allen et al., 1997; Roxa et al., 1997). A tolerância ao estresse salino em plantas super-expressando fatores de transcrição, como o CBF/DREB (Liu et al., 1998) também pode ser creditada indiretamente ao efeito de detoxificação. Por exemplo, plantas transgênicas superexpressando CBF/DREB mostraram uma

maior tolerância à seca, salinidade e ao congelamento. Estes fatores de transcrição podem ativar os elementos DRE/CRT que são encontrados nos promotores de alguns genes responsivos ao estresse (Liu et al., 1998), incluindo aqueles envolvidos na remoção de ROS.

Sob ambientes estressantes, vários transportadores de íons são determinantes para manter a homeostase iônica e prevenir a acumulação de altos níveis de Na^+ no citoplasma ou em outras organelas, que não seja o vacúolo. Para isso a entrada do Na^+ nas células, mediada por canais de cátions não seletivos, deve ser impedida ou reduzida (Amtmann; Sanders, 1999). A solução do solo carregada para dentro do xilema da raiz faz com que os íons se movam para a parte aérea através do fluxo transpiracional (Munns et al., 2002). Assim, o controle do conteúdo de Na^+ no xilema da raiz regula o teor de íons na parte aérea e no apoplasto das folhas a um nível intracelular tal que os processos de compartimentalização permitem que o conteúdo de íons dentro das células diminua (Maathuis; Sanders, 1999; Hasegawa et al., 2000; Munns et al., 2002). Portanto, a homeostase do íon na planta requer uma coordenação de processos celulares como as funções intercelulares, de tecido e de regulação dos íons nos órgãos. Por exemplo, a compartimentalização nos vacúolos permite interligar as células da raiz, desde a epiderme até o parênquima do xilema, reduzindo o teor de íons no fluxo de transpiração que se deslocam para a parte aérea (Flowers et al., 1986; Hasegawa et al., 2000).

Quando o Na^+ consegue entrar nas células ele pode ser armazenado no vacúolo ou exportado para fora da célula. A compartimentação do Na^+ é um meio econômico de prevenção da toxicidade do Na^+ no citosol porque o Na^+ pode ser usado como um osmólito no vacúolo para ajudar a alcançar a homeostase osmótica (Flowers et al., 1977). Muitas halófitas usam esta estratégia. Além do controle do fluxo de Na^+ e compartimentação no vacúolo, o efluxo do Na^+ também é importante na manutenção de uma baixa concentração de Na^+ no citoplasma. O gene *SOS1* codifica um trocador de Na^+/H^+ na membrana plasmática de *Arabidopsis* (Shi et al., 2000; Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2002). Plantas de *Arabidopsis* com a mutação no *SOS1* tornaram-se sensíveis ao Na^+ , enquanto que a superexpressão de *SOS1* reduziu o conteúdo de Na^+ no citoplasma e aumentou a tolerância das plantas ao estresse salino (Shi et al., 2000).

2.5 REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE IÔNICA

A presença de Na^+ e Cl^- , tanto na célula quanto em compartimentos extracelulares, afeta negativamente a absorção e a homeostase de nutrientes essenciais (Hu et al., 2006). Na^+ e Cl^- tem efeito de íon específico, ou seja, efeito de íon tóxico, que diferem do efeito osmótico. A acumulação de Na^+ e Cl^- nos tecidos das folhas ocasiona a característica de folhas queimadas, sendo este um sintoma comum de estresse salino na maioria das espécies (Blumwald et al., 2000; Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2003).

De acordo com Kwon et al. (1999) a tolerância à salinidade é associada com a exclusão do Na^+ , com a seletividade de absorção do K^+ sob o Na^+ e com a manutenção da alta taxa entre a razão Na^+/K^+ nas folhas e caules de *Brassica*. Uma alta taxa entre Na^+/K^+ no citosol contribui para uma manutenção do metabolismo celular (Flowers et al., 1986; Flowers; Yeo, 1992). Sob estresse salino, o Na^+ compete com o K^+ na absorção pelas raízes. O nível de transcrição de vários genes transportadores de K^+ são super-regulados ou inibidos pelo estresse salino, provavelmente refletindo as diferentes capacidades das plantas em manter a absorção do K^+ sob estresse (Pilot et al., 2003). A transcrição de genes que codificam os canais e transportadores de Na^+ e K^+ são regulados pelo estresse salino e estresse osmótico, sendo que o nível da atividade de absorção dos canais de K^+ é regulado por proteínas quinases e fosfatases. (Li et al., 1998; Thibaud, 2002).

Tanto a hiperosmolaridade quando os sinais íon-específicos do estresse salino são sentidos pelas células das plantas. O estresse osmótico ativa a síntese de ácido absísico (ABA), no qual pode regular a transcrição do gene *AtNHX1* que codifica um trocador de Na^+/H^+ no vacúolo (Shi; Zhu, 2002). O Ca^+ e o ABA são reguladores intermediários de sinalização do estresse salino controlando a adaptação das plantas (Bressan et al., 2008). O Na^+ extracelular pode ser detectado por receptores de membrana, enquanto o Na^+ intracelular pode ser sentido tanto por proteínas de membrana como por enzimas sensíveis ao Na^+ no citoplasma (Figura 2).

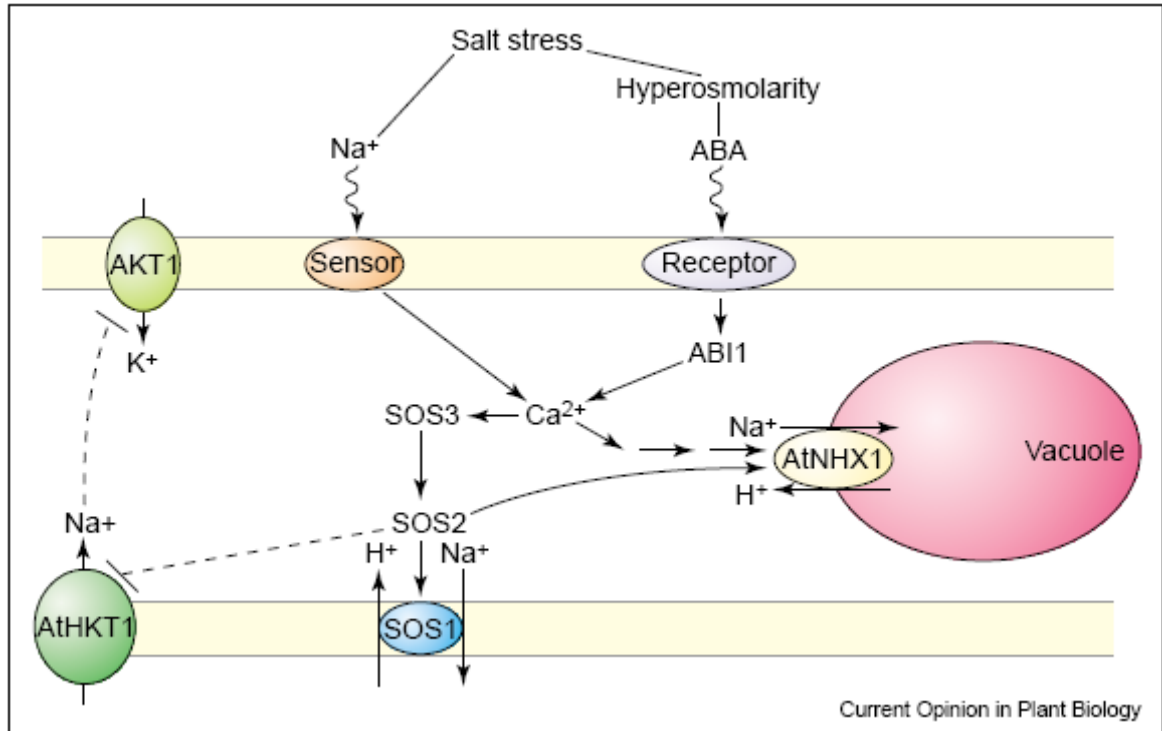


Figura 2 – Vias de sinalização que regulam a expressão e atividade dos transportadores de íon para manter uma baixa concentração de Na no citoplasma sob estresse salino. Na⁺ excessivo e hiperosmolaridade são percebidos por sensores desconhecidos. A hiperosmolaridade induz a síntese de ABA, tornando um regulador da transcrição de *AtNHX1* e outros genes transportadores de íon. O potencial negativo regulado pelo SOS3-SOS2 e o AKT é mostrado pelas linhas pontilhadas (Zhu, 2003).

Existe um grande potencial negativo através da membrana plasmática das células das plantas que favorece o transporte passivo de Na⁺ para dentro das células. O Na⁺ entra nas células através dos canais de cátion não-seletivos. A entrada de Na⁺ mediada pelos canais não-seletivos são parcialmente sensíveis ao cálcio. O Ca²⁺ facilita a absorção seletiva de K⁺ em relação ao Na⁺ através de mecanismos que controlam a absorção de ambos os íons (Lauchli; Epstein, 1990; Lauchli, 1996; Tester; Davenport, 2003). O efluxo celular do Na⁺ não é intuitivo em plantas, pois o transporte do Na⁺ para fora de uma célula apresentaria um problema para a célula vizinha. Com isso o efluxo do Na⁺ é realizado em tecidos específicos. Em *Arabidopsis*, como mostra a figura 1, o efluxo do Na⁺ é catalisado pelo antiporte Na⁺/H⁺ na membrana plasmática, codificado pelo gene *SOS1* (*Salt Overly Sensitive*) (Shi et al., 2000; Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2002; Shi et al., 2002). O SOS1, que tem uma atividade de trocador de Na⁺/H⁺, é essencial para o efluxo de Na⁺ nas células de *A. thaliana* (Qiu et al., 2002; Quintero et al., 2002). Um

defeito no efluxo de Na^+ em mutantes SOS pode levar a níveis excessivos de Na^+ no citoplasma, que inibi a absorção dos transportadores de K^+ , tais como o *AKT1* (Arabidopsis K transporter 1) (Rus et al., 2001; Zhu et al., 1998).

A compartimentação vacuolar do Na^+ é um mecanismo adaptativo a salinidade usado por todas as plantas e é um processo conservado em organismos taxonomicamente distantes (Flowers et al., 1986; Flowers; Yeo, 1995; Glennet al., 1999; Blumwald et al., 2000; Pardo; Quintero, 2002). Este processo não só diminui o acúmulo de íons tóxicos no citoplasma, como também é fisiologicamente necessário para o ajustamento osmótico em ambientes salinos (Hasegawa et al., 2000).

2.6 PROLINA, P5CS E AIPC

Uma das respostas metabólica ao estresse salino é a síntese de osmólitos compatíveis, como a prolina, para proteção de estruturas sub-celulares e redução dos danos oxidativos causados pelos radicais livres (Hare et al., 1998).

A síntese de prolina livre é uma resposta freqüente ao estresse osmótico, e que é observada tanto em plantas como também em eubactérias, protozoários, invertebrados marinhos e algas (Skiver; Mundy, 1990). Algumas espécies halófitas, como as do gênero *Melaleuca*, são tolerantes ao sal devido à sua capacidade de acumular grandes quantidades de osmoprotetores conhecidos como análogos de prolina (Naidu, 2003). Estes osmoprotetores têm sido utilizados no tratamento de sementes e aplicação foliar para aumentar a resistência à salinidade em culturas de importância econômica (Hoque et al., 2007).

Em plantas existem dois diferentes precursores para a biossíntese de prolina em plantas, sendo que a via do glutamato é considerada predominante na produção deste aminoácido, principalmente durante condições de estresse. Nesta via, L-prolina é produzida através do ácido L-glutamato via $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C) pela enzima $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS). A enzima $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) catalisa o último passo da síntese da prolina (Figura 3). A atividade da enzima P5CS representa o passo limitante da síntese de prolina, sendo a regulação da transcrição do gene osmoregulada e a atividade da

enzima controlada por mecanismo de retroalimentação (Yoshiba et al., 1995; Zhang et al., 1995; Savouré et al., 1997).

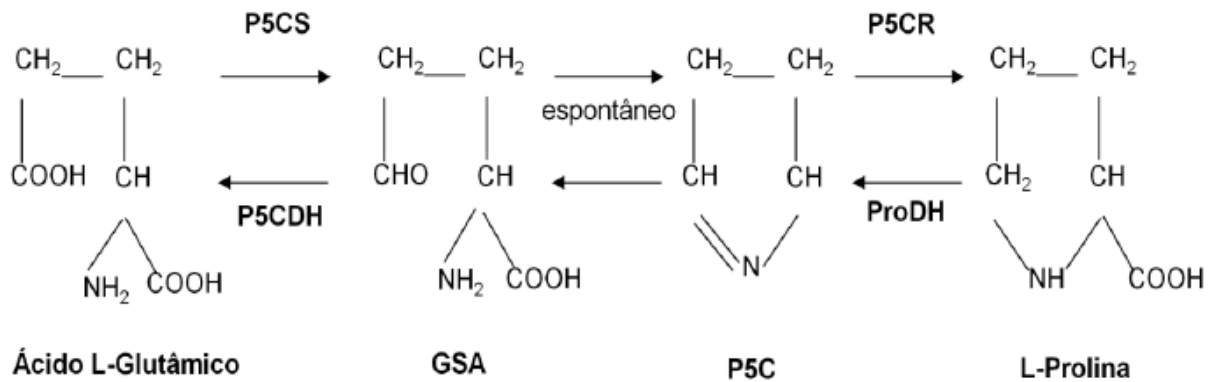


Figura 3 – Biossíntese de prolina em plantas superiores via glutamato (Zhang et al., 1995).

O precursor para a via alternativa para a biossíntese de prolina é a ornitina, a qual pode ser reduzida para P5C pela ornitina- δ -aminotransferase, uma enzima localizada na mitocôndria. Como mencionado anteriormente, a via do glutamato é a via principal durante o estresse osmótico. No entanto em plantas jovens de *Arabidopsis*, a via da ornitina também contribui para o acúmulo de prolina, pois a atividade da ornitina- δ -aminotransferase é aumentada (Roosens et al., 2002).

A função de proteção da prolina em células de plantas sob estresse salino já foram relatados por diversos autores (Sairam et al., 2002; Khedr et al., 2003; Demiral; Turkan, 2004). A rápida acumulação de prolina livre em tecidos de muitas espécies de plantas como uma resposta a salinidade, seca e baixas temperaturas tem sido associada com a habilidade da prolina em atuar como uma fonte de reserva de nitrogênio e carbono para o crescimento pós-estresse (Hare; Cress, 1997). Steward; Lee (1974) sugeriram que a prolina também pode atuar como um osmólito citoplasmático neutralizando o efeito do acúmulo de sal no vacúolo. Khedr et al. (2003) mostraram que sob estresse salino severo a atividade antioxidante das enzimas catalase e peroxidase é inibida, porém as atividades destas enzimas foram significativamente maiores na presença da prolina do que na sua ausência.

Plantas de tabaco superexpressando o gene *P5CS*, que codifica a primeira enzima da biossíntese da prolina, sob controle de um promotor constitutivo,

sintetizaram 10-18 vezes mais prolina que plantas controle e foram mais tolerantes ao estresse salino (Kishor et al., 1995). Surpreendentemente, o potencial osmótico das plantas transgênicas não foi inferior ao das plantas que não foram submetidas ao NaCl. A remoção da inibição por retroalimentação da enzima P5CS resultou em um alto acúmulo de prolina e proteção das plantas ao estresse osmótico (Hong et al., 2000). O aumento na atividade da enzima P5C redutase também está correlacionado com a acumulação de prolina em células de *Chlorella autotrophica* e *Chlorella saccharophila* adaptadas ao NaCl (Laliberté; Hellebust, 1989). Do mesmo modo, um aumento de seis vezes na transcrição de P5C redutase foi observado nas raízes de plântulas de soja submetidas à salinização em um curto período (Delauney e Verma, 1990).

Outro importante ponto de regulação do nível de prolina nas plantas é a via catabólica, que é o inverso da biossíntese de glutamato através dos mesmos intermediários. Duas diferentes enzimas estão envolvidas na oxidação da prolina: a prolina desidrogenase (ProDH), localizada na membrana mitocondrial, e a prolina desidrogenase citoplasmática. Durante o estresse, tanto a transcrição quanto os níveis de ProDH são reprimidos e, ao contrário, induzidos durante a recuperação pós-estresse (Kiyosue et al., 1996). Os dados sobre a expressão de *ProDH* em *Arabidopsis thaliana*, durante o estresse, foram confirmados através da expressão de gene promotor-repórter (Nakashima et al., 1998).

Embora o nível de prolina seja regulamentado principalmente pelas enzimas P5CS e ProDH, a sua regulação pela pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH) também é importante. Em *Arabidopsis*, os genes *P5CDH* e *SRO5* (*NAD⁺ADP-ribosyltransferase*), geram uma sobreposição antisense que se sobrepõem por 760 nucleotídeos (Borsani et al., 2005). O *SRO5* não é expresso em condições normais de cultivo, mas a sua expressão foi regulada por tratamentos com NaCl. Após tratamentos com sal, transcritos do *SRO5* e o *P5CDH* formam um dsRNA que é processado e gera 24-NTSRO5-RNS que silencia naturalmente a expressão do *P5CDH* (nat-siRNAs). Este, por sua vez contribui para a acumulação de prolina, porém causa um aumento na produção de ROS (Verbruggen; Hermans, 2008).

A maioria dos estudos com a superexpressão de genes exógenos para aumentar a tolerância ao estresse abiótico em plantas utiliza promotores constitutivos (Su e Wu, 2003). No entanto, tem sido relatada que em alguns casos, a

superexpressão constitutiva destes transgenes dificulta o crescimento das plantas podendo reduzir a sua produtividade (Karim et al., 2007). Em condições normais de crescimento a superexpressão do transgene pode concorrer para a energia e esqueletos de carbono, impedido a síntese de proteínas e RNAs que são necessários para o crescimento das plantas. Assim, é desejável gerar plantas transgênicas que acumulem os seus produtos transgênicos apenas sob condições de estresse (Rai et al., 2009).

Su e Wu (2004) estudaram que a expressão estresse-induzido do transgene *P5CS* resultou em maior produção de biomassa quando comparado com a expressão constitutiva. Quando as plantas de arroz foram cultivadas em condições normais, a superexpressão constitutiva de prolina mostrou efeitos prejudiciais no crescimento das plantas. No entanto, quando um promotor-induzido AIPC (*ABA inducible promoter complex*) foi utilizado para conduzir a expressão do *P5CS*, o acúmulo de prolina ocorreu apenas quando as plantas estavam sob estresse. Desta forma os baixos níveis de prolina não interferiram no crescimento normal das plantas transgênicas resultando em um rápido crescimento sob condições de estresse do que com a acumulação constitutiva da prolina.

O complexo promotor estresse induzido AIPC inclui um elemento ABA-responsivo, com 49 pb (Shen e Ho, 1995), ligado a um promotor mínimo do gene da actina do arroz com 180 pb (Su et al., 1998) e ao íntron do gene *HVA22* (Shen e Ho, 1995). Este gene pode ser expresso em órgãos e tecido, além de sementes como verificado em brotos e raízes de mudas de cevada tratadas com frio e seca, em trabalhos de Shen et al. (2001). As plantas tratadas com baixas temperaturas foram devolvidas a temperaturas ambiente os níveis de transcrição de *HVA22* diminuíram em 14 h.

Estudos com o promotor ABA-responsivo, em células de aleurona de cevada, mostraram que este possui uma seqüência de 49 pb de ABRC1 (*ABA responsive complex*) truncada ao promotor α -amilase da cevada (*AMY 64*) e acoplados a uma região intron de aproximadamente 233 pb do gene *HVA22*. O uso de mais de uma cópia do ABRC1, em plantas de arroz, aumentou a expressão do gene *GUS* de 3 a 8 vezes com a aplicação de ABA, exposição ao estresse hídrico, e 150 mM de NaCl. Plantas com quatro cópias do complexo ABA-responsivo (vetor pJS104) mostraram níveis de expressão do gene *GUS* de 50 a 200% a mais do que plantas com 1 cópia (vetor pJS109) (Su et al., 1998).

2.7 SALINIDADE NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é uma espécie classificada como glicófita, suscetível ao sal, demonstrado pelos sintomas de toxicidade, baixa emergência dos colmos, desequilíbrio nutricional e, sobretudo, redução no crescimento das plantas e, conseqüentemente, uma baixa produção de biomassa (Wahid et al., 1997; Plaut et al., 2000; Akhtar et al., 2003).

Blackburn (1984) relatou que o crescimento e a produtividade da cana foi praticamente inalteradas em condutividade elétrica (CE) até 2–3 dS/m; já em aproximadamente 7 dS/m houve uma redução de 50% no crescimento. Rozeff (1995) sugeriu que a redução no crescimento é maior quando o CE ultrapassar 3 dS/m, embora as plantas possam sobreviver até 5-10 dS/m, dependendo da cultivar. Já Segovia (1989) mostrou uma drástica diminuição do crescimento da cana mesmo em baixos níveis de salinidade.

Palaniswamy e Moshi (1973) mostraram que uma proporção elevada de Na^+ no complexo de troca do solo aumenta o conteúdo de Na^+ nas plantas de cana-de-açúcar, as quais tiveram um decréscimo na produção. Syed e El-Swaif (1972) observaram um aumento na concentração de cloro e sódio em tecido foliar de cana-de-açúcar irrigada com água salina. Este tratamento reduziu o conteúdo de N^+ e K^+ no limbo foliar, enquanto o conteúdo de fósforo (P) não foi afetado em genótipos tolerantes ao sal.

Além de afetar o crescimento e a produtividade de cana-de-açúcar, a salinidade pode reduzir a concentração de sacarose no colmo (Rozeff, 1995). O teor de sacarose do caldo determina o rendimento máximo de sacarose, enquanto que outros açúcares, ácidos orgânicos, sais minerais reduzem a eficiência de recuperação da sacarose após a moagem. Estudos têm mostrado que a salinidade também reduz o Pol (estimativa do teor de sacarose do caldo) e a Pureza Aparente, que é calculada pela razão entre o Pol e o Brix (sólidos solúveis totais) do caldo (Lingle; Wiegand, 1997). A salinidade também aumenta a condutividade do caldo (conteúdo de minerais), que é altamente prejudicial no processo de produção do açúcar (Prothero, 1978; Thomas et al., 1981).

Outro problema relacionado com a salinidade é a aplicação de vinhaça - um subproduto do processo de produção do açúcar e do álcool - no solo,

que quando usada em quantidades excessivas conduz à sua salinização. Ferreira (1980) avaliou em laboratório doses de vinhaça (0, 200, 400, 800, 1200 e 1600 m³/ha) em três solos: aluvial (51% de argila), podizólico vermelho amarelo (38% de argila) e hidromórfico (5,5% de argila). O solo hidromórfico atingiu índice de salinização apregoado pelo USDA (Rural Development Forms, 1951), de 4,0 mmhos/cm a 25°C com doses entre 400 e 800 m³/ha de vinhaça. O solo podizólico vermelho amarelo só com a dose 1.200 m³/ha atingiu o índice salino. E o solo aluvial, devido ao maior teor de argila, não atingiu o índice com nenhuma das doses.

2.8 ENGENHARIA GENÉTICA PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO

Entre os estresses abióticos, a salinidade do solo é um dos principais entraves a produtividade das culturas, afetando negativamente grande parte das terras cultivadas reduzindo o rendimento das culturas não só em um determinado ciclo de desenvolvimento, mas também levando a deterioração progressiva dos solos e da água da irrigação agravando o efeito da salinidade sobre as subseqüentes gerações (Flowers, 2004; Bressan et al., 2008).

O uso da biologia molecular para o estudo do estresse salino trouxe conhecimentos significativos sobre as reações das plantas à alta salinidade, dos mecanismos de tolerância ou de sensibilidade ao sal. Um dos incentivos para a utilização dessas novas ferramentas é o valor agrônômico que as culturas poderão adquirir se elas tornarem-se tolerantes ao sal. Tais modificações proporcionariam segurança alimentar garantindo a produção em áreas onde a produção é apenas para o sustento diário (Bressan et al., 2008).

Resultados já foram obtidos a partir de vários experimentos que utilizaram ambientes controlados para avaliar as diferenças entre espécies controles e as melhoradas por engenharia genética (Garg et al., 2002; Shi et al., 2003; Wang et al., 2003 ; Lee et al., 2004; Urano et al., 2004; Wu et al., 2004; Cha-um S. e Kirdmanee C., 2009; Kumar, 2010). As características estudadas nestes trabalhos para aumentar a tolerância à salinidade foram a integridade das membranas e proteínas, síntese de carboidratos e compostos nitrogenados, fornecimento de

energia, reações de detoxificação e uma variedade de proteínas que estabilizam íons e regulam a homeostase.

Outros estudos enfocaram a natureza dos elementos genéticos que controlam a expressão de genes envolvidos na mitigação dos efeitos do estresse e como as mudanças hormonais afetam as respostas ao estresse salino (Mukhopadhyay et al., 2004; Novillo et al., 2004; Sakamoto et al., 2004; Teige et al., 2004; Villalobos et al., 2004). A maioria dessas novas descobertas foi realizada com a planta modelo mais utilizada na genética, *A. thaliana* (Hasegawa et al., 2000; Zhu, 2002; Xiong et al., 2002; Shinozaki et al., 2003; Ward et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e em casa-de-vegetação do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) em Londrina, que são devidamente credenciados pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CQB (059/98) para desenvolver trabalhos de pesquisa com organismos geneticamente modificados. Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB855156 transformadas com o vetor pJS107 (Su et al., 1998), contendo o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia*, sob controle de promotor estresse induzido, designado como AIPC (*ABA inducible promoter complex*), e o gene marcador de seleção *bar*, que codifica para a enzima fosfinotricina acetil transferase que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio, sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S, foram obtidas conforme Molinari et al., 2007 (Figura 4).



Figura 4 – Esquema do cassete inserido no vetor pBY505 (Wang e Wu, 1995) originando o plasmídeo pJS107 (Su et al., 1997). O cassete contém o complexo promotor artificial AIPC fusionado ao gene *P5CS* que codifica para biossíntese da prolina. E o promotor constitutivo *CaMV 35S* fusionado ao gene marcador de seleção de glufosinato de amônio, *bar*.

3.1 ENSAIOS DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO

Os ensaios para verificação da tolerância a estresse salino foram realizados em casa-de-vegetação com os eventos transgênicos T-10 (com uma única cópia do transgene) e o evento T-7 (com duas cópias do transgene) que apresentaram maiores concentração de prolina em ensaios de déficit hídrico (Molinari et al., 2007). Para o ensaio foram germinadas seis gemas de cada evento e da planta controle não transformada em caixas plásticas com vermiculita. Quando as plantas de cana atingiram idade de um mês, elas foram plantadas em vasos de 3

litros contendo 2,4 Kg de areia lavada e autoclavada, sendo irrigadas com 600 ml de solução de Hoagland 1/10X a cada dois dias. Após alcançarem 25 cm de altura, em média com oito folhas e idade aproximada de quatro meses, as plantas controles e transgênicas foram irrigadas a cada dois dias com 600 ml de solução de Hoagland 1/10X suplementada com NaCl. As dose de NaCl foram aumentadas a medida que até o 9o dia foi adicionado 100 mM de NaCl (9,5dS/m), a partir do 10o dia até o 18o foi adicionado 150 mM de NaCl (14,8 dS/m) e no 18o dia até o final do experimento foram adicionado aos vasos 200 mM (19,1 dS/m) de NaCl. (Figura 5).

	Dia 0	Dia 9	Dia 18	Dia 28	
	0,4 dS/m	9,5 dS/m	14,8 dS/m	19,1 dS/m	→
<u>Início</u>	0 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl	200 mM NaCl	<u>Término</u>

Figura 5 – Esquema do experimento com estresse salino. Os dias correspondem aos pontos de coletas de amostras.

Três plantas de cada um dos dois eventos de transformação e do controle não transformado foram conduzidas na casa de vegetação em posições semelhantes em relação à incidência de radiação solar. Os dados foram coletados no dia 0 (sem estresse) e nos dias 9-18-28 após o início do estresse salino. Para as análises bioquímicas, folhas foram coletadas em cada um dos períodos acima citados, foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C para posterior análise.

3.2 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PROLINA

A determinação da concentração de prolina nas folhas foi feita baseada em curva-padrão, conforme descrito por Bates (1973), com algumas modificações. Cem mg de tecido foliar foram congelados e macerados em N_2 líquido. A extração foi feita com adição de ácido sulfosalicílico (10%) e, em seguida, o

extrato foi centrifugado (10.000 rpm) por 5 min. Foram coletados 2 ml do centrifugado e acrescentados 2 ml da solução de ácido nítrico (1,25 g de nítrina; 30 ml de ácido acético glacial; 20 ml de ácido fosfórico 6 M) e de 2 ml de ácido acético glacial em tubos de microcentrífuga de 15 ml. As amostras foram então incubadas a 100 °C por 1 h, em seguida, transferidas para gelo. Após incubação, foi adicionado 4 ml de tolueno e as amostras foram homogeneizadas por 20 s para completa extração da prolina. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de prolina por espectrofotometria (520 nm) e as absorbâncias comparadas à curva padrão de prolina. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos expresso em $\mu\text{mol.g.MS}^{-1}$.

3.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE MALONDIALDEÍDO (MDA)

Em condições normais e de estresse salino, folhas de cada um dos eventos transgênicos e de plantas controle foram utilizadas para a análise do conteúdo de MDA segundo protocolo descrito por Heath e Packer (1968). Cerca de 100 mg de tecido foliar foi macerado em almofariz e homogeneizados em 6,5 ml de solução 80:20 (v/v) etanol:água, seguido de centrifugação a 5200 rpm por 10 min. Deste extrato foi coletado 1 ml e colocado em um tubo de centrífuga de 15 ml e misturado a mais 1 ml dos reagentes: TCA (20% (p/v) de ácido tricloroacético) em 0,65% (p/v) de TBA (ácido tiobarbitúrico). As amostras foram misturadas vigorosamente e incubadas a 95 °C por 25 min, em seguida, transferidas para gelo e centrifugadas novamente. As absorbâncias foram lidas nos comprimentos de onda de 532 nm e 600 nm. Equivalentes de malondialdeído foram calculados através da fórmula abaixo:

$$\text{Equivalentes de MDA (nmol ml}^{-1}\text{)} = [(A_{532}-A_{600})/155000] \times 106$$

Onde: A532 indica a absorbância máxima do complexo MDA-TBA a 532 nm.

A600 indica a absorbância a 600 nm, que corrige interferentes não-específicos

155000 é o coeficiente de extinção molar para o MDA

As análises foram feitas em triplicata e os valores expressos em nmol.gMF^{-1} .

3.4 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA

A emissão de fluorescência inicial, máxima e variável, e a estimativa da capacidade fotoquímica do fotossistema II (dado pela razão entre fluorescência variável e fluorescência máxima) foram determinadas por um fluorômetro portátil "Plant Efficiency Analyser", PEA (Hansatech Instruments). As medidas foram feitas após pré-condicionamento no escuro, por aproximadamente 1 h, para garantir o estado oxidado dos centros de reação fotossintéticos. Todas as medições foram feitas em folhas +3.

3.5 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE FOTOSÍNTESE, TRANSPIRAÇÃO E CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA

As taxas de fotossíntese líquida em cada planta foram obtidas utilizando um sistema portátil de fotossíntese, modelo LI-6200 (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), com câmara de 1 litro que foram expressas em $\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As medidas foram feitas entre 9h e 10h30min em condições naturais em folhas mais fotossinteticamente ativa classificada como folha +3 segundo sistema de numeração estabelecido por Kuyper (adaptado de Dillewijn, 1952). Além das taxas de fotossíntese líquida o sistema forneceu os valores de transpiração em $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. A condutância estomática foi realizada através de um porômetro e os valores foram expressos em $\text{mol H}_2\text{O}$.

3.6 POTENCIAL DA ÁGUA E POTENCIAL OSMÓTICO

O estado da água nas folhas foi monitorado através de psicrômetros de termopar (modelo C-30, Wescor, Inc., Logan, Ut, U.S.A.) acoplados a um datalogger (Campbell Scientific, Inc., Logan, Ut, U.S.A., modelo CR-7). A cada ponto de coleta (0, 9, 18 e 28 dias), uma amostra de aproximadamente 2 cm² de folha de cada planta foi coletada e colocada nos psicrômetros. O datalogger foi programado para que as leituras fossem efetuadas a cada 10 min até que o equilíbrio da pressão de vapor na câmara fosse verificado. A microvoltagem fornecida pelo sistema foi convertida em potencial da água (MPa) em função de prévia calibração dos sensores com soluções de cloreto de sódio. Após a obtenção do potencial total da água (ψ_t), os sensores foram imersos durante 4 min em nitrogênio líquido e as leituras foram retomadas para obtenção do potencial osmótico (ψ_s). O cálculo do potencial de pressão foi realizado através de $\psi_t - \psi_s$.

3.7 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE SÓDIO E POTÁSSIO

No final do experimento as folhas e raízes de cana-de-açúcar foram coletadas e colocadas em sacos de papel para secagem em estufa a 80°C. A determinação das quantidades de sódio e potássio nas folhas e raízes foi realizada no laboratório de solos do IAPAR, sendo que a extração do Na⁺ e K⁺ foi feita com 1 mol/l de KCl e a determinação através de fotometria de chama (Silveira et al., 1999).

3.8 Determinação da Massa Seca Total de Folha

No final do experimento a massa seca das folhas das plantas de cana-de-açúcar foi determinada após secagem em estufa a 80°C com circulação de ar, até atingirem massa constante. Para determinação da massa seca das folhas foram utilizadas três plantas de cada tratamento (controle, evento T7 e evento T10).

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições, sendo que cada repetição consistiu de uma planta de cada evento de transformação e de planta controle não transformada multiplicadas vegetativamente. Os tratamentos utilizados foram dispostos em parcela subdivididas no tempo 3 x 4, para plantas e tempo de submissão ao estresse salino. Foram consideradas como controle as plantas não transformadas que passaram por regeneração *in vitro* seguindo o mesmo protocolo de cultura de tecidos utilizados para transformação de cana-de-açúcar. Foi realizada a análise de variância dos dados pelo teste F, sendo a comparação entre médias efetuada pelo teste de Tukey (P = 0,05).

4 RESULTADOS

No preparo do material para a implantação do experimento de estresse salino foi observado uma diferença na taxa de brotação das gemas entre as plantas controle (50%) e as plantas transgênica (95%) (Figura 6-A). As plântulas transgênicas sempre apresentaram-se maiores nos primeiros meses após a brotação. Após dois meses de plantio em vasos com areia, e irrigadas com solução de Hoagland, as plantas dos eventos transgênicos e as controle igualaram-se na altura e no número de folhas.

Após o início do estresse salino, quando da adição de 100 mM de NaCl junto com a solução de Hoagland, as plantas controle apresentaram sintomas de enrolamento de folhas mais cedo do que as plantas transgênicas (Figura 6-B). Sintomas de folhas necróticas, com pontas e margens queimadas, apareceram nas folhas das plantas de cana-de-açúcar apenas no vigésimo oitavo dia.

Visualmente, as raízes das plantas controle apresentaram tamanho menor e com menor densidade no final do estresse salino em relação as plantas transgênicas (Figura 6-C). A altura das plantas também foi afetada com o estresse salino, reduzindo principalmente a extensão do entrenó. As plantas controles tiveram visualmente um crescimento menor em relação as plantas transgênicas como observado na Figura 6-D.

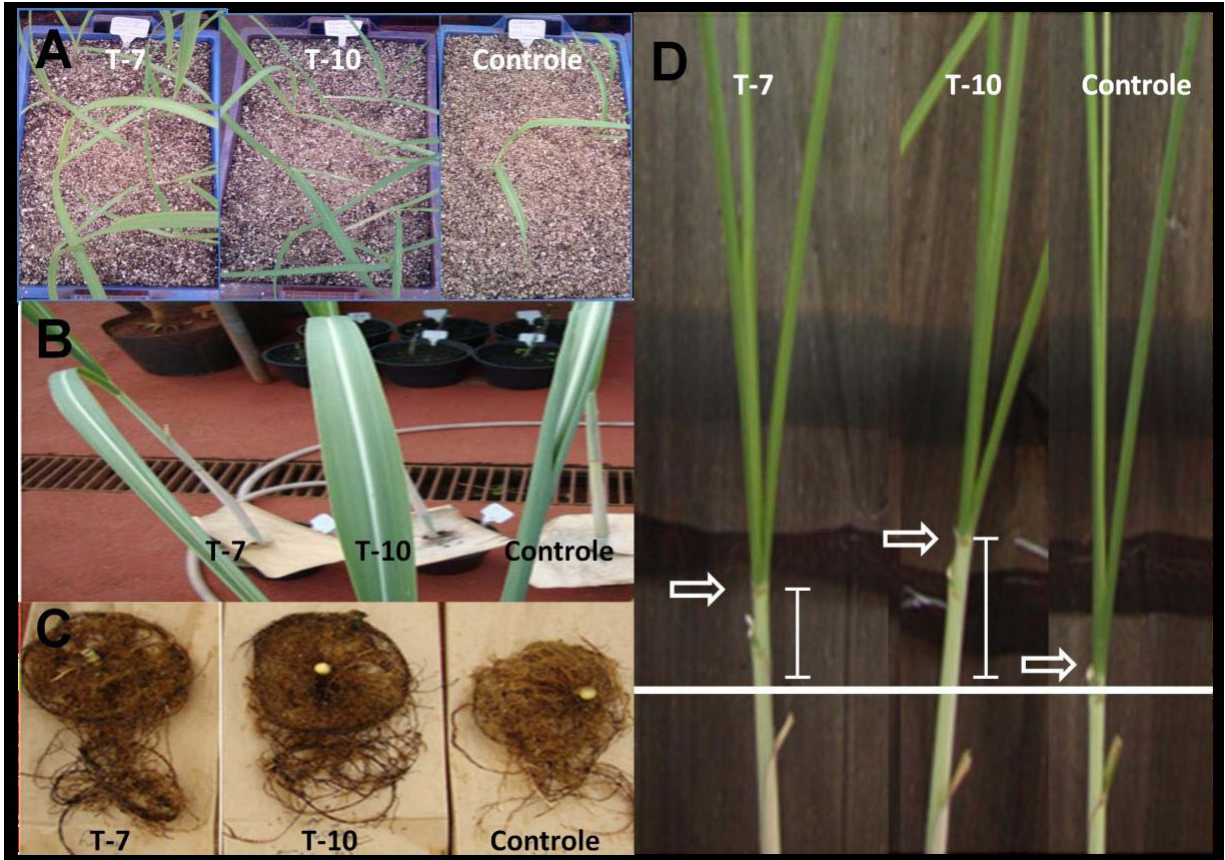


Figura 6 – Plantas de cana-de-açúcar – A - Brotação nas primeiras semanas; B - Folhas após 28 dias de estresse salino; C - Raízes após 28 dias de estresse salino; D - Altura das plantas de cana-de-açúcar dos eventos transgênicos e controle após 28 dias de estresse salino. As setas e as barras indicam a diferença de altura das plantas.

4.1 ENSAIO DE TOLERÂNCIA A SALINIDADE

4.1.1 Prolina

No início do experimento, em condições sem adição de NaCl, e no décimo oitavo dia as plantas controle e transgênicas não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de prolina livre em folhas. No decorrer do experimento de estresse salino houve um aumento gradativo e significativo nas concentrações de prolina para todas as plantas (Figura 7). No nono dia de estresse salino, o evento T7 teve um aumento significativo na concentração de prolina em relação as plantas controle e o evento T10. No vigésimo oitavo dia as plantas

transgênicas apresentaram, em média, cerca de 25% mais prolina nas folhas quando comparadas às plantas controle. Foi observado um aumento na concentração de prolina nas plantas no último dia em relação ao início do estresse de 4X mais nas plantas do evento T7 de 3X mais nas plantas do evento T10 e 2,5X mais nas plantas controle.

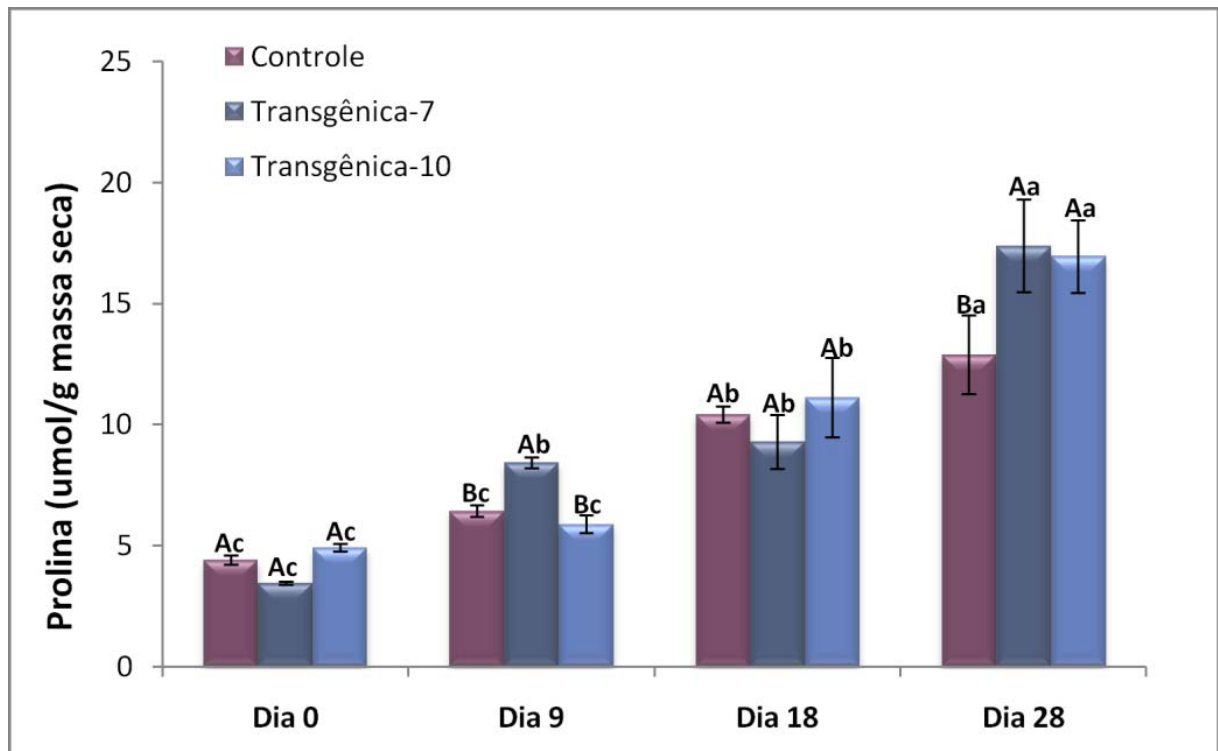


Figura 7 – Concentração de prolina em plantas controle e transgênicas submetidas a 28 dias de estresse salino. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio. Valores seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre si dentro do mesmo dia do estresse. Valores seguidos pela letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre os diferentes dias de estresse.

4.1.2 Conteúdo de Malondialdeído (MDA)

Os teores de MDA, um produto da peroxidação de lipídeos, aumentaram durante a condução do experimento de estresse (Figura 8). Os eventos transgênicos apresentaram menores níveis de acúmulo de MDA, quando

comparadas com as plantas controle à medida que o número de dias de exposição os estresse salino aumentou. No nono e no décimo oitavo dia os níveis de MDA nas plantas controle foram em média 16% maior do que nas plantas transgênicas (Figura 8).

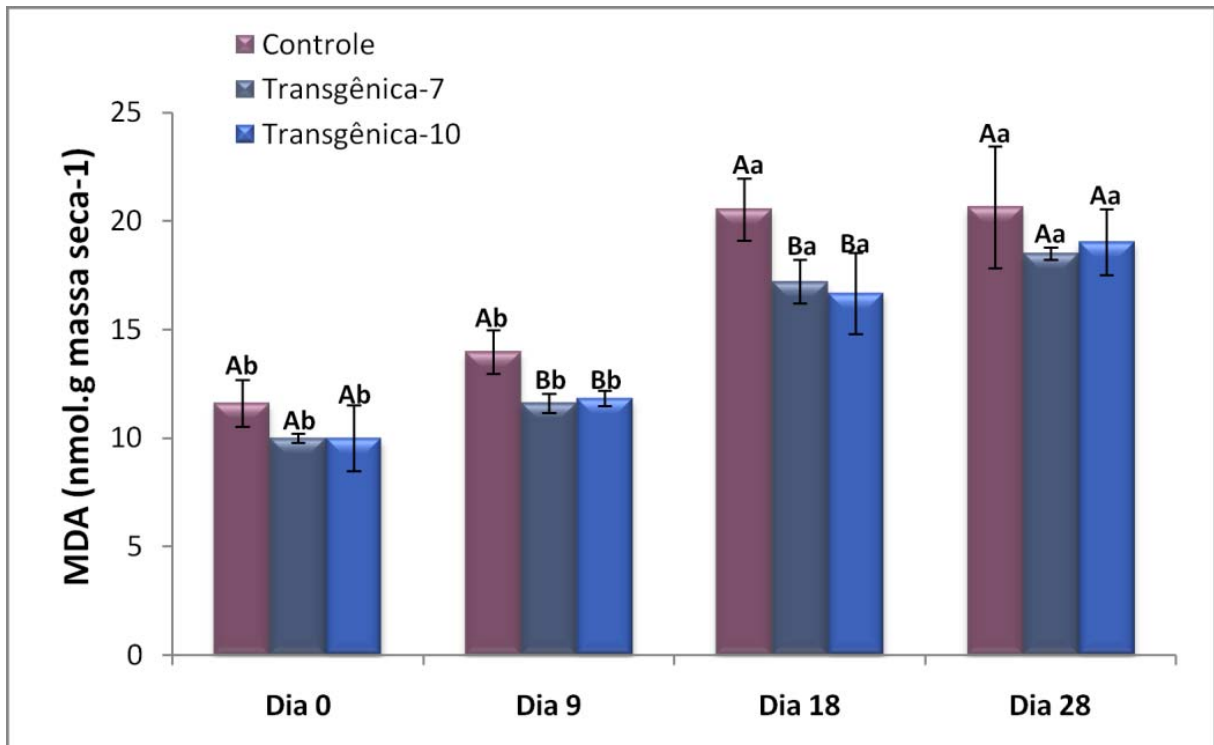


Figura 8 – Conteúdo de malondialdeído (MDA) em plantas controle e transgênicas submetidas a 28 dias de estresse salino. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio. Valores seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre si dentro do mesmo dia do estresse. Valores seguidos pela letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre os diferentes dias de estresse.

4.1.3 Fluorescência de Clorofila (F_v/F_m)

O rendimento fotoquímico das plantas (F_v/F_m) foi similar entre os eventos transgênicos e a planta controle antes do início do estresse salino. Com o estabelecimento do estresse as plantas controle sempre apresentaram um menor rendimento fotoquímico em relação às plantas transgênicas. A partir do nono dia as

diferenças dos valores de Fv/Fm foram significativos entre o evento T10 e controle. As plantas do evento T7 apresentaram valores semelhantes ao das plantas controle apenas no último dia (Figura 9).

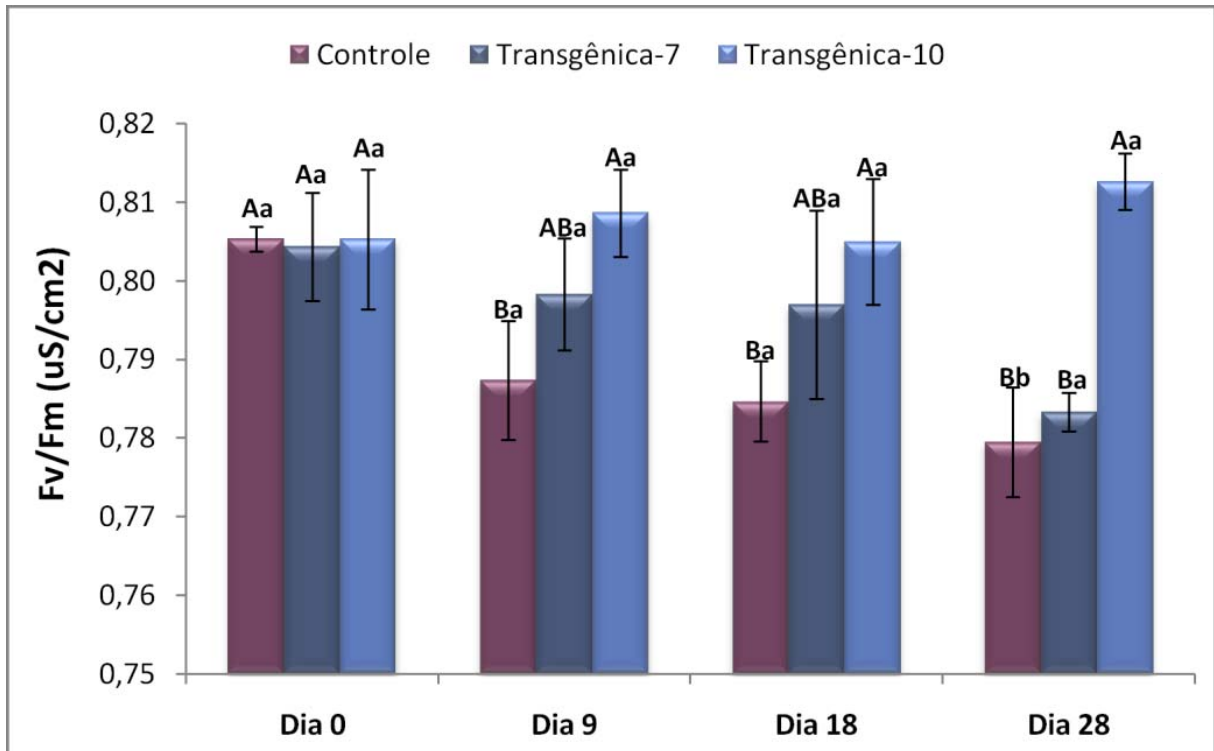


Figura 9 – Rendimento fotoquímico (Fv/Fm) em plantas controle e transgênicas submetidas a 28 dias de estresse salino. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio. Valores seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre si dentro do mesmo dia do estresse. Valores seguidos pela letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre os diferentes dias de estresse. Coeficientes de variação = 24,5%.

4.1.4 Condutância Estomática, Fotossíntese Líquida e Transpiração,

A condutância estomática, assim como as taxas de fotossíntese e de transpiração, não mostraram diferenças estatísticas entre as plantas controle e transgênicas antes do início do período de estresse salino (Figura 10-A,B,C).

Nos dias 9, 18 e 28, tanto as plantas controle como os eventos transgênicos apresentaram decréscimo acentuado nos valores de condutância estomática semelhantes, variando de 0,48 a 0,28 mols H_2O no último dia de

submissão ao estresse salino, mas sem diferenças entre si nos períodos de coleta (Figura 10-A).

A taxa de fotossíntese líquida expressa em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nos eventos T10 e controle de cana-de-açúcar mostraram maior redução com o estabelecimento do estresse. Apenas as plantas do evento T7 apresentaram maior estabilidade dos índices de fotossíntese até o dia 18 (cerca de $23 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Todas as plantas apresentaram valores semelhantes no último dia de estresse salino (Figura 10-B).

Em condições normais de cultivo, no início do experimento, as taxas de transpiração foram semelhantes para as plantas transgênicas e plantas controle, (Figura 10-C). Com o estabelecimento do estresse salino as taxas de transpiração das plantas controle diminuíram acentuadamente; já no nono dia os índices de transpiração chegaram a $7,5 \text{ mols H}_2\text{O m}^2 \text{ s}^{-1}$, sendo que a partir deste ponto houve apenas um pequeno decréscimo no último dia de coleta de dados. As taxas fotossintéticas das plantas transgênicas T7 e T10 também caíram no dia nove para $8,5$ e $9,5 \text{ mols H}_2\text{O m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente, sendo que no décimo oitavo dia as taxas de transpiração das plantas T10 foram superiores aos das plantas T7 e controle.

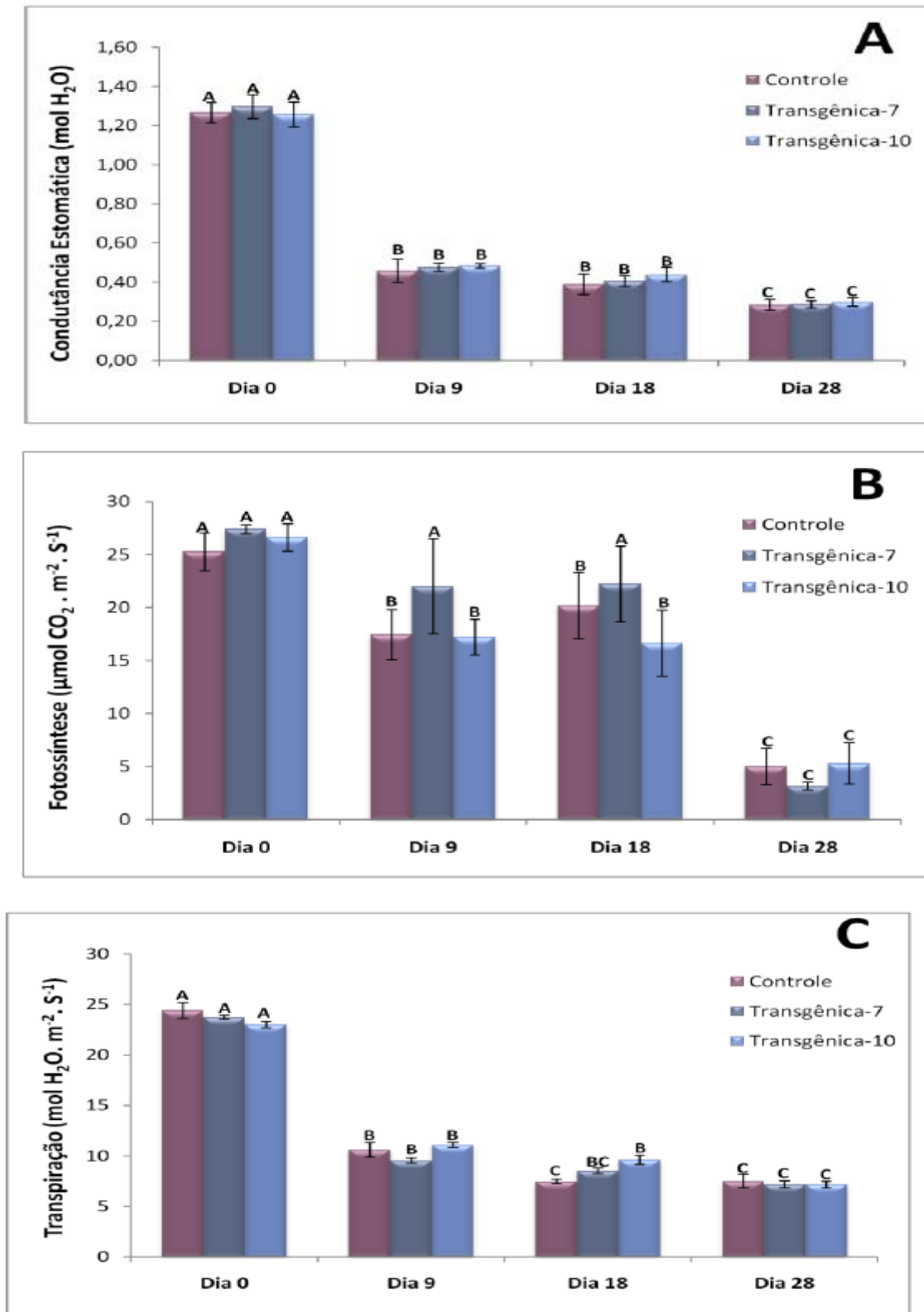


Figura 10 – A - Condutância estomática, B - Fotossíntese e C - Transpiração em plantas controle e transgênicas de cana-de-açúcar submetida a 28 dias de estresse salino. Valores são apresentados como média das repetições \pm desvio médio. Valores seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), comparando as plantas entre si dentro do mesmo dia e entre os diferentes dias de estresse.

4.1.5 Relações Hídricas nas Folhas

Em condições sem estresse salino, tanto as plantas controle como as transgênicas apresentaram potencial total da água cerca de -1,05 MPa (Figura 11-A). Nessa mesma condição, houve uma pequena diferença no valor de potencial osmótico para as plantas controle em relação ao evento T7, enquanto que o evento T10 apresentou em média o menor valor (-2,05 MPa) (Figura 11-B).

No nono dia houve uma queda acentuada nos valores do potencial da água e de potencial osmótico das plantas controle -2,35 MPa e -3,01MPa, respectivamente. Os dois eventos de transformação mostraram valores próximos em relação ao potencial de água (-1,60 MPa e -1,58 MPa). Já para os valores de pontencial osmótico, plantas do evento T7 apresentaram uma queda um pouco maior do que as do evento T10 ao final de nove dias de estresse salino (Figura 11-B).

No décimo oitavo dia as plantas do evento T7 mostraram valores de potencial de água semelhantes ao das plantas controle (cerca de -2,35 MPa), enquanto que as plantas do evento T10 apresentaram valores superiores (-1,75 MPa) (Figura 11-A). Quanto ao potencial osmótico no dia 18, as plantas controle mantiveram os valores de potencial osmótico similares aos observados no nono dia de estresse salino, e ainda menores do que os das plantas transgênicas, com destaque para as plantas do evento T10 que continuaram a manter valores superiores de potencial osmótico em relação as plantas do evento T7 (Figura 11-B).

No último dia do estresse as plantas de ambos eventos T7 e T10 e as plantas não transformadas apresentaram valores de potencial de água e de potencial osmótico semelhantes respectivamente (Figura 11-A, B).

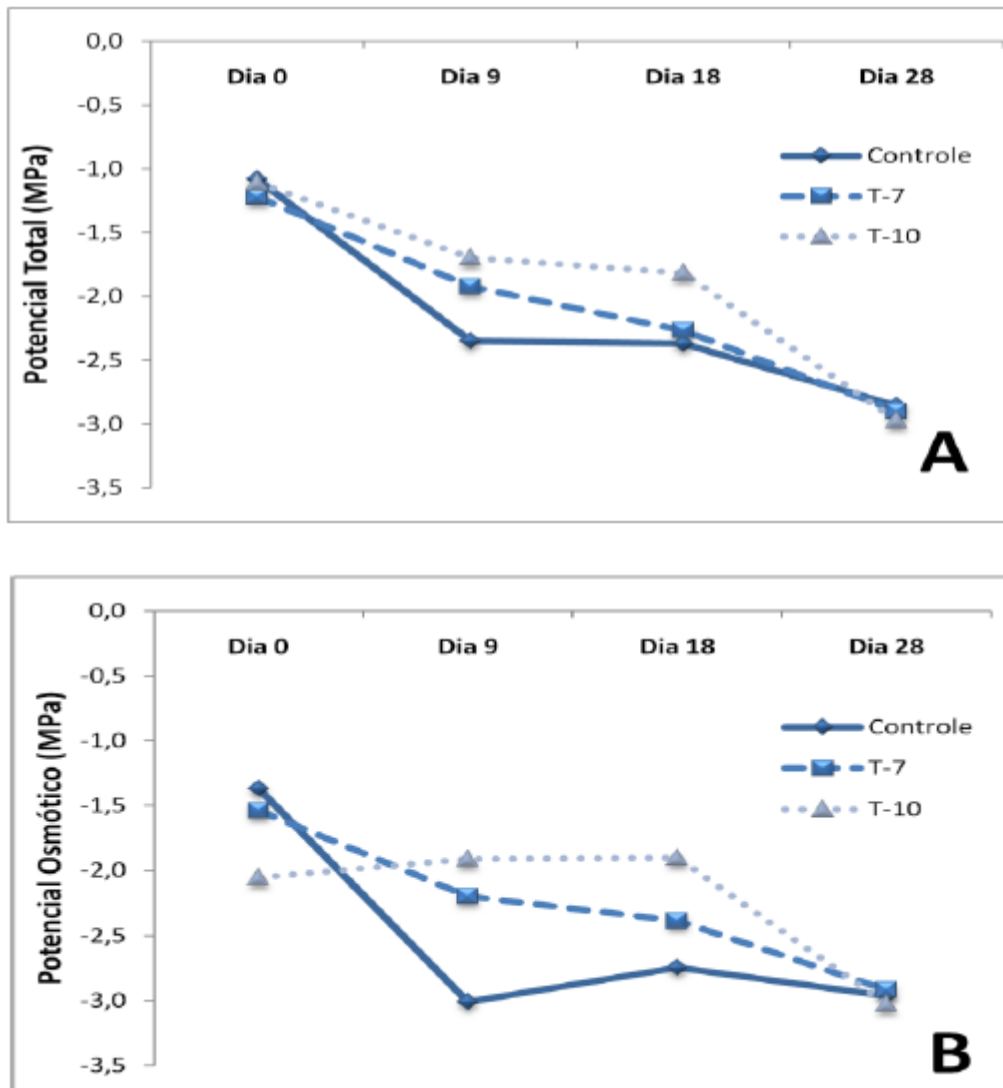


Figura 11 – A - potencial total da água e B - potencial osmótico em plantas controle e transgênicas de cana-de-açúcar submetidas a 28 dias de estresse salino. Potenciais expressos em mega pascal (MPa). Os valores são apresentados com média das repetições \pm desvio médio (Tukey; $p < 0,05$). Coeficientes de variação = 15,1% e 22,8%.

4.1.6 Concentração de Potássio e Sódio nas Folhas e Raízes

A concentração de potássio nas folhas e raízes não apresentaram diferença estatística entre as plantas transgênicas e controle após serem submetidas a 28 dias de estresse salino. Quanto à concentração de sódio, os valores observados nas raízes foram semelhantes, mas as concentrações nas folhas apresentaram diferença estatística entre as plantas controle e as transgênicas. As

plantas dos dois eventos transgênicos tiveram uma menor e similar concentração de sódio nas folhas (0,1 mg de sódio g⁻¹ de massa seca) em relação as plantas controles (0,26 mg de sódio g⁻¹ de massa seca) (Figura 12).

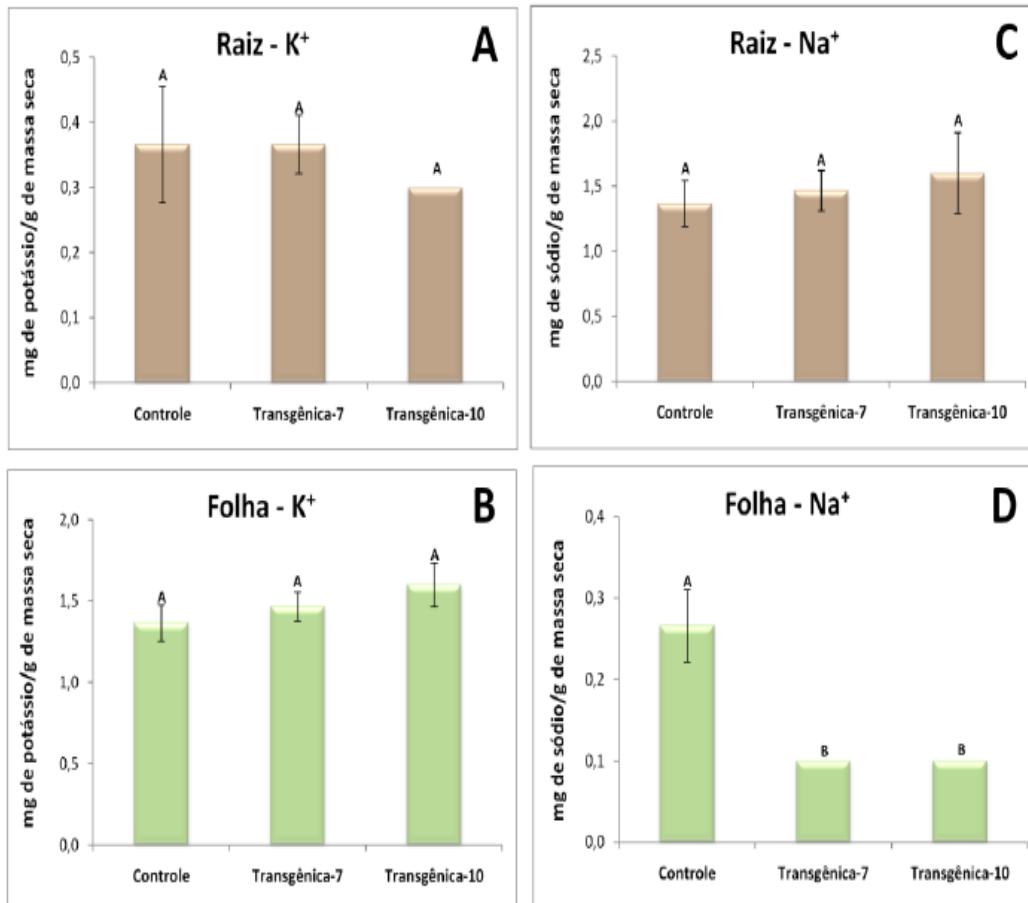


Figura 12 – Efeito do tratamento com salinidade após 28 dias de estresse das concentrações de A - potássio nas raízes; B - potássio nas folhas; C - sódio nas raízes; D - sódio nas folhas, em plantas controles e transgênicas. Quantidades expressas em mg.g⁻¹. Valores são apresentados como média das repetições ± desvio médio. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05). Coeficiente de variação: 11,36%, 14,25%, 24,96% e 25,35% respectivamente.

4.1.7 Massa Seca de Folhas de Cana-de-Açúcar

Os resultados mostram diferenças significativas de matéria seca acumulada pelas folhas para as plantas do evento T7 em relação as planta controles. As plantas do evento T7 acumularam em média 29% mais massa seca do que as

plantas controle. Apesar de não ser considerada uma diferença significativa, as plantas do evento T10 acumularam em média 13% mais massa seca em relação à planta controle (Figura 13).

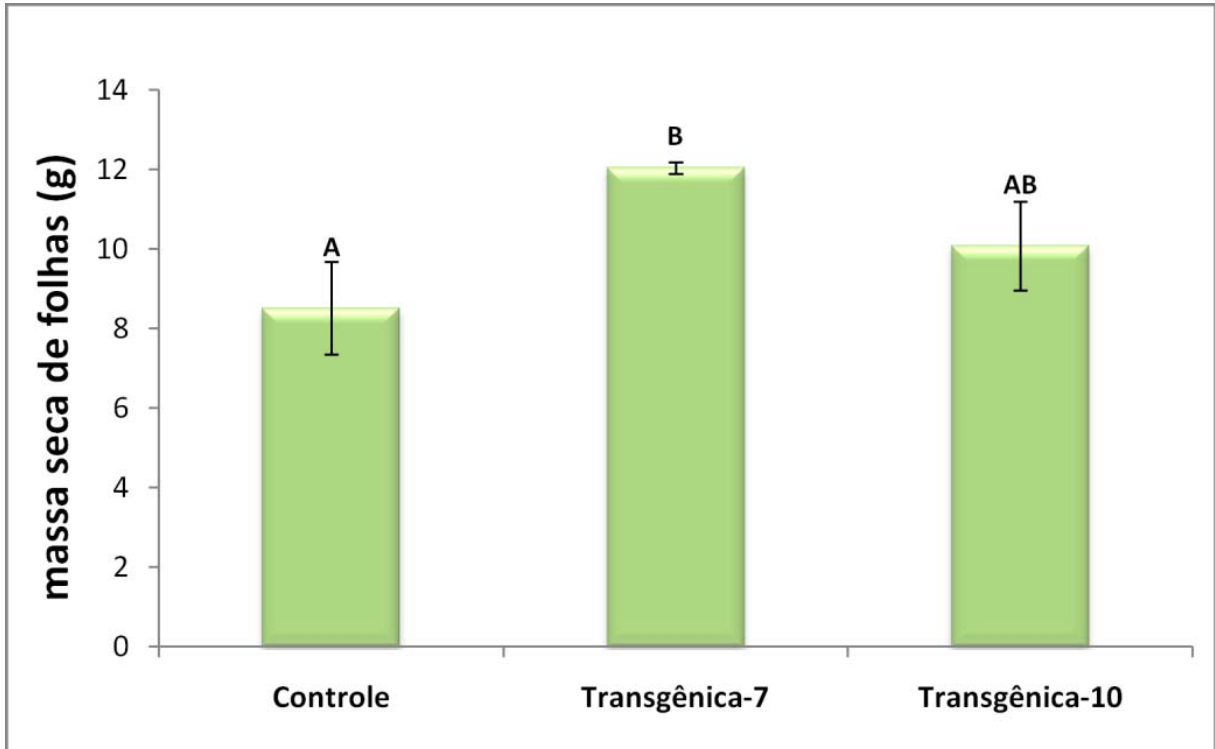


Figura 13 – Massa seca em gramas das folhas de cana-de-açúcar em plantas controle e transgênica submetidas a 28 dias de estresse salino. Os valores são apresentados com média das repetições \pm desvio médio. Valores seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O estresse salino é um importante fator abiótico limitante na produtividade das culturas. A salinidade do solo é um fenômeno complexo que envolve estresse osmótico, efeito de íons específicos, deficiência de nutrientes, entre outros fatores fisiológicos e bioquímicos que estão relacionados com o crescimento e desenvolvimento das plantas.

As plantas desenvolvem mecanismos diferentes para lidar com os efeitos prejudiciais do estresse salino (Tiwari et al., 2001). A toxicidade dos íons nas plantas sob estresse salino provoca maior dano às células vegetais do que em condições de estresse hídrico, ocasionando lesões das membranas, danos nas organelas e degradação de pigmentos antes da morte celular, danos estes bem relatados em muitas espécies de plantas, como, por exemplo, em cana-de-açúcar (Errabii et al., 2007), trigo duro (Lutts et al., 2004), lentilha (Yupsanis et al., 2001) e fumo (Gangopadhyay et al., 1997).

Plantas de cana-de-açúcar consideradas como glicófitas, apresentam um crescimento atrofiado ou nenhum crescimento em solos salinos (Subbarao; Shaw, 1985). Shrivastava et al. (1989) atribuíram essa diminuição de crescimento ao acúmulo de íons tóxicos. A salinidade na zona radicular da cana-de-açúcar diminui a produção de sacarose, a biomassa e a qualidade do suco (Lingle; Wiegand, 1996). Ainda, solos salinos reduzem a quantidade de colmos por hectare, comprimento e peso dos colmos, reduzindo a produtividade (t/ha) da cultura (Wiegand et al., 1996). A influência do solo salino sobre a produção de cana e qualidade também pode ser devido a fatores físicos, tais como o potencial hídrico dos tecidos, além dos fatores bioquímicos das plantas (Hussain et al., 2004).

Vários pesquisadores já relataram maior acúmulo de prolina em plantas transgênicas super-expressando o gene *P5CS*, conferindo maior tolerância ao estresse abiótico. Entretanto, alterações morfológicas e redução de crescimento foram observadas em plantas transgênicas de *A. thaliana* e tabaco possuindo genes osmoprotetores controlados por promotores constitutivos (Pilon-Smits et al., 1998; Kasuga et al., 1999). É provável que a superprodução constitutiva de prolina concorra por esqueletos de carbono para a síntese de proteínas e metabólitos

necessários para o crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições normais.

Além disso, altos níveis de síntese de prolina pela enzima *P5CS* podem gerar efeitos prejudiciais em certos estádios de crescimento e desenvolvimento da planta. Zhu et al. (1998) reportaram pela primeira vez, o uso do gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* sob controle de um promotor estresse induzido (AIPC) em arroz. Estas plantas acumularam altas concentrações de prolina e apresentaram melhor crescimento comparado às plantas controle. O maior acúmulo de prolina proporcionou uma melhor taxa de crescimento em plantas de arroz super-expressando o transgene *P5CS*, tanto nas cultivares *indica* e *japônica* (Zhu et al., 1998; Anoop Gupta, 2003; Su e Wu, 2004).

Tendo em vista estes resultados, o presente trabalho buscou avaliar a resposta ao estresse salino de plantas de cana-de-açúcar transformadas com o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* sob controle do promotor *AIPC*, que codifica para a enzima-chave da biossíntese da prolina.

No início do experimento foi observado uma diferença na taxa de brotação das gemas entre as plantas controle e as plantas transgênica. As plântulas transgênicas sempre apresentaram-se maiores nos primeiros meses após a brotação. O efeito regulatório do metabolismo da prolina no estímulo da germinação de sementes de *Arabidopsis* foi descrito por Hare et al. (2003), que sugeriram uma ligação funcional entre a biossíntese de prolina e o aumento da atividade da Via da Pentose Fosfato na promoção da germinação de sementes. O estímulo da brotação de gemas de cana-de-açúcar observado nas plantas transgênicas deu-se somente nas primeiras semanas após o plantio dos toletes, pois nenhuma diferença morfológica foi observada nas plantas dos dois eventos transgênicos quando comparadas às plantas não transformadas após dois meses em casa-de-vegetação sob condições normais de cultivo. Aparentemente, a expressão do gene *P5CS* sob controle do promotor estresse induzido AIPC não produziu efeitos pleiotrópicos no crescimento e desenvolvimento das plantas em condições normais.

Em cana-de-açúcar, há muitos relatos de estudos sobre o acúmulo de prolina em calos, plântulas e de plantas em ensaios a campo, quando expostos ao estresse salino (Wahid 2004; Gandonou et al., 2006; Patade et al., 2008) e déficit hídrico (Errabii et al., 2006; Molinari et al., 2007). No caso do estresse salino, o conteúdo de prolina em plantas expostas a tratamentos com NaCl alcançou

concentrações maiores do que em plantas expostas ao tratamento com déficit hídrico (Errabii et al., 2007). Cha-um e Kirdmanee (2009) demonstraram em estudos com plântulas de cana-de-açúcar que o acúmulo de prolina foi dependente do tipo do estresse (salino ou hídrico), sendo observado maior acúmulo de prolina em condições de estresse salino. O mesmo ocorreu neste estudo, onde as plantas tiveram maiores acúmulo de prolina no último dia do estresse salino (200 mM de NaCl), sendo que as plantas transgênicas tiveram valores superiores ao das plantas não transformadas.

Anoop e Gupta (2003), relataram quase 2X mais acúmulo de prolina em linhagens de arroz transformados com o gene *P5CS* sob estresse salino com 200 mM de NaCl. Kumar et al. (2010), confirmou os dados obtidos por Anoop e Gupta (2003), avaliando plantas de arroz na geração T1, transformadas também com o gene *P5CS* dirigido pelo promotor constitutivo *CaMV35S*, sob estresse salino a 150 mM de NaCl. Molinari et al. (2007) observaram que em plantas de cana-de-açúcar transgênicas a expressão do gene *P5CS* controlada pelo promotor *AIPC* induzida por déficit hídrico aumentou de 2 a 2,5X os níveis de prolina nos diferentes eventos transgênicos analisados. As plantas transgênicas avaliadas no presente trabalho submetidas a 28 dias de estresse salino apresentaram níveis de prolina menores comparado ao relatado por Molinari et al. (2007), em plantas submetidas a 12 dias ao estresse hídrico. Vários fatores podem ser responsáveis pela diferença dos teores de prolina encontrados neste trabalho em comparação aos obtidos por Molinari et al. (2007), como nível e intensidade do estresse aplicado, idade das plantas, condições nutricionais, respostas metabólicas e fisiológicas ao estresse salino e osmótico, entre outros. Também, a acumulação de outros osmólitos, como a glicina betaína e açúcares solúveis, que desempenham papéis importantes no ajustamento osmótico em cana e na defesa contra o estresse salino podem ter influenciado os níveis de acúmulo da prolina (Wahid 2004; Gandonou et al. 2006; Patade et al. 2008).

Radicais livres são formados durante estresse osmótico (Hong et al., 2000). Estes radicais podem reagir com muitos componentes celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídeos, levando a processos da cadeia de radical, ligações cruzadas, vazamento de membrana, e produção de compostos tóxicos (Davies, 1995). Os ácidos graxos poli-insaturados são os principais componentes de membranas presentes em plantas, e são particularmente suscetíveis à oxidação por

$^1\text{O}_2$ e OH^- . Os produtos da oxidação desses ácidos graxos envolvem uma série de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos como o malondialdeído (MDA) (Ilangoan et al., 2006). O MDA tem sido amplamente utilizado para avaliar os níveis de radicais livres nas células vivas (Kunert e Ederer, 1985).

Hong et al. (2000) observaram que os níveis de MDA aumentaram significativamente com a concentração de NaCl em células de fumo BY2 (Bright Yellow 2) tratadas com 250 mM de NaCl. Os altos níveis de prolina acumulado pelas plantas de tabaco e trigo transformadas com o gene *P5CSF129A* reduziram os níveis de radicais livres mensurados pelo conteúdo de MDA em resposta ao estresse osmótico (Parvanova et al., 2004; Vendruscolo et al., 2007). Neste estudo, a alteração nos níveis de MDA em plantas controle ocorreu já aos nove dias após o início do estresse salino, atingindo valores máximos no estresse severo (28 dias). As plantas transgênicas, entretanto, tiveram os níveis de MDA elevados somente em estresse mais severo, mas ainda com valores significativamente menores do que em plantas controle. Estes resultados demonstram o papel da prolina no combate aos radicais livres nas células expostas à salinidade da mesma forma como observado por Molinari et al. (2007) em cana-de-açúcar sob condições de estresse hídrico. Estes autores observaram que o aumento da prolina presente em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico atuou mais como um agente antioxidante do que como um osmoprotetor. Assim, o aumento do teor de prolina nas plantas transgênicas provavelmente atuou na proteção contra a peroxidação lipídica, por ativar ou mesmo atuar diretamente na remoção das ROS.

Uma maneira eficiente de monitorar danos foto-oxidativos causados pelo estresse hídrico tem sido o uso de medidas da fluorescência da clorofila a associada ao fotossistema II (Newton; McBeath, 1996). A fluorescência de clorofila (F_v/F_m) em genótipos de cana-de-açúcar tolerantes à salinidade e à seca manteve melhor a razão F_v/F_m do que nos genótipos sensíveis, ou seja tiveram menor danos foto-oxidativos (Wahid Ghazanfar, 2006; Silva et al., 2007). Estes resultados corroboram com os parâmetros associados à emissão da fluorescência (F_v/F_m) obtidos no presente estudo. Enquanto as plantas controle apresentaram danos foto-oxidativos já a partir do nono dia de estresse salino, monitorados pela fluorescência da clorofila a, os eventos transgênicos mostraram menor queda na razão F_v/F_m sob estresse salino nos primeiros dias de amostragem (dias 9 e 18 após o início do estresse).

Reduções na taxa fotossintética líquida, condutância estomática, e na taxa de transpiração em função do estresse salino são consistentes com os resultados em arroz (Moradi; Ismail, 2007). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a condutância estomática e a transpiração decresceram acentuadamente já no primeiro ponto de coleta (9 dias). Estes dados confirmam observações sobre a drástica e facilmente mensurável diminuição na abertura estomática em resposta à salinidade que é induzida pelo efeito osmótico do sal nas raízes (Termaat et al., 1985). A salinidade afeta em primeiro lugar a condutância estomática devido à síntese de ABA. Um aumento de ABA foi detectada nos tecidos fotossintéticos de cevada expostos a uma solução de 100 mM de NaCl por 10 min, sendo que o aumento na síntese de ABA foi mais rápido do que o transporte de NaCl das raízes para as células (Fricke et al., 2004).

Com o estabelecimento do estresse salino as plantas transgênicas e controle tiveram suas taxas de transpiração bruscamente diminuídas, sendo que no último dia do estresse (28 dias) tiveram valores semelhantes e próximos de $7,5 \text{ mols H}_2\text{O m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Em arroz a diminuição da taxa de transpiração foi atribuída ao aumento da salinidade rizosférica, o que levou a um menor potencial de água nas raízes (Zheng et al., 2001).

Quanto à taxa fotossintética, apenas o evento transgênico T7 mostrou índices melhores que as plantas controle não transformadas nos dias 9 e 18. As possíveis causas para a inibição da fotossíntese incluem fechamento dos estômatos, inibição por retroalimentação devido à reduzida atividade de dreno, diminuição da eficiência da Rubisco, deslocamento de cátions essenciais na estrutura da endo-membrana, levando a alterações na permeabilidade (Flowers; Yeo, 1981). Também, os efeitos do sal sobre a condutância estomática através da redução do turgor das células guardas são importantes na inibição da fotossíntese (Dionísio-Sese; Tobita 2000). As taxas fotossintéticas no último dia de estresse chegaram a níveis em torno de $3 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ nas plantas T7 e $5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ nas plantas T10 e controle, mostrando que as plantas atingiram limitações severas da atividade fotossintética. Estes dados estão em concordância com os resultados de condutância estomática e de transpiração observadas no último dia do estresse salino. A degradação de clorofila causada pelo estresse osmótico em plântulas de cana é um fator importante na limitação da atividade fotossintética,

fechamento estomático e a taxa de transpiração, levando à redução do crescimento em estudos apresentados por (Cha-um; Kirdmanee, 2009).

O potencial hídrico total das folhas de cana-de-açúcar diminuiu com o aumento da salinidade, o que implica que os vegetais sofreram limitação da disponibilidade de água nas células (Munns, 2002). Molinari et al. (2004) trabalhando com plantas transgênicas de Carrizo citrange transformadas com o gene *P5CS* sob o controle do promotor constitutivo *35S*, mostraram que a manutenção do turgor nas plantas transgênicas sob estresse hídrico severo pôde ser mantida pelo abaixamento do potencial osmótico (ajustamento osmótico). Neste caso, o acúmulo de prolina sob condições de estresse hídrico contribuiu para diminuir o potencial osmótico e, conseqüentemente, manter a pressão de turgor nas células. No presente trabalho, a presença de níveis mais altos de prolina nessas plantas contribuiu para a redução do potencial osmótico nas plantas transgênicas de cana-de-açúcar resultante da perda de água das células até o décimo oitavo dia após o início do estresse salino. Plantas de trigo duro após o quinto dia de germinação sob estresse hídrico e salino mostraram maior redução no potencial de água nas folhas, durante o estresse salino (Mattioni et al., 1997). Em contraste o potencial osmótico foi mais negativo durante o estresse salino chegando a valores de -1,55 MPa depois de 72 horas em tratamento com 200 mM de NaCl. Neste trabalho, as plantas de cana-de-açúcar dos eventos transgênicos e do controle tiveram maior redução do potencial de água no último dia de estresse salino. Já o potencial osmótico foi mais negativo para as plantas controle no nono dia chegando a valores de - 3,01 MPa em soluções com 100 mM de NaCl, sendo que as plantas transgênicas atingiram esses valores apenas no vigésimo oitavo dia em tratamento com 200 mM de NaCl.

Sabe-se que plantas sob salinidade acumulam mais Na^+ , fazendo com que haja um distúrbio na homeostase iônica que afeta o estado nutricional da planta, especialmente pela menor absorção de Ca^+ e K^+ . O efeito negativo da salinidade sobre a absorção de K^+ foi relatado por Carjaval et al. (2000) e Ghoulam et al. (2002). Neste trabalho, as concentrações de K^+ obtidas nas folhas e raízes de cana-de-açúcar não diferiram entre as plantas controle e os eventos transgênicos.

As folhas são mais vulneráveis ao estresse salino do que as raízes devido ao acúmulo de Na^+ ser maior na parte aérea do que nas raízes (Tester; Davenport, 2003). Houve menor acúmulo de sódio nas folhas em relação às raízes, sugerindo que a prolina afeta diretamente o transporte de Na^+ para as folhas.

Naeem et al. (2010) mostrou que a absorção seletiva de K^+ foi evidente nas folhas e raízes das plantas de colza sob salinidade. Embora a salinidade não afetasse a absorção de K^+ , o teor de Na^+ aumentou significativamente nas folhas e nas raízes, aumentando a razão entre Na^+/K^+ nesses tecidos. Uma razão de Na^+/K^+ igual ou menor do que 0,6 é necessário para uma ótima eficiência metabólica em plantas não-halófitas (Greenway; Munns, 1980). Os dados obtidos neste trabalho mostraram que a razão entre Na^+/K^+ nas folhas foi de 0,2 para as plantas controle e 0,06 para as plantas transgênicas (dados não apresentados).

É notório haver alto coeficiente de correlação entre os caracteres fisiológicos e desempenho de crescimento, incluindo área foliar, biomassa e a altura das plantas de cana-de-açúcar (Smit; Singels, 2006; Wahid Ghazanfar, 2006; Silva et al., 2007). Hussain et al. (2004), ao comparar o crescimento de duas variedades de cana-de-açúcar em diferentes concentrações de NaCl depois de três meses de crescimento, observaram mínima redução no comprimento dos colmos a 50 mM NaCl, alcançando até 71% de redução em tratamento com 200 mM de NaCl. Neste estudo, embora somente o evento T7 tenha apresentado diferença estatística significativa, foi observado que os dois eventos de transformação mostraram aumento da massa seca das folhas em relação ao controle não transformado. Este evento, em comparação com as plantas controle e o evento T10, apresentou melhor eficiência fotoquímica do fotossistema II e taxa fotossintética nos períodos iniciais de estresse (dias 9 e 18), o que pode ter permitido o maior acúmulo de massa seca foliar. O comportamento dissimilar entre eventos transgênicos é comum, como exemplificado por Kumar et al. (2010) que observaram menor biomassa em uma única linhagem transgênica de arroz transformadas com o gene *P5CSF129* sob promotor constitutivo *CaMV 35S* comparada com plantas não transformadas sob estresse salino. Eles observaram que os níveis de prolina acumulados por esta linhagem transgênica não foram suficientes para combater os efeitos induzidos pelo estresse principalmente os altos níveis de peroxidação de lipídios. Além disso, pode haver o envolvimento de outros mecanismos endógenos de tolerância ao estresse, além de acúmulo de prolina, que podem variar de planta para planta (Kumar et al., 2010)

Entretanto o maior acúmulo de prolina observado nos dois eventos de transformação de cana-de-açúcar usados neste trabalho provavelmente auxiliou a na manutenção nas taxas de fotossíntese durante o estresse salino, sendo

condizente com os dados obtidos para fluorescência de clorofila. Estes parâmetros podem estar relacionados com o maior acúmulo de massa seca observado nas folhas das plantas transgênicas, conferindo um maior tamanho de planta em relação às controle não transformadas. Su e Wu (2004) também observaram maior tolerância em arroz transgênicos transformados com gene *P5CS*, mostrando maior acúmulo de prolina tanto em estresse com NaCl ou deficiência de água, e apresentando um crescimento mais rápido da parte aérea e raízes em comparação com plantas não transformadas. Kumar et al. (2010) atribuíram a melhor germinação e maior produção de biomassa ao acúmulo de prolina em plantas de arroz transgênicas transformadas com *P5CS* sob promotor constitutivo.

Finalmente, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que a prolina contribuiu para o melhor desenvolvimento de plantas transgênicas de cana-de-açúcar com o gene *P5CS* (Δ 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase) de *Vigna aconitifolia* sob controle de um promotor estresse induzido AIPC (*ABA inducible promoter complex*) sob condições de estresse salino devido ao menor acúmulo de Na⁺ nas folhas, proteção do aparelho fotossintético e capacidade de evitar danos oxidativos.

CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios de tolerância ao estresse salino em plantas de cana-de-açúcar transformadas com gene que codifica para a enzima-chave da biossíntese da prolina sob controle do complexo promotor estresse induzido *AIPC* mostraram que:

i. O acúmulo de prolina em plantas transgênica de cana-de-açúcar contribuiu para a proteção contra a peroxidação lipídica resultante de estresse oxidativo induzido por estresse salino, principalmente no início do estresse (9 e 18 dias);

ii. Os resultados sugerem a participação da prolina na proteção do aparelho fotossintético resultante do melhor rendimento quântico sobre o estado de energia dos cloroplastos.

iii. Potencial total e potencial osmótico foram melhores em plantas de cana-de-açúcar transgênica em relação às plantas controle durante o estresse salino.

iv. Plantas transgênicas de cana-de-açúcar com maior teor de prolina interferiu no acúmulo de Na^+ nas folhas de cana-de-açúcar

REFERÊNCIAS

- ABLE, A. J.; SUTHERLAND, M. W.; GUEST, D. I. Production of reactive oxygen species during non specific elicitation, non host resistance and field resistance expression in cultures of tobacco cells. **Functional Plant Biology**: 30, 91- 99, 2003.
- AKHTAR, S.; WAHID, A.; RASUL, E. Emergence, growth and nutrient composition of sugarcane sprouts under NaCl salinity. **Biologia Plantarum**: 46, 113-116, 2003.
- ALCOPAR (Associação de Produtores de Álcool e açúcar do Estado do Paraná). Disponível em: <<http://www.alcopar.org.br>>. Acesso em: mar. 2010.
- ALLEN, R. D.; WEBB, R. P.; SCHAKE, S. A. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. **Free Radical Biology and Medicine**: 23, 473–479, 1997.
- ALIA MOHANTY, P.; MATYSIK, J. Effect of proline on the production of singlet oxygen. **Amino Acids**: 21, 195-200, 2001.
- AMTMANN, A. E.; SANDERS, D. Mechanisms of Na⁺ uptake by plant cells. **Advance Botanical Research**: 29, 75–112, 1999.
- ANOOP, N.; GUPTA, A. K. Transgenic indica Rice cv IR-50 over-expressing *Vigna aconitifolia* pyrroline-5-carboxilate synthetase cDNA shows tolerance to high salt. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**: 12, 109-116, 2003.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Plant Biology**: 55, 373–99, 2004.
- ASHRAF, M. Salt tolerance of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) at three growth stages. **Annals of Applied Biology**: 124, 153-164, 1994.
- BATES, L. S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**: 39, 205-207, 1973.
- BAKKER, H. **Sugar cane cultivation and management**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
- BEN (Balanço Energético Nacional). Disponível em: <<http://www.epe.gov.br>>. Acesso em: mar. 2010.
- BELKHODJA, R.; MORALES, F.; ABADÍA, A. Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiology**: 104, 667-673, 1994.

BLACKBURN. Determination of true chloride content of biological fluids and tissues Sugarcane. Analysis of simple non-isotopic methods. Longman. London, UK. 47–52 Cotelov E 1963. II. **Analytical Chemistry**: 35, 101–105, 1984.

BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Current Opinion in Cell Biology** : 12, 431–434, 2000.

BOWER, R.; BIRCH, R. G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **Plant J.**: 2, 409–416, 1992.

BOHNERT, H. J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Science. Horticultural**: 78, 237–260, 1999.

BORSANI, O.; ZHU, J.; VERSLUES, P. E.; SUNKAR, R.; ZHU, J. K. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cisantisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. **Cell**: 123, 1279–1291, 2005.

BRESSAN, R. A.; ZHANG, C.; ZHANG, H.; HASEGAWA, P. M.; BOHNERT, H. J.; ZHU, J. K. Learning from the Arabidopsis experience. The next gene search paradigm. **Plant Physiol**: 127, 1354–1360, 2002.

BRESSAN, R. A.; BOHNERT, H. J.; HASEGAWA, P. M. Genetic Engineering for Salinity Stress Tolerance. **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**. Vol. 1, 348-374, Cap. 12, 2008.

CÂMARA, G. M. S. Ecofisiologia da cultura da cana-de-açúcar. In: CÂMARA, GMS. **Produção da cana-de-açúcar**. [s.l.] ESALQ , 31-64, 1993.

CASAGRANDE, A. A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP. 1991.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Embrapa.

CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plantlets in response to iso-osmotic salt and water-deficit stress. **Agricultura Sciences in China**: 8, 51-58, 2009.

CONAB (Campanha Nacional de Abastecimento). Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: marc. 2010.

CRAMER, G. R. Response of abscisic acid mutants of Arabidopsis to salinity. **Functional Plant Biology**: 29, 561–67, 2002.

CUADRADO, A.; ACEVEDO, R.; MORENO DI'AZ DE LA ESPINA, S.; JOUVE, N.; DE LA TORRE, C. Genome remodeling in three modern *S. officinarum* & *S. spontaneum* sugarcane cultivars. **Journal of Experimental Botany**: 55, 847–854, 2004.

DAVIES, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochemical Society Symposia**: 61, 1–31, 1995.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D.P.S. A soybean Δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase gene was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. **Molecular and General Genetics**: 221, 299-350, 1990.

DEMIRAL, T.; TURKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in root of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**: 53, 247-257, 2005.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N., GLASZMANN, J.C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics**: 250, 405-413, 1996.

DILLEWIJN, C. V. **Botany of sugarcane**. Waltham: Chronica Botânica, 1952.

DIONISIO-SESE, M. L.; TOBITA, S. Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. **Plant Physiology**: 157, 54–58, 2000.

ELLUL, P.; RIOS, G.; ATARES, A., ROIG, L. A.; SERRANO, R.; MORENO, V. The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun. & Nakai.]. **Theoretical and Applied Genetics**: 107, 462–469, 2003.

ERRABII, T.; GANDONOU, C. B.; ESSALMANI, H.; ABRINI, J.; IDOMAR, M.; SENHAJI, N. S. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. **African Journal of Biotechnology**: 5, 1148-1493, 2006.

ERRABII, T.; GANDONOU, C. B.; ESSALMANI, H.; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; SENHAJI, N. S. Effect of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. **Physiologia Plantarum**: 29, 95-102, 2007.

FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação). Disponível em: <<http://www.fao.org.br>>. Acesso em: mar. 2010.

FERREIRA, W. A. **Efeito da vinhaça em solos de diferentes texturas**. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1980. 67p.

FEARP (Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade de Ribeirão Preto da USP). Disponível em: < <http://www.fearp.usp.br/>>. Acesso em: jan. 2010.

FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F.; YEO, A. R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Plant Physiol**: 28, 89–12, 1977.

FLOWERS, T. J.; HAJIBAGHERI, M. A.; CLIPSON, N. J. W. Halophytes. **The Quarterly Review of Biology**: 61, 313 – 337, 1986.

LOWERS, T. J. Dalmond D. Protein synthesis in halophytes the influence of potassium, sodium and magnesium in vitro. **Plant and Soil**: 146, 153 - 161, 1992.

FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal Experimental Botany**: 55, 1–13, 2004.

FLOWERS, T. J.; YEO, A. Breeding for salinity resistance in crops Where next? **Australian Journal Plant Physiol.**: 22, 875-884, 1995.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant Cell Environment**: 28, 1056–71, 2005.

FRICKE, W.; PETERS, W. S. The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. **Plant Physiol**: 129, 374–88, 2002.

FRICKE, W.; AKHIYAROVA, G.; VESELOV, D.; KUDOYAROVA, G. Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate response to salinity in barley leaves. **Journal Experimental Botany**: 55,1115–23, 2004.

GANGOPADHYAY, G.; BASU, S.; MUKHERJEE, B. B.; GUPTA, S. Effects of salt and osmotic shocks on unadapted and adapted callus lines of tobacco. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**: 49, 45-52, 1997.

GANDONOU, C. B.; ERRABII, T.; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; SENHAJI, N. S. Selection of callus cultures of sugarcane (*Saccharum* sp.) tolerant to NaCl and their responses to salt stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**: 87, 9-16, 2006.

GARG, A. K.; KIM, J. K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. D.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**: 99, 15898–15903, 2002.

GARNCZARSKA, M.; BEDNARSKI, W.; MORKUNAS, I. Re-aeration-induced oxidative stress and antioxidative defenses in hypoxically pretreated lupines roots. **Journal Plant Physiol**: 161, 415-422, 2004.

GINOZA, H.; MOORE, P.H. Screening sugarcane varieties for tolerance to salinity. **Report of the Hawaiian Sugar Technologists**: 43. FE5-FE6. 1985.

GOMATHI, R.; THANDAPANI, T. V. Salt stress in relation to nutrient accumulation and quality of sugarcane genotypes. **Sugar Tech**: 7, 39-47, 2005.

GOFF, S. A.; RICK, D.; LAN, T. H.; PRESTING, G.; WANG, R.; DUNN, M.; GLAZEBROOK, J.; SESSIONS, A.; OELLER, P.; VARMA, H.; HADLEY, D.; HUTCHISON, D. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). **Science**: 296, 92–100, 2002.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. **Plant Physiol**: 31, 149–190, 1980.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of Osmolyte accumulation during stress. **Plant Cell Environmen**: 21. 535-554, 1998.

HARE, D.; CRESS, W. A.; VAN STANDEN, J. A regulatory role for proline metabolism in stimulin *Arabidopsis thaliana* seed germination. **Plant Growth Regulation**: 39, 41-50, 2003.

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

HEATH, R.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**: 125, 189-198, 1968.

HEINZ, D. J.; MEE, G. W. P. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. **Crop Science**: 9, 346–348, 1969.

HERNÁNDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMÉNEZ, A.; BARCELÓ, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O²-/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiol**: 127, 817 – 831, 2001.

HOGARTH, D. M. Genetics of sugarcane. In: D. J. HEINZ (ed), **Sugarcane Improvement Through Breeding**: 255 - 272, 1987.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**: 66, 300–372, 2002.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiol**: 122, 1129–1136, 2000.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**: 66, 300–372, 2002.

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

HUSSAIN, A.; KHAN, Z. I.; ASHRAF, M.; RASHID, M. H.; AKHTAR, M. S. Effect of Salt Stress on Some Growth Attributes of Sugarcane Cultivars CP-77-400 and COJ-84. **International Journal of Agriculture & Biology**: 6, 188–191, 2004.

INAN, G.; ZHANG, Q.; LI, P.; WANG, Z.; CAO, Z.; ZHANG, H.; ZHANG, C.; QUIST, T. M.; GOODWIN, S. M.; ZHU, J.; SHI, H.; DAMSZ, B. Salt cress. A halophyte and cryophyte Arabidopsis relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. **Plant Physiol**: 135, 1718–1737, 2004.

JACOBY, B. Mechanisms involved in salt tolerance by plants. **Handbook of Plant and Crop Stress**. M. Pessarakli. ed. Marcel Dekker, New York. NY, USA. 1999.

KARIM, S.; ARONSSON, H.; ERICSON, H.; PIRHONEN., LEYMAN, B.; WELIN, B.; MANTYLA, E.; PALVA, E. T.; VAN DIJCK, P.; HOLMSTROM, K-O. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalose. **Plant Molecular Biology**: 64,371–386, 2007.

KASUGA, M.; LIU, Q., MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature Biotechnology**: 17, 287–291, 1999.

KHEDR, A. H .A; ABBAS, M. A.; WAHID, A.A.A.; QUICK, W.P. ; ABOGADALLAH, G.M. Proline induces the expression of salt-stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L., to salt-stress. **Journal of Experimental Botany**: 54, 2553-62, 2003.

KISHOR, P. B. K.; HONG, Z.; MIAO, C. H.; HU, C. A. A; VERMA, D. P. S. Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase Increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**: 108, 1387–1394, 1995.

KIYOSUE, T.; YOSHIBA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A nuclear gene, encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. **Plant Cell**: 8, 1323-1335, 1996.

KUMAR, V.; SHRIRAM, V.; KAVI KISHOR, P. B.; JAWALI, N.; SHITOLE, M. G. Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by over-expressing P5CSF129A gene. **Plant Biotechnology Reports**: 4, 37–48, 2010.

KUNERT, K. J.; EDERER, M. Leaf aging and lipid peroxidation: the role of antioxidants vitamin C and E. **Physiol Plant**: 65, 85–88, 1985.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; CHRISTOPHER, L. P. G.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R. Invited Review: Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**: 41, 345–363, 2005 Society for In Vitro Biology.

LALIBERTE, G.; HELLEBUST, A. J. Pyrroline-5-Carboxylate Reductase in *Chlorella autotrophica* and *Chlorella saccharophila* in Relation to Osmoregulation. **Plant Physiol**: 91, 917-923, 1989.

LÄUCHLI, A.; EPSTEIN, E. Plant responses to saline and sodic conditions. In: TANJI, K.K. (Ed.) **Agricultural salinity assessment and management**.,. 6, 113-1137, 1990.

LEE, E. K.; KWON, M.; KO, J. H.; YI, H.; HWANG, M. G.; CHANG, S.; CHO, M. H. Binding of sulfonyleurea by AtMRP5, an *Arabidopsis* multidrug resistance-related protein that functions in salt tolerance. **Plant Physiol**: 134, 528–538, 2004.

LI, J.; LEE, Y.R.J.; ASSMANN, S.M. Guard cells possess a calcium dependent protein kinase that phosphorylates the KAT1 potassium channel. **Plant Physiol**: 116, 785-795, 1998.

LINGLE, S. E.; WIEGAND, C. L. Soil salinity and sugarcane juice quality. **Crops Research**: 54, 259-268, 1997.

LINGLE, S. E.; WIEGAND, C. L. Growth and yield responses of sugarcane to saline soil: Sucrose biochemistry in individual internodes. **Proc. Inter American Sugarcane Seminars**: II, 93-102, 1996.

LIU, Q.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **Plant Cell**: 10, 1391–1406, 1998.

LOGAN, B. A. Reactive oxygen species and photosynthesis. In: Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, ed. N Smirnov. Oxford: **Blackwell**: 250 – 67, 2005.

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

MAAS, E. V.; HOFFMAN, G. J. Crop Salt Tolerance. **Tese**. U.S. Department of agriculture. Riverside California, 1968.

MAAS, E. V.; POSS, J. A.; HOFFMAN, G. J. Salinity Sensitivity of Sorghum at Three Growth Stages. **Irrigation Science**: 7: 1-11, 1986.

MAAS AND RHOADES, Agricultural Salinity Assessment and Management. **American Society of Civil Engineers**: 262 - 304, 1990.

MAATHUIS, F. J. M.; AMTMANN, A. K^+ nutrition and Na^+ toxicity: the basis of cellular K^+/Na^+ ratios. **Ann Bot**: 84, 123–133, 1999.

MAGGIO, A.; MIYAZAKI, S.; VERONESE, P.; FUJITA, T.; IBEAS, J. I.; DASM, B.; NARASIMHAN, M. L.; HASEGAWA, P. M.; JOLY, R. J.; BRESSAN, R. A. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **Plant Journal**: 31, 699, 2002.

MAJEE, M.; MAITRA, S.; DASTIDAR, K. G.; PATTAIK, S.; CHATTERJEE, A.; HAIT, N. C.; DAS, K. P.; AN MAJUMDER, A. L. A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice, molecular cloning, bacterial overexpression, characterization, and functional introgression into tobacco conferring salt tolerance phenotype. **Journal of Biological Chemistry**: 279, 28539–28552, 2002.

MATTIONI, C.; LACERENZA, N. G.; TROCCOLI, A.; DE LEONARDIS, A. M.; DI FONZO, N. Water and salt stress-induced alteration in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. **Physiologia Plantarum**: 101, 787-792, 1997.

MATYSIK, J.; ALIA BHALU, B.; MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**: 82, 525-532, 2002.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives in Biochemistry and Biophysics**: 23, 57-67, 2005.

MELONI, D. A.; OLIVA, M. A.; MARTINEZ, C. A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environ Exp. Bot.**: 49, 69 – 76, 2003.

MITTOVA, V.; THEODOULOU, F. L.; KIDDLE, G.; GOMEZ, L.; VOLOKITA, M.; TAL, M.; FOYER, C. H.; GUY, M. Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. **FEBS Lett**: 554, 417–421 2003.

MOLINARI, H.B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, J.; F. R. P.; BESPALHOK, J. C. F.; PROTASIO PEREIRA, F. P.; VIEIRA, L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**: 130, 218–229, 2007.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; BESPALHOK, J. C.; KOBAYASHI, A. K.; PILEGGI, M.; PEREIRA, F. P. P.; VIEIRA, L. G. E. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**: 167, 1375-1381, 2004.

MORADI, F.; ISMAIL, A. M. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. **Ann Bot**: 99, 1161–1173, 2007.

MUDGE, S. R.; ROSANNE, E. K. O.; BONNETT, G. D.; MANNERS, J. M.; BIRCH, R. G. Efficient silencing of reporter transgenes coupled to known functional promoters in sugarcane, a highly polyploid crop species. **Planta**: 229, 549–558, 2009.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell Environmental**: 25, 239–250, 2002.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**: 59, 651-681, 2008.

MUKHOPADHYAY, A.; VIJ, S.; TYAGI, A. K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**: 101, 6309–6314, 2004.

NAEEM, M. S.; JIN, Z. L.; WAN, G. L.; LIU, D.; LIU, H. B.; YONEYAMA, K.; ZHOU, W. J. 5-Aminolevulinic acid improves photosynthetic gas exchange capacity and ion uptake under salinity stress in oilseed rape (*Brassica napus* L.) **Plant Soil**: 2010.

- NAIDU, B.P. Production of betaine from Australian *Melaleuca* spp. for use in agriculture to reduce plant stress. **Australian Journal of Experimental Agriculture** : 43, 1163-1170, 2003.
- NAIDOO, G.; NAIDOO, Y. Effects of salinity and nitrogen on growth, ion relations and proline accumulation in *Triglochin bulbosa*. **Wetlands Ecology and Management**: 9, 491-497, 2001.
- NAKASHIMA, K.; SATOH, R.; KIYOSUE, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. A gene encoding proline dehydrogenase is not only induced by proline and hypoosmolarity, but is also developmentally regulated in the reproductive organs of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**: 118, 1233-1241, 1998.
- NICKELL, L. G. Tissue and cell cultures of sugarcane: another research tool. **Hawaii Plant Rec**: 57, 223–229, 1964.
- NOVILLO, F.; ALONSO, J. M.; ECKER, J. R.; SALINAS, J. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**: 101, 3985–3990, 2004.
- OLIVEIRA, M.; VASCONCELOS, Y. Revolução no canavial. Pesquisa Fapesp. 2006.
- PATADE V. Y., SUPRASANNA P., BAPAT V. A. Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. **Plant Growth Regulation**: 55, 169-173, 2008.
- PONNAMPERUMA, F. N. Physicochemical properties of submerged soils in relation to fertility. **Los Baños: IRRI Research Paper Serie**: 5, 32, 1977.
- PARVANOVA, D.; IVANOV, S.; KONSTANTINOVA, T.; KARANOV, E.; ATANASSOV, A.; TSVETKOV, T.; ALEXIEVA, V.; DJILIANOV, D. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. **Plant Physiology Biochemistry**: 42, 57–63, 2004.
- PEREIRA, J. R. Solos salinos e sódicos. 15ª Reunião brasileira de fertilidade do solo, Campinas, SP, **Sociedade Brasileira de Ciência dos Solos**: 127-143 1983.
- PHANG, J. M. The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. **Current Topics in Cellular Regulation**: 25, 91–132, 1985.
- PILOT, G.; GAYMARD, F.; MOULINE, K.; CHEREL, I.; SENTENAC, H. Regulated expression of *Arabidopsis* shaker KR channel genes involved in KR uptake and distribution in the plant. **Plant Molecular Biology**: 51, 773-787, 2003.

PLAUT, Z.; MEINZER, F.C.; FEDERMAN, E. Leaf development, transpiration and ion uptake and distribution in sugarcane cultivars grown under salinity. **Plant and Soil:** 218, 59-69, 2000.

PLAUT, Z.; MEINZER, F. C.; FEDERMAN, E. Leaf development, transpiration and ion uptake and distribution in sugarcane cultivars grown under salinity. **Plant and Soil:** 218, 59–69, 2000.

PROCHAZKOVA, D.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C.; SINGH, D. V. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. **Plant Science:** 161, 765-771, 2001.

PROTHERO, G. The effect of saline irrigation water on sugarcane ripening. **Report of the Annual Conference of the Hawaiian Sugar Technologists:** 371, 69-71, 1978.

QIU, Q. S.; GUO, Y.; DIETRICH, M. A.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J. K. Regulation of SOS1, a plasma membrane NaR/HR exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. **Proceedings National Academy of Sciences USA:** 99, 8436-8441, 2002.

QUINTERO, F. J.; OHTA, M.; SHI, H.; ZHU, J.K.; PARDO, J.M. Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for NaR homeostasis. **Proceedings National Academy of Sciences USA:** 99, 9061-9066, 2002.

REGASAMY, P. World salinization with emphasis on Australia. **Journal Experimental Botany:** 57, 1017-1023, 2006.

RENA, A. B.; SPLITTSTOESSER, W. E. Proline dehydrogenase and pyrroline-5-carboxylate reductase from pumpkin cotyledons. **Phytochemistry:** 14, 662-675, 1975.

RHODES, D.; HANSON, A.D. Quarternary ammonium and tertiary sulphonium compounds of higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 44. 357-384, 1993.

RHODES, D.; HANSON A, D. Quarternary ammonium and tertiary sulphonium compounds of higher plants. **Plant Molecular Biology:** 44. 357-384, 1993.

ROACH, B.T. Case for a core collection of sugarcane germplasm. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technology:** 21, 339-350, 1995.

RONTEIN, D.; BASSET, G.; HANSON, A. D. Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. **Metabolic Engineering:** 4, 49–56, 2002.

ROOSENS, N. H.; BITAR, F. A. I.; LOENDERS, K.; ANGENON, G.; JACOBS, M. Overexpression of ornithione- α -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. **Molecular Breeding**: 9, 73-80, 2002.

ROZEFF, N. Sugarcane and Salinity—a review paper. **Sugar Cane**: 5, 8-19, 1995.

RAI, M.; HE, C.; WU, R. Comparative functional analysis of three abiotic stress inducible promoters in transgenic rice. **Transgenic Research**: 18, 787–799, 2009.

ROMERO, C.; BELLES, J. M.; VAYA, J. L.; SERRANO, R.; CULIAN˜EZ-MACIA, F. A. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants, pleiotropic phenotypes include drought tolerance. **Planta**: 201, 293–297, 1997.

ROXAS, V. R.; SMIGH, R. K.; JR. ALLEN, E. R.; ALLEN, R. D. Overexpression of glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. **Nature Biotechnology**: 15, 988–991, 1997.

ROY, D.; BHUNIA, A.; BASU, N.; BANERJEE, S. K. Effect of NaCl-salinity on metabolism of proline in salt-sensitive and salt-resistant cultivars of rice. **Plant Biology**: 34, 159-162, 1992.

RUS, A.; YOKOI, S.; SHARKHUU, A.; REDDY, M.; LEE, B.H.; MATSUMOTO, T.K.; KOIWA, H.; ZHU, J.K.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**: 98, 14150-14155, 2001.

SAIRAM, R. K.; RAO, K. V.; SRIVASTAVA, G. C. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolytes concentration. **Plant Science**: 163, 1037–1046, 2002.

SAKAMOTO, H.; MARUYAMA, K.; SAKUMA, Y.; MESHII, T.; IWABUCHI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. **Plant Physiology**: 136, 2734–2746, 2004.

SAVOURE, A.; HUA, X-J.; BERTAUCHE, N.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Genomics and Genetics**: 254, 104-109, 1997.

SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M.; MOZAMBANI, A. E. **Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar**. Piracicaba – SP, 2006.

SEGOVIA. Sugar cane. **Seminar Proc. Inter-Amer**: 58-165, 1989.

SHEN, Q.; HO, T. H. D. Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent response complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. **Plant Cell**: 7, 295-307, 1995.

SHEN, Q.; CHEN, C-N.; BRANDS, A.; PAN, S-M.; HO, D. T-H. The stress-and abscisic acid-induced barley gene HVA22: developmental regulation and homologues in diverse organisms. **Plant Molecular Biology**: 45, 327-340, 2001.

SHEN, B.; JENSEN, R. G.; BOHNERT, H. J. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. **Plant Physiol**: 113, 1177–1183, 1997.

SHI, H.; ISHITANI, M.; CHEOLSOO KIM ZHU, J. K. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**: 97, 6896–6901, 2000

SHI, H.; ZHU, J.K. Regulation of expression of the vacuolar NaR/HR antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and ABA. **Plant Molecular Biology**: 50, 543-550, 2002.

SHI, H.; LEE, B.H.; WU, S.J.; ZHU, J.K. Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology**: 21, 81-85, 2003.

SHI, H.; QUINTERO, F.J.; PARDO, J.M.; ZHU, J.K. The putative plasma membrane NaR/HR antiporter *SOS1* controls long-distance NaR transport in plants. **Plant Cell**: 14, 465-477, 2002.

SMIT, M. A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**: 98, 91- 97, 2006.

SHRIVASTAVA, A. K.; SINGH, K.; GHOSHA, A. K.; DARASH, R.; RAI, R. K.; SHUNKLA, S. P.; SINGH, K. Uptake and partitioning of sodium and chloride ions in sugarcane. **Sugarcane**: 4, 3–6, 1989.

SKRIVER, K.; MUNDY, J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. **Plant Cell**: 2, 503-512, 1990.

SILVEIRA, J. A. G.; COSTA, R. C. L.; VIÉGAS, R. A. Phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to nitrogen fixation in cowpea nodules. **Brazilian Journal of Plant Physiology**: 10, 19-23, 1999.

SILVA, M A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**: 19, 193-201, 2007.

SIRIPORNADULSIL, S.; TRAINA, S.; VERMA, D. P. S.; SAYRE, R. T. Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae. **Plant Cell**: 14, 1–11, 2002.

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

SODERMAN, E.; MATTSSON, J.; ENGSTRÖM, P. The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. **Plant Journal**: 10, 375–381, 1996.

SRIVASTAVA, J. P.; JANA, S. Screening wheat and barley germplasm for salt tolerance. **Salinity Tolerance in Plants**: 273-283., 1984.

STEPIEN, P.; KLOBUS, G. Antioxidant defese in the leaves of C3 e C4 plants under salinity stress: **Physiologia Plantarum**: 125, 31-40, 2005.

STEWART, C. R.; LEE, J. A. The rate of proline accumulation in halophytes. **Plant**: 120, 279-289, 1974.

SU, J.; SHEN, Q.; HO, T-H.D.; WU, R. Dehydration-stress-regulated transgene expression in stably transformed rice plants. **Plant Physiology**: 117, 913- 922,1998.

SU, J.; WU, R. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. **Plant Science**: 166, 941–948, 2004.

SUBBARAO, M.; SHAW, M. A. E. A review of research on sugarcane soils, of Jamaica. **Proceeding of Meeting West Indies Sugar Technology**: 2, 343–55, 1985.

SYED, M.M.; EL-SWAIFY, S.A. Effect of saline water irrigation on N. Co. 310 and H50-7209 cultivars of sugar-cane: I. Growth parameters. **Journal of Tropical Agriculture**: 49, 337-346, 1972.

TAJI, T.; SEKI, M.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; KOBAYASHI, M.; ISHIYAMA, K.; NARUSAKA, Y.; NARUSAKA, M.; ZHU, J. K.; SHINOZAKI, K. Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray. **Plant Physiol**: 135, 1697– 1709, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. NaR tolerance and NaR transport in higher plants. **Annals of Botany (Lond)**: 91, 503-527, 2003.

TEIGE, M.; SCHEIKL, E.; EULGEM, T.; DOCZI, R.; ICHIMURA, K.; SHINOZAKI, K.; DANGL, J. L.; HIRT, H. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. **Molecular Cell**: 15, 141–152, 2004.

TERMAAT, A.; PASSIOURA, J. B.; MUNNS, R. Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl-affected wheat and barley. **Plant Physiol.**: 77, 869–72, 1985.

THOMAS, J. R.; SALINAS, F. G.; OERTHER, G. F. Use of saline water for supplemental irrigation of sugarcane. **Journal Agronomy**: 73, 1011-1017, 1981.

TSUGANE, K.; KOBAYASHI, K.; NIWA, Y.; OHBA, Y.; WADA, K.; KOBAYASHI, H. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. **Plant Cell**: 11, 1195–1206, 1999.

TIWARI, S.; RANDHAWA, G.; KHETARPAL, R.; TYAGI, R.; DHILLON, B. Transgenic Soybean - A Case Study. **Transgenic Crops and Biosafety Concerns**: 169-176, 2001.

URANO, K.; YOSHIBA, Y.; NANJO, T.; ITO, T. Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**: 313, 369–375, 2004.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. Disponível em:
<<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: Março. 2010.

VAN CAMP, W.; CAPIAU, K.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; SLOOTEN, L. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. **Plant Physiology**: 112, 1703–1714, 1996.

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

VENDRUSCOLO, E. C. G.; SCHUSTER, I.; PILEGGI, M.; SCAPIM, C. A.; MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; VIEIRA, L. G. E. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Plant Physiology**: 164, 1367–1376, 2007.

VILLALOBOS, M. A.; BARTELS, D.; ITURRIAGA, G. Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in *Arabidopsis* overexpressing the CpMYB10 transcription factor gene. **Plant Physiology**: 135, 309–324, 2004.

WADITEE, R.; HIBINO, T.; NAKAMURA, T.; INCHAROENSAKDI, A.; TAKABE, T. Overexpression of a Na⁺/H⁺ antiporter confers salt tolerance on a freshwater

cyanobacterium, making it capable of growth in sea water. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**: 99, 4109–4114, 2002.

WAHID, A. Analysis of toxic and osmotic effects of sodium chloride on leaf growth and economic yield of sugarcane. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**: 45, 133-141, 2004.

WAHID, A.; GHAZANFAR, A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. **Plant Physiology**: 163, 723-730, 2006.

WAHID, A.; RAO, A.; RASUL, E. Identification of salt tolerance traits in sugarcane lines. **Field Crops Research**: 54, 9-17, 1997.

WANG, B.; WU, R. A vector for inserting foreign genes and selection of transformed rice plants. **Rice Biotechnology**: 22, 8, 1995.

WANG, H.; QI, Q.; SCHORR, P.; CUTLER, A. J.; CROSBY, W. L.; FOWKE, L. C. ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. **Plant**: 15, 501–510, 1998.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures, towards genetic engineering for stress tolerance. **Plant**: 218, 1–14, 2003.

WARD, J. M.; HIRSCHI, K. D.; SZE, H. Plants pass the salt. **Trends Plant Science**: 8, 200–201, 2003.

WIEGAND, C. L.; ESCOBAR, D. E.; LINGLE, S. E. Growth and yield responses of sugarcane to saline soils: Sensing and mapping using aerial videography. **Proceeding Inter-American Sugarcane Seminars**: I, 15-17, 1996.

WU, C. A.; YANG, G. D.; MENG, Q. W.; ZHENG, C. C. The cotton GhNHX1 gene encoding a novel putative tonoplast Na^(p)/H^(p) antiporter plays an important role in salt stress. **Plant Cell Physiology**: 45, 600–607, 2004.

XIONG, L. M.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J-K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **Plant Cell**: 14:S165–83, 2002.

XU, D.; DUAN, X.; WANG, B.; HONG, B.; HO, T. D.; RAY, W.U. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. **Plant Physiology**. 110, 249–257, 1996.

- YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; KATAGIRI, T.; UEDA, H.; MIZOGUCHI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WADA, K.; HARADA, Y.; SHINOZAKI, K. Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. **Plant**: 7, 751-760, 1995.
- YU, Q.; RENGEL, Z. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. **Plant Science**: 142, 1-11, 1999.
- YU, J.; HU, S.; WANG, J.; WONG, G. K.; LI, S.; LIU, B.; DENG, Y.; DAI, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; CAO, M.; LIU, J. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Science**: 296, 79–92, 2002.
- YUPSANIS, T.; KEFALAS, P. S.; ELEFThERIOU, P.; KOTINIS, K. RNase and DNase activities in the alfalfa and lentil grown in isoosmotic solutions of NaCl and mannitol. **Plant Physiology**: 158, 921-927, 2001.
- ZHANG, C.S.; LU, Q.; VERMA, D.P.S. Removal of feedback inhibition of Δ^1 - pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalysing the first two steps of proline biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**: 270, 20491-20496, 1995.
- ZHENG, L.; SHANNON, M. C.; LESCH, S. M. Timing of salinity stress affecting rice growth and yield components. **Agriculture Water Manage**: 48, 191–206, 2001.
- ZHU, J.K.; LIU, J.; XIONG, L. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*: evidence of a critical role for potassium nutrition. **Plant Cell**: 10, 1181-1192, 1998.
- ZHU J-K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**: 6, 66-71, 2001
- ZHU, J.-K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Molecular aspects of osmotic stress in plants. **Critical reviews in Plant Sciences**: 16, 253-277, 1997.
- ZHU, J.-K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biology*: 6: 441–445, 2003.
- ZHU, J.-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biology*. 53: 247–273, 2002.
- ZHU, B.; SU, J.; CHANG, M.C.; VERMA, D.P.S.; FAN, Y.L.; WU, R. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt-stress in transgenic rice. **Plant Science**: 139, 41-48. 1998.