

Maria Filipa Monteiro Alves de Queirós

**Tolerância à salinidade em linha celular de
Solanum tuberosum L. – estudo bioquímico,
proteómico e ultraestrutural**

U. PORTO

FC FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Faculdade de Ciências

Universidade do Porto

Porto

2012

*Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
da Universidade do Porto para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Agrárias.*

Orientação: Prof.^a Doutora Fernanda Fidalgo

Co-orientação: Prof. Doutor Domingos Almeida

O presente trabalho teve o apoio da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, através da bolsa de investigação com a referência SFRH/BD/18037/2004, financiada pelo POPH – QREN – Tipologia 4.1 – Formação avançada, participado pelo Fundo Social Europeu e por fundos nacionais do MCTES.



Para a elaboração desta dissertação foram utilizados dados apresentados nos seguintes trabalhos:

- Queirós F., Almeida D. & Fidalgo F. (2009). Ultrastructural aspects of a NaCl-adapted potato cell line. *Microscopy and Microanalysis*, 15 (Suppl. 3): 41–42.
- Queirós F., Fontes N., Silva P., Almeida D., Maeshima M., Gerós H. & Fidalgo F. (2009). Activity of tonoplast proton pumps and Na⁺/H⁺ exchange in potato cell cultures is modulated by salt. *Journal of Experimental Botany*, 60 (4): 1363–1374.
- Queirós F., Rodrigues J.A., Almeida J.M., Almeida D.P.F. & Fidalgo F. (2011). Differential responses of the antioxidant defence system and ultrastructure in a salt-adapted potato cell line. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (12): 1410–1419.
- Queirós F., Almeida J.M., Almeida D.P.F. & Fidalgo F. (2012). Genotypic assessment by RAPD markers and ultrastructural characteristics of a NaCl-tolerant potato cell line. *Journal of Life Sciences* 6 (1): 1–8.
- Queirós F., Almeida J.M., Almeida D.P.F. & Fidalgo F. Assessment of genetic variation in potato callus tissue under salinity using RAPD markers. *Acta Horticulturae Proceedings* (em publicação).

E nas seguintes comunicações:

- Queirós F., Rodrigues J.A., Almeida J.M., Almeida D.P.F. & Fidalgo F. (2007). Antioxidant response of a NaCl-tolerant potato cell line. *Libro de Resúmenes XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal*. Pp 286.
- Queirós F., Fontes N., Almeida D.P.F., Fidalgo F. & Gerós H. (2007). Activity of tonoplast proton pumps and Na⁺/H⁺ exchange in potato cell cultures is modulated by salt. *Book of abstracts from the Congress Micro'07-Biotec'07-XXXIII JPG*. Pp 93.

- Queirós F., Fidalgo F., Fontes N., Silva P., Almeida D.P.F. & Gerós H. (2008). Tonoplast proton pumps and Na⁺/H⁺ exchange activity in potato cell lines and implications for salt tolerance. *Physiologia Plantarum*, 133 (3).
- Queirós F., Almeida D. & Fidalgo F. (2008). Ultrastructural aspects of a NaCl-adapted potato cell line. *Conference proceedings INCOMAM'08-International Conference on Microscopy and Microanalysis, XLIII Congress of the Portuguese Microscopy Society*. Pp 62.
- Queirós F., Fidalgo F., Fontes N., Silva P., Almeida D.P.F., Maeshima M. & Gerós H. (2008). Biochemical mechanisms underlying salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Abstracts from the XVIth National Congress of Biochemistry*. Pp 318.
- Queirós F., Almeida J.M., Almeida D. & Fidalgo F. (2009). Genotypic assessment by RAPD markers and ultrastructural characteristics of a potato cell line tolerant to NaCl. *Abstracts from the International Conference “Plant Abiotic Stress Tolerance”*. Pp 83.
- Queirós F., Fidalgo F., Almeida D., Ricardo C.P. & Pinheiro C. (2009). A protein extraction procedure for the proteome analysis of a NaCl-tolerant potato cell line. *Abstracts from the 8th Plant Genomics European Meeting*. Pp 61.
- Queirós F., Almeida J.M., Almeida D.P.F. & Fidalgo F. (2010). Assessment of genetic variation in potato callus tissue under salinity using RAPD markers. *Book of abstracts from the 28th International Horticultural Congress (Vol.I)*. Pp 211.

Agradecimentos

O presente trabalho traduz o esforço não só de uma pessoa, mas o contributo de várias que no meu caminho se cruzaram e através do saber científico que partilharam comigo, do interesse e do apoio manifestado tornaram possível a sua realização. Neste sentido, é minha vontade prestar-lhes homenagem e expressar os meus sinceros agradecimentos.

Gostaria de dirigir as primeiras palavras de agradecimento à Professora Dr^a Fernanda Fidalgo, não apenas por ter acompanhado os trabalhos subjacentes a esta tese na qualidade de orientadora, proporcionando-me todas as facilidades para a concretização da mesma, mas também pelos esclarecimentos, empenho e disponibilidade demonstrados ao longo da realização deste trabalho. Agradeço ainda a confiança que em mim depositou e o seu apoio pelas minhas opções, mesmo quando não foram as mais corretas. Além dos ensinamentos concedidos durante a execução da parte experimental, agradeço as críticas e sugestões avançadas durante a revisão do texto.

Ao Professor Dr. Domingos Almeida, co-orientador científico desta dissertação, manifesto a minha gratidão pela disponibilidade permanente, sugestões sempre oportunas, bem como pelas facilidades concedidas sempre que foi solicitado. Agradeço ainda o estímulo e encorajamento para superar as adversidades inerentes à realização desta etapa.

Não posso deixar de mencionar a importância da Sr^a Professora Isabel Santos pelo incentivo que deu à minha decisão para desenvolver este trabalho de investigação, e pelo exemplo de perseverança que constitui motivo de inspiração para mim e para todos aqueles que se dedicam à ciência. Onde quer que esteja, o meu obrigada.

Ao Dr. José Manuel de Almeida expresso o meu profundo reconhecimento pela forma interessada com que seguiu o desenrolar deste trabalho, os valiosos ensinamentos que me transmitiu, e o melhor exemplo em termos de organização e rigor científico. Além de tudo isto, saliento o apoio e a simpática convivência que fez surgir elevada consideração e sincera amizade.

Ao Professor Dr. José António Rodrigues, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, desejo agradecer a forma com que me

recebeu no seu grupo de investigação e facultou todos os meios necessários para a concretização de algumas das tarefas a que nos propusemos realizar. O meu reconhecimento pela dedicação com que sempre atendeu as minhas solicitações e dúvidas. A todos os elementos do grupo de Química Analítica, em especial ao João Pacheco, agradeço o acolhimento e a ajuda disponibilizada.

Uma palavra de apreço pela colaboração com o Professor Dr. Hernâni Gerós, do Departamento de Biologia da Universidade do Minho, a quem estou grata pela oportunidade que me deu para desenvolver parte do trabalho no seu grupo de investigação, que me acolheu com simpatia, pelo que expresso aqui também o meu agradecimento, sobretudo à Natacha Fontes e ao Paulo Silva pelo apoio prestado. Não posso deixar de salientar o interesse com que o Professor Hernâni Gerós acompanhou a execução do trabalho e o empenho demonstrado, mesmo perante as adversidades, pelo que lhe estou profundamente reconhecida. Além de tudo isto, agradeço as importantes sugestões e o tempo que retirou do seu período de “descanso” para rever o texto.

O meu agradecimento ao Rui Fernandes, do Instituto de Biologia Molecular e Celular, pela disponibilidade, apoio e paciência dispensados para a realização do estudo ultraestrutural.

À Ana Regalado, um agradecimento muito especial pelo seu apoio e encorajamento em ocasiões particularmente difíceis, pela partilha de conhecimentos e pela revisão atenta do texto. Agradeço o carinho, a amizade, a humildade e muitas outras qualidades que a fazem uma “grande Mulher”.

Aos meus pais e irmã agradeço a compreensão, o estímulo e, principalmente, o apoio incondicional sem o qual este trabalho não teria sido possível.

Gostaria ainda de deixar uma palavra de agradecimento ao Rui que, apesar de não ter conseguido acompanhar “lado a lado” todo o meu percurso, o seu apoio e incentivo foram fundamentais em muitos momentos.

A todos o meu eterno reconhecimento.

Resumo

A salinidade constitui um problema grave para a produção agrícola, que limita o crescimento e a produtividade das culturas através dos efeitos osmótico, toxicidade iónica e deficiências nutricionais, estando também envolvido o stress oxidativo. As plantas desenvolveram diferentes estratégias para lidar com a salinidade, ao nível da organização estrutural da planta e de mecanismos fisiológicos e moleculares que operam a nível celular. O conhecimento sobre estes mecanismos é fundamental para aumentar a tolerância das plantas à salinidade e assegurar a sua produtividade em ambientes salinos.

Neste trabalho procedeu-se ao estudo a nível bioquímico, ultraestrutural e proteómico numa linha de tecido caloso de batateira adaptada a 150 mM de NaCl obtida através de seleção *in vitro*, para melhor compreender os mecanismos associados à tolerância à salinidade neste modelo experimental.

Analisaram-se as alterações em termos de crescimento, conteúdo hídrico e de elementos iónicos (sódio, cloro, potássio e cálcio) no tecido crescido na presença de NaCl. A importância do sistema de defesa antioxidante levou a avaliar-se a ação dos mecanismos enzimático e não-enzimático no tecido caloso mantido em meio salino. A atividade das principais enzimas – superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), glutatona redutase (GR) e desidroascorbato redutase (DHAR), foi determinada por espectrofotometria e a separação e identificação das isoformas realizada em géis nativos de poliacrilamida. Paralelamente, foram quantificados os níveis de compostos com ação antioxidante – ascorbato, glutatona, α -tocoferol e prolina. Para completar esta abordagem, avaliou-se o grau de stress oxidativo no tecido através da determinação da peroxidação lipídica. Estes parâmetros bioquímicos foram também analisados nas situações em que o tecido caloso não adaptado (controlo) foi sujeito a um tratamento de choque com 150 mM NaCl, e em que o tecido adaptado foi transferido para meio sem NaCl, de modo a estabelecer-se a relação entre esses parâmetros e a tolerância.

Nas culturas de calos expostas a NaCl houve uma diminuição da taxa de crescimento acompanhada pela perda de água, tendo a linha sujeita a choque salino sido mais afetada do que a adaptada. Nesta linha registaram-se os maiores teores de Na^+ e Cl^- , ao passo que na sujeita a choque salino encontraram-se os teores mais baixos de K^+ e Ca^{2+} , levando a que a linha adaptada apresentasse maior razão K^+/Na^+ . A peroxidação lipídica aumentou

no tecido caloso sujeito a choque salino, não tendo sofrido variação no tecido adaptado. As atividades totais da SOD, APX, DHAR e GR diminuíram nos calos expostos a NaCl, tendo a da CAT sido reduzida apenas pelo tratamento de choque. A transferência do tecido adaptado para a ausência de NaCl provocou o aumento das atividades enzimáticas, se bem que as da SOD, CAT e DHAR fossem inferiores às do tecido controle. A salinidade não induziu alterações visíveis nos padrões isoenzimáticos da SOD, CAT e APX, tendo causado o desaparecimento de uma isoforma no padrão da GR. A diminuição da atividade total da SOD observada em gel nativo nos calos expostos a NaCl deveu-se sobretudo à reduzida atividade da Cu/ZnSOD, pois é o tipo de SOD que predomina no tecido caloso de batateira. Nos zimogramas da APX, a menor atividade revelada nos géis do material exposto a NaCl resultou das atividades reduzidas das formas citosólica (cAPX) e peroxissomal (pAPX), tendo a análise por ‘western blotting’ evidenciado um decréscimo da quantidade de cAPX em condições salinas, que não se verificou com a pAPX. O estudo da atividade da CAT em gel nativo demonstrou que a única isoforma detetada no tecido caloso de batateira (CAT2) surgiu diminuída apenas na situação de choque salino, apesar dos resultados de ‘western blotting’ terem mostrado que a quantidade de CAT2 era reduzida no tecido adaptado a NaCl.

As culturas de tecido caloso que cresceram em meio com NaCl apresentaram níveis mais elevados de ascorbato total e reduzido, assim como uma maior razão ascorbato/desidroascorbato. Os teores de glutatona na forma reduzida e de α -tocoferol também aumentaram no tecido crescido em meio salino, bem como os de prolina, embora o composto lipossolúvel tenha aumentado mais no tecido caloso adaptado do que no exposto a choque salino.

A nível ultraestrutural constatou-se que a salinidade não afetou a integridade estrutural, nem causou alterações acentuadas nas células do tecido caloso adaptado a 150 mM de NaCl, a não ser nos plastídios que surgiram com um menor grau de diferenciação, acompanhado do aumento da quantidade de amido evidenciado através de análise morfométrica. Neste tecido, também se observou uma menor ocorrência de peroxissomas com inclusões paracristalinas.

Tendo em conta que a compartimentação no vacúolo do excesso de Na^+ é fundamental para a homeostasia iónica em condições salinas, estudaram-se as atividades dos sistemas transportadores em vesículas de tonoplasto isoladas de culturas de calos. As vesículas do tecido adaptado a NaCl apresentaram maiores atividades hidrolítica e de bombeamento das

bombas de prótons, ATPase vacuolar (V-H⁺-ATPase) e pirofosfatase (V-H⁺-PPase), verificando-se que a V-H⁺-PPase foi mais eficiente que a V-H⁺-ATPase na geração e manutenção de um gradiente de H⁺ transmembranar. A análise por ‘western blotting’ permitiu correlacionar o aumento da atividade da V-H⁺-PPase com o aumento da quantidade de proteína, o que não sucedeu com a V-H⁺-ATPase após a análise da subunidade A. A dissipação de um gradiente de H⁺ pré-estabelecido através da adição de Na⁺ sugere o envolvimento de um sistema de transporte do tipo antiporte Na⁺/H⁺ nas vesículas de membrana vacuolar de tecido caloso de batateira. A atividade do sistema de antiporte Na⁺/H⁺ foi superior nas vesículas do tecido adaptado a NaCl que mostrou não transportar o íon K⁺.

O efeito da salinidade no tecido caloso de batateira adaptado a NaCl foi avaliado na expressão genética ao nível da proteína com recurso à eletroforese bidimensional. Os padrões proteicos obtidos revelaram alterações quantitativas significativas em 69 cadeias polipeptídicas no tecido adaptado, sendo que 38 surgiram aumentadas e as restantes 31 apareciam diminuídas. A identificação por espectrometria de massa de algumas cadeias polipeptídicas diferencialmente expressas revela tratar-se de proteínas com funções ligadas à constituição da parede celular e de defesa contra stresses abióticos e bióticos. Estes resultados sugerem que estas proteínas (pectinametilesterases, glucana-endo-1,3-β-glicosidase, ‘germin-like proteins’, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) podem contribuir para a adaptação do tecido caloso de batateira à salinidade.

A possibilidade de ocorrência de polimorfismos no DNA genómico do tecido caloso crescido na presença de NaCl levou a que se recorresse à técnica conhecida pelo “método dos polimorfismos amplificados ao acaso” (RAPD), com vista à obtenção de marcadores moleculares baseados na molécula de DNA. Os padrões RAPD gerados por um conjunto de oito ‘primers’ arbitrários revelaram um total de dezasseis marcadores RAPDs, que permitem mostrar que o tecido caloso adaptado a NaCl é geneticamente diferente do tecido controlo.

Em suma, os resultados obtidos neste trabalho demonstram a utilidade das culturas *in vitro* através do uso de linha celular de batateira adaptada a elevada salinidade como sistema experimental para o estudo dos mecanismos que estão envolvidos no processo de adaptação à salinidade neste modelo biológico. O facto da linha celular estudada ser uma linha variante aumenta o interesse pela regeneração de plantas tolerantes à salinidade, o que abrirá novas perspectivas para a investigação futura e para o melhoramento da cultura.

Abstract

Salinity is a crucial limiting factor of agricultural production. It limits crop growth and yield by way of osmotic effects, ionic toxicity and nutritional deficiencies. It is also implicated in oxidative stress. Plants develop a variety of strategies for dealing with salinity at the whole organism level and at the cellular level through physiological and molecular mechanisms. Knowledge of these mechanisms is essential for increasing plants salt tolerance in order to guarantee their productivity in saline environments.

In the present study, a potato cell line adapted to 150 mM NaCl obtained by *in vitro* selection has been characterized in order to elucidate the mechanisms of salt tolerance in this experimental model. Changes in growth and in water and ion content were analysed. The importance of the antioxidant defence system led us to evaluate the enzymatic and non-enzymatic mechanisms in callus tissue grown in the presence of NaCl. The activity of the main enzymes – superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR) and dehydroascorbate reductase (DHAR) was determined spectrophotometrically, and the respective isoforms were separated and identified in native polyacrylamide gels. The levels of antioxidant metabolites (ascorbate, glutathione, α -tocopherol and proline) were also measured. The level of oxidative stress was assessed through the measurement of lipid peroxidation. In order to identify the relationship between these parameters and salt tolerance, these studies were additionally carried out both in the non-adapted callus tissue (control) shocked by abrupt transfer to medium supplemented with 150 mM NaCl and in adapted tissue transferred to salt free medium.

Calli subjected to NaCl showed a reduction in the growth rate in addition to a loss of water, being the line subjected to salt shock more negatively affected than the adapted one. The adapted callus line had higher content of Na^+ and Cl^- , while the line subject to salt shock demonstrated lower contents of K^+ and Ca^{2+} . The adapted line presented a greater K^+/Na^+ ratio than the shocked line. Lipid peroxidation suffered an increase in the callus tissue subjected to salt shock and was not affected in the adapted one. The total activity of SOD, APX, DHAR and GR were reduced in NaCl exposed calli, whilst that of CAT only decreased in the line subjected to salt shock. When the adapted tissue was transferred to a medium without NaCl, enzymatic activity increased, although SOD, CAT and DHAR

activities remained lower than that of the control tissue. Salinity did not lead to any visible change in the isozyme patterns of SOD, CAT or APX. It did generate the loss of one isoform in the GR pattern. The lowering of the total SOD activity observed in native gels of calli exposed to NaCl was mostly due to the reduction in Cu/ZnSOD activity, since this is the predominant SOD in potato callus. The reduction of APX activity observed in the gels from callus cultures exposed to NaCl resulted from the cytosolic (cAPX) and peroxisome (pAPX) forms with a decrease in the amount of cAPX protein under salt conditions, which did not occur with pAPX. The study of CAT activity in native gel revealed that the only isoform found in potato callus tissue (CAT2) decreased only in the salt shock condition, despite the fact that western blots indicated that the amount of CAT2 was reduced in the NaCl-adapted callus tissue.

The callus cultures grown at 150 mM NaCl demonstrated higher levels of total and reduced ascorbate, as well as a higher ratio of ascorbate/dehydroascorbate. The levels of reduced glutathione and α -tocopherol also increased in the tissue grown under salt conditions, as did proline, although the liposoluble compound showed a greater increase in the adapted tissue than in that subjected to shock treatment with NaCl.

Salinity did not affect cellular ultrastructure and did not induce any obvious changes in the cells from callus tissue adapted to 150 mM NaCl. The exception was in the case of the plastids which appeared with a lower degree of differentiation in addition to an increase in starch content as detected by morphometric analysis. This tissue also demonstrated fewer peroxisomes with paracrystalline inclusions.

Considering that the compartmentation into the vacuole of Na^+ excess is essential for ion homeostasis under salt conditions, we studied the activity of transport systems in tonoplast vesicles isolated from calli cultures. The proton transport and hydrolysis activities of both vacuolar ATPase (V- H^+ -ATPase) and pyrophosphatase (V- H^+ -PPase) were higher in vesicles from NaCl-adapted tissue. It was further observed that V- H^+ -PPase was more efficient than V- H^+ -ATPase in the generation and maintenance of a transmembrane H^+ gradient. Western blot analysis revealed that changes in V- H^+ -PPase activity are correlated with increased protein amount, a correlation which did not occur with V- H^+ -ATPase following the analysis of subunit A. The dissipation of a pre-established H^+ gradient by the addition of Na^+ suggests that a Na^+/H^+ antiport system is involved in Na^+ transport into tonoplast vesicles from potato callus tissue. The Na^+/H^+

antiport activity was greater in the vesicles from NaCl-adapted callus tissue and did not accept K^+ .

Two-dimensional electrophoresis was used to analyse the effect of salinity on the genetic expression at the protein level in potato callus tissue adapted to NaCl. The resulting protein patterns demonstrated quantitatively significant alterations in 69 polypeptide chains in the adapted tissue, 38 of which were increased and the remaining 31 reduced. Mass spectrometry allowed the identification of differentially expressed proteins involved in cell wall synthesis and in the defence against abiotic and biotic stresses. These results suggest that the proteins pectin methylesterases, glucan endo-1,3- β -glucosidase, 'germin-like proteins', glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase may contribute to the adaptation of potato callus tissue to salinity.

The possible occurrence of polymorphisms in genomic DNA of the tissue grown in the presence of NaCl led us to use the random amplified polymorphic (RAPD) method to obtain molecular markers based on the DNA. RAPD patterns produced from eight arbitrary primers demonstrated a total of 16 RAPD makers which revealed that the NaCl-adapted callus tissue differ from that of the control tissue.

In conclusion, the results from this study show the usefulness of *in vitro* cultures by using a potato cell line adapted to high salinity as an experimental model for the investigation of the mechanisms underlying the salinity adaptation process in this biological model. The fact that the cellular line studied is a variant line increases the interest in the regeneration of salt tolerant plants and opens avenues for future research and crop improvement.

Résumé

La salinité est un problème grave pour la production agricole qui limite le développement et la productivité des cultures par des effets osmotiques, toxicité ionique et insuffisances nutritionnelles, étant également impliqué le stress oxydatif. Les plantes ont développé de différentes stratégies pour se rapporter à la salinité, au niveau de l'organisation structurale de la plante et des mécanismes physiologiques et moléculaires qui opèrent au niveau cellulaire. La connaissance de ces mécanismes est essentielle pour augmenter la tolérance des plantes à la salinité et assurer leur productivité dans les milieux salins.

Dans ce travail nous avons procédé à l'étude au niveau biochimique, ultrastructurel et protéomique en ligne de tissu calleux adaptée à 150 mM de NaCl obtenue par sélection *in vitro* afin de mieux comprendre les mécanismes associés à la tolérance, à la salinité dans ce modèle expérimental.

Nous avons analysé les changements concernant le développement, le contenu hydrique et les éléments ioniques (sodium, chlore, potassium et calcium) dans le tissu développé en présence de NaCl. L'importance du système de défense antioxydant dans la réduction des niveaux de ROS ont conduit à l'évaluation de l'action des mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques dans le tissu calleux maintenu dans un milieu salin. L'activité des enzymes principales- superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxydase d'ascorbate (APX), glutathion réductase (GR) et deshydroascorbate réductase (DHAR) a été déterminée par spectrophotométrie et la séparation et l'identification des isoformes réalisées sur gels natifs de polyacrylamide. En parallèle, nous avons quantifié les niveaux de composés d'action antioxydant – ascorbate, glutathion, α -tocophérol et proline. Pour compléter cet abordage, nous avons évalué le degré de stress oxydatif dans le tissu par la détermination de la peroxydation lipidique. Ces paramètres biochimiques ont également été analysés dans des situations dont le tissu calleux non adapté (contrôle) a été soumis à un traitement de choc avec 150 mM NaCl, ainsi que le tissu adapté transféré à un milieu sans NaCl, afin d'établir la relation entre ces paramètres et la tolérance.

Dans les cultures de cals exposées à NaCl il y a eu une diminution du taux de développement accompagné d'une perte d'eau, étant donné que la ligne soumise au choc salin a été plus affectée que la ligne adaptée. Dans cette ligne, on a enregistré les teneurs les

plus élevés de Na^+ et Cl^- , contrairement à celle soumise au choc salin, qui présente des teneurs inférieures de K^+ et de Ca^{2+} . Par conséquent, la ligne adaptée a présenté le K^+/Na^+ plus élevé. La peroxydation lipidique a augmenté dans le tissu calleux soumis au choc salin, n'ayant pas souffert de variations dans le tissu adapté. Le total des activités de SOD, APX, DHAR et GR a diminué dans les cals exposés à NaCl, sauf celle de CAT qui a souffert une réduction à cause du traitement de choc. Le transfert du tissu adapté à l'absence de NaCl a augmenté les activités enzymatiques, cependant celles de SOD, CAT et DHAR étaient inférieures à celles du tissu de contrôle. La salinité n'a pas induit de changements notables dans les prototypes isoenzymatiques de SOD, CAT et APX, qui a provoqué la disparition d'une isoforme de type GR. La diminution de l'activité total de SOD observée sur gel natif dans les cals exposés à NaCl, est due surtout à une activité réduite de Cu/ZnSOD, car c'est le type SOD qui prédomine dans le tissu calleux de la pomme de terre. Dans les zymogrammes d'APX, la faible activité révélée sur les gels du matériel exposé à NaCl a résulté des activités réduites des formes cytosolique (cAPX) et peroxysomal (pAPX) étant donné que l'analyse par 'western blotting' met en évidence une diminution de la quantité de cAPX dans des conditions salines, qui n'a pas été observé avec pAPX. L'étude de l'activité CAT sur gel natif a montré que la seule isoforme détectée dans le tissu calleux de la pomme de terre (CAT2) n'est apparue que dans l'état de choc salin, même que les résultats de 'western blotting' montrent que la quantité de CAT2 était réduite dans le tissu adapté à NaCl.

Les cultures de tissu calleux qui se sont développées dans un milieu de NaCl ont montré des niveaux plus élevés de l'ascorbate total et réduit, ainsi qu'une plus grande proportion de ascorbate/deshydroascorbate. Les niveaux de glutathion dans la forme réduite et α -tocophérol ont également augmenté dans ces cultures, ainsi que celles de la proline, bien que le composé liposoluble ait augmenté de façon supérieure dans le tissu calleux adapté par rapport à celui exposé au choc salin.

Au niveau ultrastructurel on a constaté que la salinité n'a pas affecté son intégrité ni provoqué des changements accentués dans les cellules de tissu calleux adapté à 150 mM de NaCl, sauf dans les plastes qui ont apparus avec un faible degré de différenciation, accompagné par l'augmentation de la quantité de l'amidon en évidence par analyse morphométrique. Il a été également constaté la faible présence de peroxysomes avec des inclusions paracrystallines dans le tissu développé en présence de NaCl.

Etant donné que la compartimentation dans la vacuole de l'excédent de Na^+ est essentielle pour l'homéostasie ionique dans des conditions salines, on a étudié les activités des systèmes transporteurs dans des vésicules de tonoplaste isolées de cultures de cals. Les vésicules du tissu adapté à NaCl ont montré de plus grandes activités hydrolytique et de pompage des pompes à protons, ATPase vacuolaire (V-H^+ -ATPase) et pyrophosphatase (V-H^+ -PPase), en vérifiant que le V-H^+ -ATPase a été plus efficace que V-H^+ -ATPase dans la génération et la manutention d'un gradient de H^+ transmembranaire. L'analyse par 'western blotting' a permis de corrélérer l'augmentation de l'activité de V-H^+ -PPase avec l'augmentation de la quantité de protéine, ce qui n'est pas arrivé avec le V-H^+ -ATPase, après l'analyse de la sous-unité A. La dissipation d'un gradient de H^+ préétablie par l'addition de Na^+ suggère l'implication d'un système de transport du type antiport Na^+/H^+ dans les vésicules de membrane vacuolaire de tissu calleux de la pomme de terre. L'activité du système de l'antiport Na^+/H^+ a été plus élevée dans les vésicules du tissu calleux adapté à NaCl et ne montre aucun transport de l'ion K^+ .

L'effet de la salinité dans le tissu calleux de la pomme de terre adapté à NaCl a été évalué dans l'expression génétique au niveau de la protéine en utilisant l'électrophorèse bidimensionnelle. Les types protéiques obtenus ont révélé d'importants changements quantitatifs dans 69 chaînes polypeptidiques dans le tissu adapté, 38 ont augmentés et les 31 restantes se sont présentées diminuées. L'identification par spectrométrie de masse de certaines chaînes polypeptidiques différenciellement exprimées révèle qu'il s'agit de protéines avec des fonctions liées à la formation de la paroi cellulaire et de défense contre des stressés abiotiques et biotiques. Ces résultats suggèrent que ces protéines (pectine-méthylestérase, glucane-endo-1,3- β -glucosidase, 'germin-like proteins', glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) peuvent contribuer à l'adaptation du tissu calleux de la pomme de terre à la salinité.

La possibilité d'occurrence de polymorphismes dans l'ADN génomique du tissu de calleux développé en présence de NaCl a conduit à l'utilisation de la technique appelée de "méthode des polymorphismes amplifiés au hasard" (RAPD), afin d'obtenir des marqueurs moléculaires basés sur la molécule d'ADN. Les types RAPD générés par un ensemble de huit 'primers' arbitraires ont révélé un total de seize marqueurs RAPDs, qui permettent de montrer que le tissu calleux adapté à NaCl est génétiquement différent du tissu contrôle.

En résumé, les résultats obtenus dans ce travail démontrent l'utilité des cultures *in vitro* par l'utilisation de la ligne cellulaire de la pomme de terre adaptée à une salinité élevée

comme modèle expérimental pour étudier les mécanismes impliqués dans le processus d'adaptation à la salinité dans ce modèle biologique. Le fait que la ligne cellulaire étudiée soit une ligne variante augmente l'intérêt dans la régénération des plantes tolérantes à la salinité, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour de futures recherches et pour l'amélioration de la culture.

Índice geral

Agradecimentos	v
Resumo	ix
Abstract	xiii
Résumé	xvii
Índice geral	xxi
Índice de figuras	xxv
Índice de tabelas	xxvii
Abreviaturas e símbolos	xxix

1. Introdução	1
1.1. Salinidade – origem e efeitos adversos	3
1.2. A salinidade como fator de stress oxidativo	17
1.2.1. Espécies reativas de oxigénio	18
1.2.2. Produção de EROs nas células	24
1.2.3. Mecanismos de defesa antioxidante	28
1.2.3.1. Enzimas antioxidantes	29
Superóxido dismutase	29
Catalase	32
Peroxidase do ascorbato	34
Outras enzimas do ciclo ascorbato-glutationa	36
1.2.3.2. Antioxidantes não enzimáticos	40
Ascorbato	40
Glutationa	43
α -Tocoferol	46
1.3. Mecanismos fisiológicos de tolerância à salinidade	49
1.3.1. Controlo da absorção e exclusão do sal	50
1.3.2. Regulação iónica ao nível celular	52
1.3.2.1. Compartimentação vacuolar do Na^+	55
1.3.3. Acumulação de solutos compatíveis	61
1.3.4. Indução do sistema de defesa antioxidante	66

APX	101
GR	102
2.2.5.1.4. ‘Western blotting’ com anticorpos específicos anti-CAT1 e – CAT2, anti-cAPX e –pAPX	102
2.2.5.1.5. Análise densitométrica	103
2.2.5.2. Extração e quantificação de compostos antioxidantes	104
Ascorbato	104
Glutathiona	106
α -Tocoferol	107
2.2.5.3. Análise estatística	108
2.3. Estudos em tecido caloso adaptado a 150 mM NaCl	108
2.3.1. Análise ultraestrutural	108
2.3.1.1. Preparação do material biológico para microscopia eletrônica de transmissão	108
2.3.1.2. Análise morfométrica ultraestrutural	109
2.3.2. Estudo do transporte transmembranar de Na ⁺ em vesículas de tonoplasto .	110
2.3.2.1. Isolamento de vesículas de membrana vacuolar e quantificação da proteína	110
2.3.2.2. Avaliação da pureza da fração vacuolar	111
2.3.2.3. Determinação da atividade hidrolítica da ATPase vacuolar e da pirofosfatase	111
2.3.2.4. Quantificação da atividade de bombeamento de prótons da ATPase vacuolar e da pirofosfatase	112
2.3.2.5. Estudo da atividade do sistema antiporte Na ⁺ /H ⁺ da membrana vacuolar	113
2.3.2.6. Eletroforese e ‘western blotting’ com anticorpos específicos anti- subunidade A da V-H ⁺ -ATPase e anti-V-H ⁺ -PPase	113
2.3.3. Eletroforese bidimensional	115
2.3.3.1. Preparação da amostra e quantificação de proteínas	115
2.3.3.2. Primeira dimensão: focagem isoeletrica	116
2.3.3.3. Segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	117
2.3.3.4. Visualização e análise de imagem dos géis	118

2.3.3.5. Recolha de ‘spots’ e identificação de proteínas	119
2.3.4. Avaliação genotípica através de marcadores RAPD	120
2.3.4.1. Extração e quantificação de DNA	120
2.3.4.2. Amplificação do DNA	121
2.3.4.3. Eletroforese e deteção dos produtos de PCR	122
3. Resultados e Discussão	123
3.1. Estudos em tecido caloso adaptado a 150 mM NaCl e sujeito a choque salino ..	125
3.1.1. Efeitos da salinidade no crescimento e nos teores hídrico e iónico	125
3.1.2. Efeitos da salinidade na peroxidação lipídica e teor de prolina	139
3.1.3. Efeitos da salinidade no sistema de defesa antioxidante	148
3.1.3.1 Atividade das enzimas antioxidantes	148
3.1.3.2. Metabolitos antioxidantes	155
3.2. Estudos em tecido caloso adaptado a 150 mM NaCl	175
3.2.1. Análise ultraestrutural	175
3.2.2. Estudo do transporte transmembranar de Na ⁺ em vesículas de tonoplasto ..	184
3.2.2.1. Determinação da atividade da V-H ⁺ -ATPase e V-H ⁺ -PPase e análise por ‘western blotting’	185
3.2.2.2. Estudo da atividade do sistema de antiporte Na ⁺ /H ⁺ da membrana vacuolar	189
3.2.3. Eletroforese bidimensional	197
3.2.4. Avaliação genotípica através de marcadores RAPD	221
4. Conclusões e perspetivas futuras	229
5. Bibliografia	235

Índice de figuras

1.1 – Comportamento de diferentes espécies em condições salinas, analisado em termos do aumento de matéria seca (%).	8
1.2 – Modelo bifásico que representa o crescimento das plantas em condições salinas ao longo do tempo.	10
1.3 – Relação entre a formação e a remoção das EROs.	18
1.4 – Interconversão das EROs derivadas do O ₂ .	19
1.5 – Importância do H ₂ O ₂ como molécula sinalizadora em vários processos de defesa na planta.	22
1.6 – Localização das vias de produção e de remoção de EROs nas células vegetais.	26
1.7 – Localização subcelular de enzimas e metabolitos do sistema de defesa antioxidante nas células vegetais.	29
1.8 – Ciclo ascorbato-glutationa envolvido na remoção do peróxido de hidrogénio e na regeneração dos metabolitos antioxidantes (AsA e GSH).	37
1.9 – Estrutura química dos tocoferóis.	46
1.10 – Regulação da homeostasia iónica (Na ⁺) através dos transportadores iónicos e bombas de H ⁺ que estão envolvidos na exclusão e na compartimentação celular do Na ⁺ através das membranas plasmática e vacuolar, respetivamente.	54
1.11 – Estrutura da V-H ⁺ -ATPase.	59
2.1 – Tecido caloso controlo mantido na ausência de NaCl (A) e tecido crescido na presença de 150 mM NaCl ao fim de 4 meses de cultura (B).	92
2.2 – Esquema do procedimento utilizado para analisar o comportamento do tecido caloso quando sujeito à alteração das condições de crescimento.	93
2.3 – Cromatogramas relativos à separação por HPLC com deteção por espetrometria de massa de soluções padrão de 1 ppm de GSH e de 200 ppb de GSSG.	107
3.1 – Imagens das culturas de tecido caloso utilizadas neste estudo.	126
3.2 – Variação do crescimento e teor de água do tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e do tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0).	127
3.3 – Variação dos níveis de sódio, potássio, cálcio e cloreto acumulados no tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0).	128
3.4 – Variação dos teores de malondialdeído (MDA) e de prolina no tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0).	141
3.5 – Deteção da atividade da SOD em gel nativo de tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e do tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0).	150
3.6 – Deteção da atividade da CAT em gel nativo e análise por ‘western blotting’ com o anticorpo contra a CAT2 no tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0).	151

3.7 – Detecção da atividade da APX em gel nativo e análise por ‘western blotting’ das frações solúvel e insolúvel extraídas de tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e do tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0).	153
3.8 – Detecção da atividade da GR em gel nativo de tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e do tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0).	154
3.9 – Variação dos níveis de ascorbato (AsA), desidroascorbato (DHA) e ascorbato total (tAsA) no tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0).	156
3.10 – Variação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e de α -tocoferol no tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0).	157
3.11 – Cromatogramas resultantes da análise por HPLC-ESI/MS de um extrato de tecido caloso adaptado a 150 mM de NaCl.	158
3.12 – Aspectos ultraestruturais de tecido caloso controlo.	176
3.13 – Aspectos ultraestruturais de tecido caloso controlo.	177
3.14 – Aspectos ultraestruturais de tecido caloso adaptado ao sal.	178
3.15 – Aspectos ultraestruturais de tecido caloso adaptado ao sal.	179
3.16 – Atividade da V-H ⁺ -ATPase em vesículas de tonoplasto isoladas de tecido caloso controlo e adaptado a 150 mM de NaCl.	186
3.17 – Atividade da V-H ⁺ -PPase em vesículas de tonoplasto isoladas de tecido caloso controlo e adaptado a 150 mM de NaCl.	187
3.18 – A) Padrão eletroforético em SDS-PAGE das proteínas (60 μ g) do tonoplasto de tecido caloso controlo (c) e adaptado a 150 mM de NaCl (150). Análise por ‘western blotting’ das proteínas do tonoplasto de tecido caloso controlo (c) e adaptado a 150 mM de NaCl (150) com os anticorpos contra a V-H ⁺ -PPase (B) e a subunidade A da V-H ⁺ -ATPase (C).	189
3.19 – Atividade do sistema de antiporte Na ⁺ /H ⁺ em vesículas de tonoplasto isoladas de tecido caloso de batateira.	190
3.20 – Especificidade do sistema de antiporte catião/H ⁺ da membrana vacuolar de células de tecido caloso de batateira.	191
3.21 – Separação por eletroforese 2-D de extratos proteicos solúveis em água (fração solúvel) e em solução salina (fração salina) de tecido caloso controlo e adaptado a 150 mM de NaCl (150 mM).	198
3.22 – Mapa de distribuição dos polipéptidos da fração solúvel em géis 2-D de tecido caloso crescido em meio com 150 mM de NaCl, onde estão assinalados os ‘spots’ cuja expressão aumentou (➔) e aqueles em que a expressão diminuiu (➡) comparativamente à situação controlo.	200
3.23 – Mapa de distribuição dos polipéptidos da fração salina em géis 2-D de tecido caloso crescido em meio com 150 mM de NaCl, onde estão assinalados os ‘spots’ cuja expressão aumentou (➔) e aqueles em que a expressão diminuiu (➡) comparativamente à situação controlo.	205
3.24 – Padrões de marcadores RAPDs específicos para o tecido caloso controlo (c) e adaptado a 150 mM de NaCl (150) obtidos com os ‘primers’ dos ‘kits’ OPB (A) e OPE (B).	223
3.25 – Padrões de RAPDs para o tecido caloso controlo (C) e adaptado a 150 mM de NaCl (150) obtidos com os ‘primers’ OPB-15 e OPE-04.	225

Índice de tabelas

1.1 – Principais enzimas antioxidantes.	30
2.1 – Composição do meio de cultura utilizado na manutenção de tecido caloso de <i>S. tuberosum</i>	92
2.2 – Programa usado na focagem isoeletrica de géis de 13 cm com gradiente de pH 3-10 NL em sistema IPGphor	117
3.1 – Crescimento e teor de água do tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e do tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150 → 0 mM).	125
3.2 – Conteúdo dos iões sódio, potássio, cálcio e cloreto acumulados no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.	128
3.3 – Teores de malondialdeído (MDA) e de prolina no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.	140
3.3.1 – Teor de prolina acumulada no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.	141
3.4 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.	148
3.5 – Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) determinada nas frações solúvel e insolúvel do tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.	152
3.6 – Atividade da glutationa redutase (GR) e da desidroascorbato redutase (DHAR) no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.	154
3.7 – Níveis dos compostos antioxidantes, ascorbato (AsA), desidroascorbato (DHA), glutationa reduzida (GSH) e α -tocoferol no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.	155
3.8 – Volume fracional (Vv) dos plastídios e do amido em relação aos plastídios (Vv amido/plastídio), número de grãos de amido por plastídio, e peroxissomas com inclusão paracristalina no tecido caloso controlo e adaptado a 150 mM de NaCl.	180
3.9 – Lista dos polipéptidos detetados nos géis 2-D da fração solúvel de tecido caloso de batateira correspondentes aos ‘spots’ assinalados na Fig. 3.22.	201
3.10 – Lista dos polipéptidos detetados nos géis 2-D da fração salina de tecido caloso de batateira correspondentes aos ‘spots’ assinalados na Fig. 3.23.	206
3.11 – Lista dos polipéptidos diferencialmente expressos que foram recolhidos dos géis 2-D das frações solúvel e salina de tecido caloso de batateira e identificados por PMF+MS/MS.	215
3.12 – Lista dos ‘primers’ arbitrários seleccionados e respetivos produtos polimórficos no tecido caloso controlo e adaptado a 150 mM de NaCl.	222

Abreviaturas e símbolos

ABA	Ácido abcísico
ACMA	9-Amino-6-cloro-2-metoxiacridina
AEBSF	Fluoreto de aminoetil benzenosulfonil
APS	Persulfato de amónio
APX	Peroxidase do ascorbato
AsA	Ascorbato
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	ATP sintetase
bp	Pares de bases
BA	Benzilaminopurina
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CCCP	<i>m</i> -Clorocarbonilcianidafenil-hidrazona
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DHA	Desidroascorbato
DHAR	Desidroascorbato redutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitrol
ECL	'Enhanced chemoluminiscense'
E.P.	Erro padrão
EROs	Espécies reativas de oxigénio
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
ΔF	Varição de fluorescência
<i>g</i>	Aceleração gravítica
GR	Glutathiona redutase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
h	Hora(s)
H ⁺	Protão

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HO ₂ ⁻	Radical hidroperóxido
p-HMB	p-Hidroximercuribenzoato
HPLC-ESI/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espetrometria de massa com ionização por ‘electrospray’
HPLC/UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com deteção espectrofotométrica
HRP	‘Horseradish peroxidase’
IEF	‘IsoElectric focusing’
IPG	‘Immobilised pH gradient’
IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas
KCN	Cianeto de potássio
kDa	Kilodalton
K _m	Constante de Michaelis-Menten
MALDI-TOF/TOF	‘Matrix-assisted laser desorption ionization - Time-of-flight/time-of-flight’
MDA	Malondialdeído
MDHA	Monodesidroascorbato
MDHAR	Monodesidroascorbato redutase
min	Minuto(s)
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MS/MS	Espectrometria de massa
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
Na ₂ -EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético disódico
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamina adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)
NBSI	N-bromossuccinimida
NBT	Nitroazul de tetrazólio
O ₂	Dioxigénio
O ₂ ⁻	Superóxido
¹ O ₂	Singleto de oxigénio
OH ⁻	Radical hidroxilo
OFDA	O-Fenilenodiamina
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS-T	Tampão fosfato-salino com ‘Tween 20’

PCR	‘Polymerase Chain Reaction’
PEG	Polietilenoglicol
pI	Ponto isoelétrico
Pi	Fosfato inorgânico
PIPES	1,4-Piperazina-bis (ácido etanosulfónico)
PMF	‘Peptide mass fingerprinting’
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PPase	Pirofosfatase
ppb	Partes por bilião
PPi	Pirofosfato
ppm	Partes por milhão
PSII	Fotossistema II
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
p/v	Peso/volume
RAPD	‘Random Amplified Polymorphic DNA’
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SOD	Superóxido dismutase
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBS-T	Tampão Tris-salino com ‘Tween 20’
TCA	Ácido tricloroacético
TCEP	Tris(2-carboxietil) fosfina
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
Tween 20	Monolaurato de polioxietilenosorbitano
UNEP	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
UV-B	Radiação ultravioleta B (280-320 nm)
V_{\max}	Velocidade máxima
v/v	Volume/volume
2-D	Eletroforese bidimensional
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Salinidade – origem e efeitos adversos

A salinidade do solo é caracterizada pela acumulação de sais solúveis, em especial do cloreto de sódio, em quantidades prejudiciais ao desenvolvimento da maioria das plantas. A concentração de sais no solo é medida pela condutividade eléctrica no extrato de saturação (CE_e), sendo considerado salino um solo com valores de CE_e superiores a 4 dS m^{-1} , o equivalente a uma concentração aproximada de 40 mM NaCl (Rengasamy, 2010).

Atualmente, o conceito de salinidade é analisado de um modo mais alargado, visto os seus efeitos negativos ultrapassarem o domínio da planta, tendo também repercussões em termos ambientais e até económicos. Já em 1977, Flowers *et al.* referiam que para a planta, a salinidade é apenas um dos fatores ambientais adversos a que poderá estar exposta, enquanto que para o Homem constitui um problema sério dado que a maioria das plantas cultivadas não irá desenvolver-se em pleno na presença de elevadas concentrações de sais no solo, com consequências em termos económicos. Daí que mais recentemente, Rengasamy (2006) tenha definido salinidade como a acumulação de sais no solo a níveis que podem prejudicar o rendimento económico das plantas cultivadas bem como a sustentabilidade ambiental.

Sobre este fenómeno, os dados apresentados a nível mundial são preocupantes. Estima-se que cerca de 15% da superfície mundial se encontra já degradada por fenómenos de erosão e de poluição dos solos, sendo a salinização o principal fator de poluição (Wild, 2003). De acordo com informações da FAO (2011), a salinidade primária afeta quase 7% da superfície de terra arável, o que corresponde aproximadamente 900 milhões de hectares, sendo os fatores ambientais que mais contribuem para a área afetada. O escoamento de águas de zonas com substratos geológicos passíveis de libertarem grandes quantidades de sais e a infiltração de águas subterrâneas em zonas situadas abaixo do nível do mar são fatores que, associados à ação do vento e da chuva no transporte e deposição de quantidades moderadas de sais, conduzem à acumulação de sais no solo (Rengasamy, 2010). Apesar de estes processos contribuírem para a salinização de zonas costeiras e para a formação de solos salinos, as áreas destas terras não têm aumentado quando comparadas com o crescente aumento da superfície das terras salinizadas pela ação do Homem (Ghassemi *et al.*, 1995; Mahajan & Tuteja, 2005). Constata-se que cerca de 20% da

superfície mundial cultivada apresenta problemas de salinidade devido ao manuseio inadequado da rega. De facto, quase 30% da área ocupada com agricultura de regadio encontra-se afetada pela acumulação de sais, em contraste com os cerca de 2% de área em regime de sequeiro (FAO, 2011). A rega com água contendo elevados teores de sais tem sido apontada como o principal fator de salinização, sendo já responsável pelo decréscimo da produtividade em várias regiões do mundo (Munns, 2002). Este é o aspeto mais preocupante da salinidade tendo em conta que a rega é indispensável para se obterem rendimentos superiores nunca atingíveis num regime de sequeiro, no entanto, verifica-se que solos anteriormente produtivos tornaram-se salinos devido a uma má gestão do regadio (Flowers & Yeo, 1995; Flowers & Flowers, 2005).

O processo de salinização secundária dos solos está intimamente relacionado não só com a gestão da rega mas também com a qualidade da água. O tipo de água usado na rega foi negligenciado durante muito tempo devido à disponibilidade e fácil utilização de águas com baixos teores de sais, mas tem vindo a mudar em consequência da sobre-exploração de águas de qualidade por diferentes setores de atividade (Tilman *et al.*, 2002). A escassez de água tem levado à utilização de águas de qualidade inferior (águas subterrâneas salinas, efluentes municipais e industriais) na rega, principalmente nas regiões áridas onde as disponibilidades hídricas são reduzidas e a densidade populacional elevada (Flowers & Yeo, 1995; Flowers *et al.*, 1997; Qadir & Oster, 2004). Compreende-se assim que diversos autores considerem que a salinidade é um fenómeno com tendência para aumentar e o cenário atual é sugestivo disso mesmo (Rajendran *et al.*, 2009; Barrett-Lennard & Setter, 2010; Rengasamy, 2010). A população mundial estimada em 2001 em cerca de 6,1 biliões, aumentou para um valor próximo dos 7 biliões no final de 2011, e espera-se que continue a aumentar para valores acima dos 9 biliões em 2050, prevendo-se que atinja os dez biliões de pessoas no fim do século (ONU, 2011). Perante o crescimento populacional previsto para as próximas décadas, um dos principais desafios atuais consiste no aumento da capacidade para se produzir mais alimentos à custa de um menor consumo de água, de modo a aumentar-se a eficiência e a produtividade deste recurso (Flowers, 2004; Chaves & Davies, 2010; Barrett-Lennard & Setter, 2010). Esse aumento pode ser conseguido através da expansão da atividade agrícola para novas zonas de cultivo, ou elevando os níveis de produtividade atuais (Rengasamy, 2006). Uma vez que as terras com aptidão agrícola têm sido exploradas, manifestando inclusive algumas restrições associadas à acumulação de sais, a expansão da zona de cultivo incidirá inevitavelmente para as regiões menos

favoráveis, designadamente as regiões semi-áridas e áridas, onde o regadio é indispensável para as tornar mais produtivas, se bem que o risco de salinização secundária surja aumentado (Shabala & Cuin, 2008; Chaves *et al.*, 2009). A expansão das áreas de cultivo à custa de outras formas de uso da terra, especialmente de pastagens e florestas, terá prováveis consequências no aumento da salinidade (Manchanda & Garg, 2008 e referências). Por outro lado, o aumento da produtividade, tão necessário hoje em dia, não pode ser alcançado nos moldes da agricultura intensiva praticada nos finais do século XX, que muito contribuiu para os excessos localizados de sais e para a degradação do solo (Tilman *et al.*, 2002; Yamaguchi & Blumwald, 2005). Assim sendo, outras estratégias terão que ser adoptadas para se otimizar a produção em terras que estão cada vez mais degradadas. As recomendações vão no sentido de se controlar a salinização e atenuar os efeitos nocivos dos sais acumulados, de modo a aproveitarem-se os solos afetados para a produção agrícola (Epstein *et al.*, 1980; Munns, 2002; Barrett-Lennard & Setter, 2010).

Embora a drenagem interna do solo seja um fator importante no controlo da salinidade, do mesmo modo que existem outras técnicas para minimizar o impacto negativo da salinidade na produção agrícola e na fertilidade do solo (Munns, 2002; Choudhary *et al.*, 2004), nem sempre é viável implementá-las sob os pontos de vista prático e económico (Yokoi *et al.*, 2002). Há que considerar ainda que as condições climáticas influenciam a extensão do fenómeno, bem como a resposta das plantas ao excesso de sais, pois sob condições de temperatura elevada e baixa precipitação, as elevadas taxas de evapotranspiração favorecem a acumulação dos sais nas camadas superficiais do solo e acentuam os efeitos da salinidade sobre as plantas (Horneck *et al.*, 2007). Daí ser frequente encontrarem-se os solos salinos nas regiões áridas e semi-áridas, embora haja referências à sua ocorrência em praticamente todas as regiões climáticas e em todos os continentes (Rengasamy, 2010). Nomeadamente, tem sido nas regiões tropicais de África, Ásia e América do Sul que a área de solos salinos mais tem aumentado, provavelmente por se tratar de zonas com elevado crescimento populacional onde são usadas águas residuais na rega, ainda que seja na Austrália que se registam os maiores valores de terra salinizada (Flowers & Flowers, 2005). Na Europa, a área afetada é consideravelmente menor. Estima-se que a salinização do solo afete cerca de 30 milhões de hectares de solos, sendo que 3 milhões encontram-se distribuídos pelos países da União Europeia, designadamente Hungria, Roménia, Grécia, Itália e Península Ibérica (SoCo, 2009). Em Portugal, a salinidade ocorre sobretudo nas zonas costeiras por intrusão da água do mar, mas são nas

margens do rio Tejo, na conhecida “região da Lezíria”, que este problema atinge as maiores proporções. A aptidão agrícola dessa região levou à adoção de um modo de produção intensivo, mas devido às dificuldades de adução de água de boa qualidade e aos problemas de drenagem intensificou-se o processo de salinização (Santos *et al.*, 2003). Segundo as conclusões do projeto SIAM¹ (‘Climate Change in Portugal: Scenarios, Impacts and Adaptation Measures’), os fenómenos relacionados com as alterações climáticas, como a subida das águas do mar e a maior frequência de Invernos secos em Portugal, tendem agravar a salinização das águas subterrâneas localizadas em zonas costeiras. O relatório ‘Climate Change Science Compendium’ divulgado em 2009 pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNEP, 2009), destacou entre outras alterações para o planeta, o aumento da aridez na região mediterrânea, que se prevê que ocorra a um ritmo mais acelerado ao que havia sido projetado em 2007 pelo Painel Intergovernamental sobre Alterações Climáticas (IPCC, 2007). Perante os cenários disponíveis é previsível que o problema da salinização na Península Ibérica venha a intensificar-se no futuro próximo.

A consciencialização de que as boas práticas agrícolas e uma adequada gestão das terras e do regadio não são suficientes para impedir o processo de salinização, havendo fatores como a quantidade e a qualidade da água, o aumento da frequência de fenómenos meteorológicos extremos, que tendem a agravar o processo, a sustentabilidade da produção agrícola depende cada vez mais da utilização de plantas capazes de crescer na presença de concentrações elevadas de sais nos solos. O aumento da tolerância ao sal das plantas cultivadas é uma forma de salvaguardar a agricultura produtiva em solos afetados pela salinidade e de assegurar a produção de alimentos em muitas regiões do mundo (Epstein *et al.*, 1980; Flowers & Yeo, 1995; Winicov, 1998; Yamaguchi & Blumwald, 2005; Munns, 2005). Consegue-se assim melhorar a eficiência do uso dos recursos naturais e reduzir os custos de investimento em sistemas de rega e tecnologia do solo, pelo que o retorno económico será maior (Hoffman, 1990; Munns *et al.*, 2006). Contudo, o aspeto mais favorável da tolerância salina poderá consistir na utilização de águas salinas na rega dessas plantas (Qadir & Oster, 2004).

O melhoramento genético de plantas tem sido apontado como uma estratégia promissora para lidar com a situação atual da salinidade, dada a possibilidade para aumentar a tolerância salina das plantas cultivadas, as quais, em conjugação com as técnicas culturais

¹<http://siam.fc.ul.pt/>

apropriadas, poderão melhorar a produção agrícola em meios salinos e até estender essa produção às regiões mais vulneráveis (Epstein *et al.*, 1980; Chen *et al.*, 2005; Yamaguchi & Blumwald, 2005; Barrett-Lennard & Setter, 2010). Apesar dos esforços feitos para melhorar o comportamento das plantas à salinidade, os resultados obtidos não têm sido tão relevantes quanto o esperado (Bartels & Sunkar, 2005). A tolerância salina é uma característica genética e fisiologicamente complexa, pois é regulada pela interação de diversos genes e conferida pela integração de mecanismos que operam aos níveis da planta, da célula e molecular (Koval & Koval, 1996; Flowers, 2004; Smethurst *et al.*, 2008). Assim sendo, antes de se avançar para a obtenção de genótipos tolerantes, é preciso compreender o modo como a salinidade afeta a planta nos seus diferentes níveis de organização, bem como esclarecer os aspectos fisiológicos e bioquímicos da tolerância, pois só assim será possível definir um conjunto de critérios válidos a utilizar nos programas de melhoramento (Bohnert & Jensen, 1996; Munns, 2002; Ashraf & Harris, 2004; Cuartero *et al.*, 2006).

A salinidade é considerada um dos fatores ambientais mais adversos para o desenvolvimento das plantas cultivadas, afetando diversos processos do metabolismo vegetal que se refletem na redução, ou mesmo inibição do crescimento (Singh & Chatrath, 2001; Horie & Schroeder, 2004; Mansour & Salama, 2004; Flowers & Flowers, 2005; Läuchli & Grattan, 2007; Smethurst *et al.*, 2008; Sengupta & Majumder, 2010). Tendo em conta que qualquer fator, biótico ou abiótico, capaz de alterar o estado fisiológico de um organismo a modo de prejudicar funções essenciais, como o crescimento, é considerado “stress” (Gaspar *et al.*, 2002), a salinidade surge frequentemente referida como stress salino.

As espécies vegetais diferem bastante na resposta à salinidade, e podem ser classificadas como halófitas ou glicófitas de acordo com a sua capacidade para crescer em ambientes salinos. O primeiro grupo descrito como a “flora nativa dos solos salinos” (Greenway & Munns, 1980), consiste nas plantas que vivem e reproduzem-se em meios salinos, inclusive algumas plantas o crescimento é estimulado pela presença de elevados níveis de sal (Flowers *et al.*, 1977; Parks *et al.*, 2002). Por sua vez, no grupo das glicófitas encontram-se as plantas que não são capazes de tolerar a salinidade da mesma forma que as halófitas, pelo que o seu crescimento pode ser severamente afetado (Marschner, 1995). Este grupo engloba praticamente todas as plantas com interesse agronómico, onde se nota que há uma

variação considerável na tolerância à salinidade (Shannon & Grieve, 1999). Por exemplo, entre os cereais, a cevada (*Hordeum vulgare*) tolera uma maior concentração de sal sem mostrar sinais de inibição de crescimento do que o arroz (*Oryza sativa*); já a halófita *Atriplex amnicola* é muito tolerante, crescendo a concentrações salinas superiores à da água do mar (Figura 1.1) (Munns & Tester, 2008).

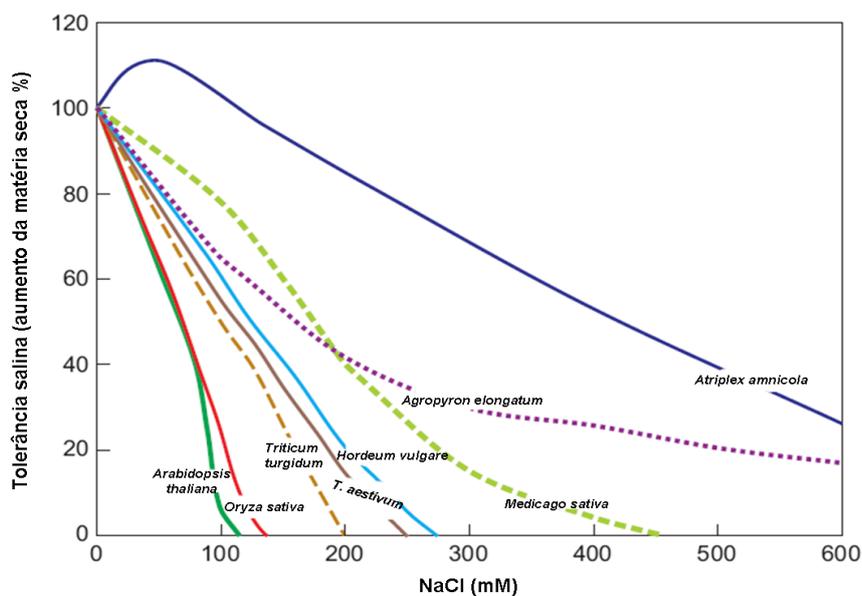


Figura 1.1 – Comportamento de diferentes espécies em condições salinas, analisado em termos do aumento de matéria seca (%). Adaptado de Munns & Tester (2008).

Pelo facto da redução do crescimento ser o efeito mais visível da salinidade, a taxa de crescimento tem sido o critério mais usado nos estudos comparativos de tolerância salina entre plantas, embora outras alterações morfológicas sejam também indicadoras de stress salino (He & Cramer, 1992; Singh *et al.*, 2007; Flowers *et al.*, 2010). É frequente nas plantas expostas a meios salinos o crescimento caulinar ser mais afetado do que a raiz, apesar deste último órgão estar em contacto direto com o sal, o que se traduz numa razão mais baixa entre os comprimentos da parte aérea e da raiz (Munns, 1993; Santos & Caldeira, 1999; Xiong & Zhu, 2002; Aghaei *et al.*, 2009). Enquanto a redução do comprimento caulinar está associada à diminuição do número e do comprimento dos entrenós, na raiz verifica-se um aumento do seu comprimento apesar da redução do peso seco (Santos, 1997). Paralelamente, nas plantas sob stress salino a área foliar diminui, bem como o número de folhas, surgindo estas, por vezes, com uma coloração verde acentuada, mais espessas e suculentas (Chen *et al.*, 2001; Singh & Chatrath, 2001; Boughanmi *et al.*, 2005; Smethurst *et al.*, 2008). Munns (1993) salientaram a diminuição no crescimento foliar como a reação imediata ao stress salino. A influência do sal no aumento da senescência das folhas é evidenciada através da antecipação de certos processos

relacionados com a degeneração, tais como a redução dos níveis de proteínas e clorofilas ou o aumento da permeabilidade membranar, que é mais rápida nas plantas com maior sensibilidade ao sal do que nas mais resistentes (Lutts *et al.*, 1996a; Shaterian *et al.*, 2005). De notar, que a resposta das plantas à salinidade é também condicionada pelas condições climáticas (temperatura, humidade relativa, vento, radiação) e pelas propriedades do solo em que se desenvolvem (textura, humidade, temperatura), bem como pelo estado fenológico (Katerji *et al.*, 2000; Horneck *et al.*, 2007). Por exemplo, a cultura da beterraba (*Beta vulgaris*) é capaz de crescer na presença de 150 mM de NaCl, sendo no entanto sensível a concentrações da ordem de 50 mM nas fases de germinação e de plântula (Marschner *et al.*, 1981). Em relação a este assunto, verifica-se que a salinidade tende não só a prejudicar a fase reprodutiva de diversas plantas como o arroz ou o trigo, bem como a alterar a época própria da floração (Lutts *et al.*, 1995; Munns *et al.*, 2006). Em consequência, as produções são diminuídas. Daí, não é de surpreender que nalguns estudos a tolerância à salinidade seja avaliada em função do decréscimo na produção (Levy *et al.*, 1988; Francois & Maas, 1994; Katerji *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001).

Os mecanismos pelos quais a salinidade interfere negativamente no desenvolvimento das plantas tem sido muito estudado, tendo-se apontado três fatores, ou a sua combinação, como limitantes para o crescimento em solos salinos: o défice hídrico na planta provocado pelo efeito osmótico dos solutos presentes no solo, também designado por stress osmótico; a toxicidade resultante da absorção e acumulação excessiva sobretudo dos iões Na^+ e Cl^- ; e o desequilíbrio nutricional que decorre da interferência com a absorção de nutrientes essenciais como potássio e o cálcio (Blumwald *et al.*, 2000; Sairam & Tyagi, 2004; Bartels & Sunkar, 2005; Britto *et al.*, 2009). Admite-se que este último aspeto não tenha um efeito inibidor imediato sobre o crescimento das plantas, dado que estas dispõem de nutrientes em reserva que podem mobilizar em função das necessidades (Flowers & Flowers, 2005). Pelo que os efeitos osmótico e iónico da salinidade são apontados como os mais inibidores, embora certos autores considerem que a toxicidade pelos iões Na^+ e Cl^- é responsável pela inibição do crescimento em diversas espécies (Maathuis & Amtmann, 1999; Tester & Davenport, 2003; Chen *et al.*, 2007a; Shabala & Cuin, 2008). No entanto, para Marschner (1995) não é possível determinar o contributo relativo de cada um destes fatores na inibição do crescimento, já que certos elementos condicionam a sua importância, como sejam o tipo de planta e a fase de desenvolvimento em que se encontra, a fertilidade do substrato, a concentração e o tempo de exposição ao sal e o próprio clima.

O comportamento da planta em situação salina foi analisado por Munns & Tester (2008), que propuseram que a redução do crescimento ao longo do tempo segue um modelo bifásico, tendo cada fase uma causa distinta (Figura 1.2). A primeira, que designaram por fase osmótica, inicia-se a partir do momento em que a quantidade de sal na solução do solo aumenta, gerando um aumento da pressão osmótica, que faz baixar o potencial da água no solo e, conseqüentemente, reduz a disponibilidade de água para a planta. A taxa de crescimento decresce rapidamente e, segundo os autores, uma concentração de 40 mM NaCl é suficiente para desencadear essa resposta imediata na maioria das plantas. Na fase seguinte, fase iónica, o crescimento diminui a um ritmo mais lento devido à acumulação gradual do Na⁺, sobretudo nas folhas adultas; a capacidade fotossintética da planta é diminuída pelo que o crescimento é ainda mais reduzido. Conclui-se que o impacto inicial da salinidade no crescimento se deve ao efeito osmótico do sal junto às raízes, mas no caso da condição salina se prolongar, a redução do crescimento dever-se-á à incapacidade da planta em evitar que o sal atinja níveis tóxicos nos órgãos aéreos (Munns, 2005). Este tipo de resposta permite distinguir uma planta sensível ao sal de uma tolerante pois, neste caso, a segunda fase é caracterizada por não haver alterações na taxa de crescimento em relação à fase anterior, pelo facto da planta tolerante ser capaz de minimizar a entrada do sal e conseqüente acumulação nas células (Figura 1.2A) (Munns, 2002).

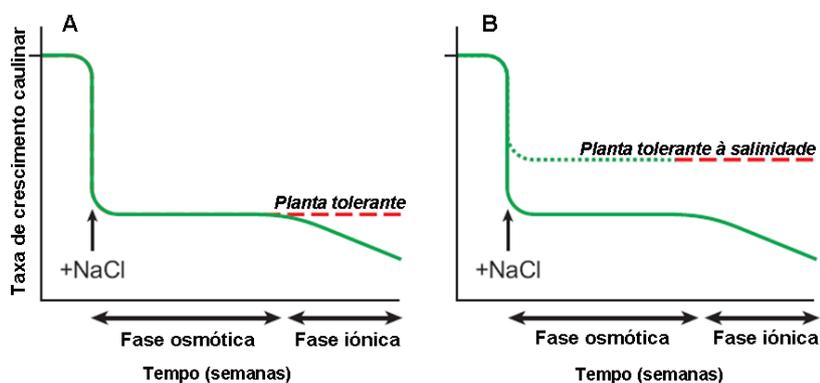


Figura 1.2 – Modelo bifásico que representa o crescimento das plantas em condições salinas ao longo do tempo. A) Após a adição do sal, o crescimento é reduzido de imediato (fase osmótica), para continuar a diminuir a um ritmo mais lento devido à acumulação de Na⁺ nas

folhas (fase iónica). Caso a planta seja tolerante ao stresse salino, o crescimento não é afetado nesta fase. B) Resposta provável da planta com maior tolerância aos componentes osmótico e iónico da salinidade. Adaptado de Munns & Tester (2008).

A presença de elevada concentração de sal na solução do solo dificulta não só a extração de água pela planta, como força também a sua saída do citosol para o espaço extracelular em resposta ao gradiente osmótico gerado. Não apenas a raiz, mas os tecidos foliares estão também sujeitos a uma diminuição do potencial hídrico pelo efeito da acumulação de Na⁺

no apoplasto (Flowers *et al.*, 1991; Shabala & Cuin, 2008). Em resultado, a turgescência celular é reduzida quase que instantaneamente, observando-se uma redução substancial na taxa de crescimento foliar em poucos minutos após a imposição do stress salino, num efeito idêntico ao causado pela situação de secura no solo (Yeo *et al.*, 1991; Passioura & Munns, 2000; Bartels & Sunkar, 2005). De facto, a secura e a salinidade partilham um défice hídrico que atinge, mais ou menos intensamente, todos os órgãos da planta (Chaves *et al.*, 2009).

Um dos processos primários a ser afetado pelo efeito osmótico da salinidade é o crescimento celular (Munns *et al.*, 2006). No entanto, a relação da salinidade com a inibição da divisão e expansão celulares necessita de ser melhor esclarecida (Zhu, 2001). Foi proposto que as CDKs ('Cyclin-dependent protein kinases') estão envolvidas na regulação da divisão celular sendo estas, por sua vez, reguladas aos níveis da transcrição e/ou pós-tradução pelo stress (den Boer & Murray, 2000). É conhecido o efeito do stress hídrico na redução da divisão celular, sabendo-se que o ácido abscísico (ABA) está envolvido no processo por induzir a expressão de um inibidor das CDKs (ICK1, 'Inhibitor cyclin-dependent protein kinase'), que reduz a atividade destas proteínas reguladoras do ciclo celular (Wang *et al.*, 1998). Tendo em conta que a salinidade induz a produção e acumulação de ABA (Kang *et al.*, 2002), é provável que este aumento esteja relacionado com a inibição da divisão celular (Xiong *et al.*, 2002).

A resposta das plantas à salinidade é complexa pois envolve alterações em todos os seus níveis de organização, desde a planta intacta até ao nível molecular, verificando-se que muitas dessas alterações são idênticas às causadas pelo stress hídrico (Xiong & Zhu, 2002; Bartels & Sunkar, 2005; Chaves *et al.*, 2009). De facto, a redução inicial do crescimento em condições salinas está relacionada com a menor absorção hídrica pela planta, (Yeo *et al.*, 1991; Hasegawa *et al.*, 2000; Munns, 2002), mas caso a exposição ao sal se prolongue no tempo, para além da componente osmótica, as plantas terão que lidar com a toxicidade do ião Na^+ (Tester & Davenport, 2003; Munns & Tester, 2008; Chaves *et al.*, 2009). Embora em determinadas espécies (*Citrus*, *Vitis*, *Glycine*), a redução do crescimento e os danos na folhagem vulgarmente observados a baixos níveis de salinidade estejam relacionados com a toxicidade do Cl^- e não com a acumulação do sódio, ou o défice hídrico (Romero-Aranda *et al.*, 1998; Dabuxilatu & Ikeda, 2005; Tregeagle *et al.*, 2010).

Nos substratos salinos o Na^+ e o Cl^- são os iões mais comuns, daí não ser de estranhar que as plantas tenham desenvolvido mecanismos para regular a sua acumulação ou

exclusão (Türkan & Demiral, 2009). Apesar do cloro ser essencial como micronutriente para todas as plantas superiores (White & Broadley, 2001), e do sódio ser um nutriente para a generalidade das halófitas e para algumas espécies C_4 (Subbarao *et al.*, 2003), as concentrações de ambos os íons nos substratos salinos excedem as necessidades das plantas não tolerantes, causando uma situação de toxicidade quando acumulados em quantidades superiores para o normal funcionamento (Quintero *et al.*, 2008). De um modo geral, as folhas são mais vulneráveis do que as raízes à toxicidade do Na^+ e Cl^- (Tester & Davenport, 2003). As raízes têm a capacidade para regular as concentrações destes íons nos seus tecidos, independentemente da concentração externa de sal, através da exclusão para a solução do solo ou para a parte aérea (Munns *et al.*, 2006). Apesar da maioria das plantas excluírem ao nível da raiz uma grande parte do Na^+ e do Cl^- presentes na solução do solo, conhecendo-se já alguns dos transportadores envolvidos no processo, uma proporção variável é transportada via xilema para as folhas (Olías *et al.*, 2009).

Nas plantas expostas a ambientes salinos em que o processo de exclusão do sal não é o mais eficiente, as plantas deverão ter outras formas para lidar com o sal que se acumula nos órgãos fotossintéticos. Ao nível celular, as elevadas concentrações de Na^+ e Cl^- podem ser toleradas através da exclusão e/ou compartimentação destes elementos no vacúolo, protegendo o citoplasma da toxicidade iónica (Munns & Tester, 2008). Quando estes processos não funcionam, ou são insuficientes, verifica-se que o Na^+ pode atingir no citosol concentrações elevadas que são inibidoras da síntese proteica e da atividade de muitas enzimas envolvidas em processos metabólicos vitais, como a fotossíntese (Munns *et al.*, 2006). Admite-se que a toxicidade do Na^+ esteja relacionada com a sua semelhança química e estrutural com o K^+ (raio iónico hidratado, energia de hidratação), o que faz com que o Na^+ em excesso concorra com o K^+ em diversas funções fisiológicas (Blumwald *et al.*, 2000; Carden *et al.*, 2003). Bhandal & Malik (1988) referiram que mais de cinquenta enzimas citosólicas são ativadas pelo K^+ , não podendo este ser substituído pelo Na^+ nessa função. No entanto, em determinadas circunstâncias, o Na^+ pode substituir o K^+ em funções não específicas como o ajustamento osmótico (Britto & Kronzucker, 2008). Apesar de não estar bem definida a concentração a partir da qual o Na^+ se torna prejudicial, a atividade da maioria das enzimas é inibida a concentrações próximas de 100 mM (Greenway & Osmond, 1972), embora Flowers & Dalmond (1992) tenham demonstrado num estudo *in vitro* com plantas halófitas que concentrações inferiores (80 mM) são suficientes para inativar certas enzimas envolvidas nas reações de síntese proteica. Este e

outros trabalhos mostram que a sensibilidade das enzimas citosólicas ao excesso de Na^+ é idêntica nas halófitas e glicófitas, independentemente da diferente tolerância salina entre os dois grupos de plantas (revisto por Flowers *et al.*, 1977; Carden *et al.*, 2003). Por sua vez, sabe-se ainda menos sobre a concentração crítica do Cl^- , mas é provável que seja inferior à definida para o sódio (Munns & Tester, 2008). Xu *et al.* (2000) estimaram que teores da ordem dos 4-7 mg/g de peso seco seriam tóxicos para as espécies sensíveis, já para as mais tolerantes poderiam aumentar até 15-50 mg/g.

Em condições não salinas, as células mantêm uma elevada razão K^+/Na^+ no citosol, resultante da concentração relativamente alta de K^+ (100 a 200 mM) e baixa de Na^+ (1 a 10 mM) (Higinbotham, 1973). Apesar da concentração citosólica do K^+ ser rigorosamente controlada e assegurada através do transporte procedente da solução do solo, bem como do vacúolo, verifica-se que os níveis do catião decrescem significativamente em condições de stress salino (Fricke *et al.*, 1996; Kronzucker *et al.*, 2006; Britto & Kronzucker, 2008). Para Maathuis & Amtmann (1999) a capacidade das plantas para lidar com a salinidade depende muito do seu estado nutricional em potássio. Pode-se concluir que não é a quantidade de Na^+ por si só, mas a razão K^+/Na^+ que determina a competência metabólica da célula e, conseqüentemente, a capacidade das plantas para sobreviverem em ambientes salinos (Shabala & Cuin, 2008). De facto, a razão K^+/Na^+ tem sido referida como fator determinante da tolerância ao sal (Carden *et al.*, 2003; Yamaguchi & Blumwald, 2005; Shabala *et al.*, 2010), no entanto, para a manter elevada é preciso restringir acumulação do Na^+ e impedir a perda de K^+ da célula (Chen *et al.*, 2007a; Shabala & Cuin, 2008).

Com efeito, uma das conseqüências da salinidade é a perda de K^+ que é detetada nos tecidos da raiz e da folha, sendo maior nas plantas sensíveis ao sal (Chen *et al.*, 2005; Shabala *et al.*, 2006, 2007; Britto *et al.*, 2010). Não está ainda perfeitamente definido o mecanismo pelo qual o Na^+ induz a saída do K^+ das células (Britto *et al.*, 2010). Contudo, Shabala *et al.* (2005a, 2006) sugeriram que o fenómeno é mediado através dos canais de potássio KORCs (' K^+ outward rectifying channels') e os canais catiónicos NSCCs ('Non-selective cation channels'), cujas atividades são reguladas pelas alterações no gradiente eletroquímico transmembranar. Perante o potencial de membrana negativo, o aumento dos níveis de Na^+ no meio extracelular favorece o transporte passivo do ião para o citosol através dos canais NSCC, resultando na despolarização da membrana plasmática. Em conseqüência, e no sentido de repor o potencial membranar, os canais KORCs asseguram a saída do potássio. Por sua vez, o influxo de K^+ para as células é afetado pela salinidade,

dada a concorrência direta do Na^+ pela ligação às proteínas transportadoras, que associada à reduzida diferença do potencial eletroquímico impede o transporte passivo do K^+ através dos canais KIRCs (' K^+ inward rectifying channels') (Kronzucker *et al.*, 2006; Shabala & Cuin, 2008). Adicionalmente, as semelhanças entre os dois cátions favorecem o influxo do Na^+ através das vias que funcionam na aquisição do K^+ , incluindo os transportadores de K^+ de alta afinidade (HKTs, 'High affinity K^+ transporters') (Blumwald, 2000; Apse & Blumwald, 2007). Shabala & Cuin (2008) acrescentam que o transporte ativo de K^+ em condições salinas é também prejudicado pela síntese aumentada de solutos compatíveis usados no ajustamento osmótico, que reduz a disponibilidade de ATP para o processo.

A redução do conteúdo de potássio nas plantas pelo excesso de NaCl tem sido referida como um dos fatores que contribui para a toxicidade pelo sal (Ben-Hayyim *et al.*, 1987; Kinraide, 1999; Britto & Kronzucker, 2008), no entanto, as desordens nutricionais induzidas pelo stress salino surgem também associadas à reduzida absorção do cálcio, podendo ocorrer a deficiência deste elemento em muitas plantas (Marschner, 1995; Maathuis, 2006). As elevadas concentrações de Na^+ reduzem a atividade do Ca^{2+} no meio externo e a nível celular, afetando muitas das funções em que está envolvido (Cramer, 2002). Um dos efeitos do NaCl é afetar a integridade da membrana celular ao provocar o deslocamento do Ca^{2+} , aumentando o Na^+ intracelular (Cramer *et al.*, 1985). Utilizando a técnica de 'patch-clamp', Kasukabe *et al.* (2006) verificaram que o Ca^{2+} associado à membrana plasmática era superior nas células em suspensão de tabaco adaptadas a NaCl do que nas não adaptadas.

A importância do Ca^{2+} para a tolerância ao sal é desde há muito defendida por vários autores (Rengel, 1992; Niu *et al.*, 1995; Bressan *et al.*, 1998), o que tem levado à adição suplementar de cálcio nos meios salinos de modo a aumentar-se a razão $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (Laüchli, 1990; Cramer, 2002; Shabala *et al.*, 2003; Dabuxilatu & Ikeda, 2005). Recorrendo a mutantes de *A. thaliana* com grande sensibilidade ao sal (*sos3*, '*salt-overly-sensitive*') e incapazes de crescer na presença de baixos teores de K^+ , Liu & Zhu (1997) mostraram que a adição de Ca^{2+} a meio salino levou não só a um aumento do crescimento, como interferiu com a seletividade K^+/Na^+ , reduzindo os níveis de Na^+ e aumentando os níveis de K^+ nos órgãos aéreos.

A função do cálcio na tolerância ao stress salino é complexa, sabe-se que está diretamente envolvido em diversos mecanismos que intervêm na homeostasia do Na^+ e K^+ (Niu *et al.*, 1995; Zhu, 2003; Shabala *et al.*, 2006). Estudos mostraram que a principal via

de entrada do Na^+ na célula, os canais NSCCs, é bloqueada pelo Ca^{2+} , para além deste impedir a perda do K^+ intracelular ao reduzir a permeabilidade dos canais de K^+ (KORCs), preservando assim a acumulação seletiva K^+/Na^+ (Demidchik & Tester, 2002; Shabala *et al.*, 2005a,b, 2006). É provável que o efeito benéfico do cálcio na tolerância esteja relacionado com o aumento transitório dos níveis do catião no citosol, que é induzido em resposta a vários fatores de stress, incluindo a salinidade (Zhu, 2002; Kader *et al.*, 2007). De facto, verifica-se que em condições de stress salino ocorre o influxo momentâneo de Ca^{2+} para o citosol e o aumento na concentração do ião sinaliza o stress, dando início a uma sequência de reações de transdução do sinal que podem culminar nas respostas de defesa por parte da planta (Bressan *et al.*, 1998; Xiong *et al.*, 2002; Kader *et al.*, 2007). Nas células vegetais, o Ca^{2+} é usado como mensageiro secundário em diversas vias de sinalização relacionadas com o stress salino, provavelmente a melhor caracterizada é a via SOS ('Salt-overly-sensitive') em *A. thaliana*, que culmina na ativação do antiporte Na^+/H^+ na membrana plasmática (SOS1) e cuja atividade é essencial à homeostasia iónica em condições salinas (Bush, 1995; Zhu, 2002). Admite-se que o influxo do Ca^{2+} , do apoplasto e de organelos celulares como o vacúolo, retículo endoplasmático ou mitocôndria, é regulado pelos canais de Ca^{2+} , de tal modo que, Xiong *et al.* (2002) consideraram que estes canais podem ser potenciais sensores na perceção do stress salino, cuja ativação pode resultar de alterações nas estruturas membranares.

Sendo o azoto considerado o nutriente limitante para o crescimento das plantas, não poderia deixar-se de referir a interação do excesso de NaCl com a sua absorção sob a forma de nitrato. A redução do conteúdo de nitrato nas plantas com o aumento da salinidade está documentada, sendo apontada como uma das causas para a reduzida produtividade observada em condições salinas (Laüchli 1990; Santos & Caldeira, 1999; Silveira *et al.*, 2001). Nessas condições, as elevadas concentrações do ião cloreto podem reduzir a absorção do azoto pelas plantas, pelo que a adição suplementar deste elemento é recomendada no sentido de minimizar os efeitos do NaCl (Cerezo *et al.*, 1997; Cramer, 2002; Horneck *et al.*, 2007). De forma semelhante, culturas de células de batateira e de girassol acumularam menos NO_3^- quando cultivadas na presença de NaCl do que em meio sem sal, embora a menor absorção registada nas células de batateira fosse determinada pelo decréscimo na atividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática (Hawkins & Lips, 1997; Santos & Caldeira, 1999). Em contrapartida, o conteúdo de aminoácidos livres, nomeadamente de prolina, aumenta com os stresses salino e osmótico, o que pode indicar

não uma deficiência em azoto mas alterações na sua utilização pelas células (Santos, 1997; Ashraf & Harris, 2004).

Diversos trabalhos têm evidenciado o efeito negativo da salinidade sobre processos fisiológicos importantes para o crescimento das plantas, designadamente a fotossíntese (Zhu, 2001; Munns, 2002; Flexas *et al.*, 2004). O decréscimo de produtividade observado em várias plantas expostas ao sal é, por vezes, atribuído à reduzida capacidade fotossintética das mesmas (Bethke & Drew, 1992; Sultana *et al.*, 1999; Meloni *et al.*, 2003). O efeito da salinidade na fotossíntese é complexo, estando envolvidos vários fatores que, dependendo da intensidade, duração e grau do stress, bem como da sensibilidade da planta, irão afetar de modo diferenciado o processo fotossintético (Chaves *et al.*, 2009). Num estudo realizado em trigo sujeito ao tratamento salino durante quatro semanas, James *et al.* (2002) acompanharam a evolução da taxa fotossintética ao longo do tempo, tendo verificado que o decréscimo da quantidade de dióxido de carbono fixado deveu-se inicialmente à reduzida condutância estomática, sendo posteriormente reduzido pela acumulação de Na^+ e Cl^- nos tecidos foliares. Desconhece-se o mecanismo pelo qual o sal afeta a assimilação do CO_2 , admitindo-se que os iões Na^+ e/ou Cl^- possam acumular-se nos cloroplastos e inibir o processo fotossintético (Munns & Tester, 2008). Também noutros estudos se verificou que, paralelamente à acumulação de Na^+ e Cl^- nas folhas, a salinidade diminuiu os níveis de pigmentos fotossintéticos e a eficiência quântica do fotossistema II (Bethke & Drew, 1992; Naidoo *et al.*, 2002; Kao *et al.*, 2003). De acordo com Chaves *et al.* (2003, 2009), os efeitos da salinidade podem ser diretos, ao reduzir não só a absorção de CO_2 através do fecho dos estomas, mas também a difusão do gás nas células do mesófilo até aos cloroplastos. É certo que estas respostas são induzidas pela componente osmótica da salinidade, embora estudos mostrem que são provavelmente reguladas por sinais hormonais, em especial pelo ABA sintetizado no local e/ou proveniente da raiz (Munns, 2002; Fricke *et al.*, 2004; Flexas *et al.*, 2006). Apesar da reduzida fixação de CO_2 pelas plantas em ambientes salinos, é possível que as alterações bioquímicas detetadas no metabolismo fotossintético dessas plantas, como a diminuição da fotofosforilação e do ATP formado, bem como da síntese de ribulose 1,5-bifosfato ou a redução no teor e atividade da enzima RuBisCo (ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase), entre outras (Tezara *et al.*, 2002; Lawlor, 2002; Bota *et al.*, 2004), possam estar associadas ao stress oxidativo que se desenvolve como um efeito secundário da salinidade (Chaves & Oliveira, 2004; Flexas *et al.*, 2004).

Não sendo possível limitar apenas a uma causa a diminuição da fotossíntese pela salinidade, o seu impacto sobre a taxa fotossintética pode ser ainda maior se for analisado ao nível da planta. O crescimento reduzido, a baixa expansão foliar ou a queda prematura das folhas são algumas das respostas das plantas ao stress salino que restringem o consumo de água e o movimento de sal para as partes aéreas, no entanto, têm uma influência negativa sobre a taxa fotossintética (Hasegawa *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 2002; James *et al.*, 2002).

1.2. A salinidade como fator de stress oxidativo

A presença de dioxigénio (O_2) é um fator essencial à sobrevivência da grande maioria dos organismos existentes no planeta dada a proliferação de formas de vida aeróbias. Contudo, a exposição contínua ao O_2 , mesmo a níveis fisiológicos, implica a sujeição a vários tipos de moléculas e radicais cuja acumulação pode ter efeitos nocivos e que são denominadas genericamente como Espécies Reativas de Oxigénio (EROs) (Scandalios, 1990). As EROs são geradas essencialmente como produtos do metabolismo aeróbio que ocorre nos diferentes compartimentos subcelulares (Scandalios, 2005). Dada a toxicidade destas espécies oxidantes, os organismos desenvolveram um sistema de defesa antioxidante para contrabalançar a sua presença e minimizar os danos oxidativos (Apel & Hirt, 2004). Em condições fisiológicas normais verifica-se um equilíbrio dinâmico entre a produção e a remoção das EROs através do sistema antioxidante. Uma alteração neste equilíbrio em favor da formação das EROs conduz a uma situação de stress oxidativo propícia à ocorrência de sérios danos celulares (Figura 1.3) (Gill & Tuteja, 2010). Diversos fatores ambientais podem perturbar esse equilíbrio e promover o aumento da produção das EROs nas células vegetais, com destaque para o excesso e a carência de água, as variações extremas de temperatura, a radiação ultravioleta e a elevada intensidade luminosa, os poluentes atmosféricos e também o ataque por agentes patogénicos (Dat *et al.*, 2000; Mittler *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2008). As plantas, mais do que os outros organismos eucarióticos, estão sujeitas ao stress oxidativo, quer pela ausência de mobilidade em ambientes em constante mudança, quer pelo facto de consumirem O_2 durante a respiração e produzirem-no durante a fotossíntese (Foyer & Noctor, 2000). Acrescente-se ainda que, em comparação com os outros organismos aeróbios, a maior concentração celular de O_2 é encontrada nas plantas (Scandalios, 1997).

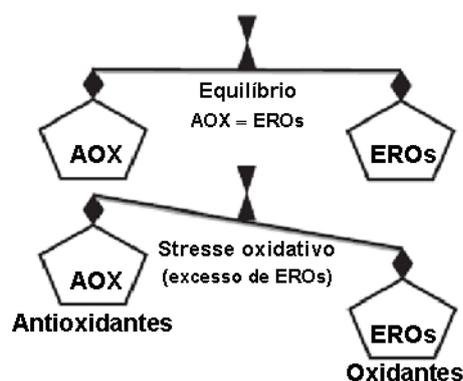


Figura 1.3 – Relação entre a formação e a remoção das EROs. Em condições normais essa relação encontra-se em equilíbrio. A exposição a situações adversas perturba esse equilíbrio, levando ao aumento dos níveis intracelulares de EROs e ao stress oxidativo. Se o aumento da formação de EROs não é compensado pela sua remoção através do sistema de defesa antioxidante, estas espécies podem causar sérios danos celulares. Adaptado de Gill & Tuteja (2010).

Como já referido, a salinidade é uma condição ambiental que afeta negativamente o crescimento e a produtividade das plantas através dos seus efeitos osmótico e iónico, sendo estes efeitos acompanhados pela acumulação de EROs (Bor *et al.*, 2003; Cai-Hong *et al.*, 2005; Koca *et al.*, 2007; Yazici *et al.*, 2007; Noreen & Ashraf, 2009; Pérez-López *et al.*, 2010). Assim, a salinidade manifesta-se também como um fator de stress oxidativo, considerado por alguns autores um efeito secundário desta condição de stress (Zhu, 2001; Wang *et al.*, 2003; Manchanda & Garg, 2008; Türkan & Demiral, 2009; Chaves *et al.*, 2009).

1.2.1. Espécies reativas de oxigénio

Nas plantas, tal como em outros organismos aeróbios, o oxigénio molecular é particularmente importante para a produção eficiente de energia ao ser usado como o aceitador final de eletrões na respiração (Scandalios, 1997). Sob a forma molecular, o oxigénio é pouco reativo, no entanto, durante o processo em que é reduzido a água, formas intermediárias parcialmente reduzidas são geradas, formando-se então as EROs (Scandalios, 1993). As espécies reativas de oxigénio são produzidas a partir da transferência do excesso de energia para o O_2 para formar o singlete de oxigénio (1O_2) ou da transferência de um, dois ou três eletrões para o O_2 formando-se, respetivamente, o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou o radical hidroxilo (OH^-) (Figura 1.4) (Mittler, 2002).

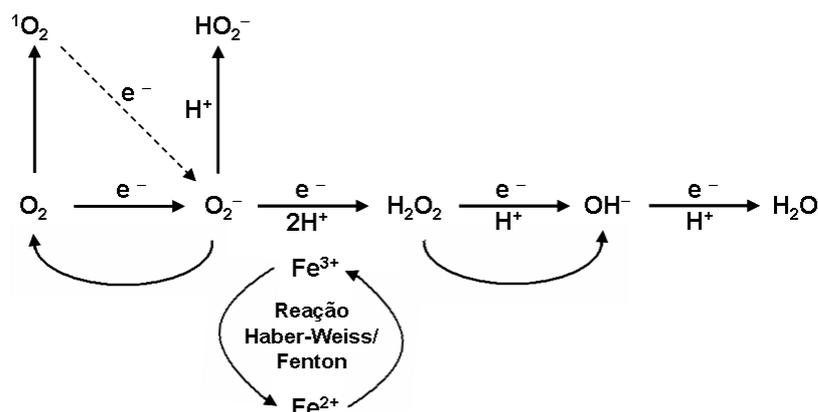


Figura 1.4 – Interconversão das EROs derivadas do O_2 . O oxigênio no seu estado molecular (O_2) pode ser ativado por excesso de energia, sendo revertida a rotação de um dos elétrons sem par do singlete de oxigênio (1O_2). Em alternativa, a redução de um electrão (e^-) conduz à formação do radical superóxido (O_2^-). As reduções subsequentes levam à formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), do radical hidroxilo (OH^-) e água. Os iões metálicos que estão normalmente presentes nas células na forma oxidada (Fe^{3+}) são reduzidos na presença do O_2^- e, conseqüentemente, podem catalisar a conversão do H_2O_2 a OH^- pelas reações de Fenton ou Haber-Weiss. Adaptado de Vranová *et al.* (2002).

Em contraste com o oxigênio molecular, as EROs têm um elevado poder oxidante, podendo reagir com muitos componentes celulares, afetar diversos processos celulares e levar à morte celular (Dat *et al.*, 2000). O singlete de oxigênio é uma molécula altamente reativa quando comparada com o dióxigênio (O_2), podendo transferir a sua energia para outras moléculas biológicas ou reagir com elas, como é o caso dos lípidos das membranas celulares para formar os hidroperóxidos (Halliwell, 2006). Por sua vez, o radical superóxido (O_2^-) não tem capacidade para atravessar as membranas celulares, sendo rapidamente dismutado a H_2O_2 . Sabe-se que este radical pode reduzir quinonas, bem como os metais de transição Fe^{3+} e Cu^{2+} , afetando assim a atividade das enzimas que contêm estes metais (Bartosz, 1997). Em soluções ácidas, o O_2^- pode ser protonado formando o radical hidropéroxido (HO_2^-), que pode atravessar as membranas e reagir com os ácidos gordos insaturados das membranas celulares, para produzir os hidroperóxidos lipídicos que estão envolvidos na peroxidação lipídica (Halliwell, 2006). Não sendo um radical livre segundo a definição, mas capaz de promover a formação do radical hidroxilo (OH^-) (Halliwell, 2006), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula mais estável do que o superóxido, mas que pode ser mais importante na propagação do stress oxidativo, uma vez que atravessa as membranas celulares, podendo difundir-se e atuar a alguma distância do seu local de produção (Bartosz, 1997). O H_2O_2 pode inativar enzimas pela oxidação dos seus grupos tiol (Alscher *et al.*, 1997), ou reagir com as metaloproteínas levando a que

estas libertem o ião metálico e percam a sua atividade biológica (Scandalios *et al.*, 1997). Sabe-se que as enzimas do ciclo de Calvin nos cloroplastos são extremamente sensíveis ao H_2O_2 e que elevados níveis inibem diretamente a fixação do CO_2 (Scandalios, 1993). Contudo, a reação mais nociva do H_2O_2 consiste na formação do radical hidroxilo na presença de iões metálicos através das reações de Fenton ou de Haber-Weiss (Figura 1.4) (Asada, 1999). De acordo com vários autores, a toxicidade do O_2^- e do H_2O_2 deve-se sobretudo à conversão destes no radical hidroxilo, sendo este considerado a espécie mais reativa de oxigénio, não existindo mecanismos de a eliminar da célula (Imlay & Linn, 1988; Bowler *et al.*, 1994; Noctor & Foyer, 1998; Davey *et al.*, 2000). Com efeito, o OH^- é capaz de reagir com todas as moléculas biológicas, de forma rápida e indiscriminada, promovendo a desnaturação de proteínas, a inativação de enzimas e de outras proteínas funcionais, a peroxidação lipídica nas membranas e outros danos nos componentes celulares que conduzem frequentemente a disfunções metabólicas irreparáveis (Halliwell & Chirico, 1993; Scandalios, 1993; Bartosz, 1997). Inclusive, este radical provoca mutações e quebras na cadeia de DNA e, dado que as células não dispõem de nenhum mecanismo enzimático para eliminar especificamente esta ERO, a sua acumulação pode ser responsável pela morte celular (Imlay & Linn, 1988; Dat *et al.*, 2000). Para além das EROs produzidas pela redução sucessiva do oxigénio, poder-se-á também incluir nesse conjunto os produtos de reações secundárias das EROs já referidas com outras moléculas como, por exemplo, o peroxinitrito ($ONOO^-$) resultante da reação do radical O_2^- com o óxido nítrico, ou então os produtos de reação das EROs com os lípidos insaturados das membranas celulares no processo conhecido por peroxidação lipídica (Bartosz, 1997; Apel & Hirt, 2004).

A peroxidação lipídica talvez seja o efeito citotóxico primário das EROs pois desencadeia uma série de alterações na célula, o que faz com que seja vulgarmente utilizada para avaliar o grau de stress oxidativo (Gill & Tuteja, 2010). A reação das EROs com os ácidos gordos das membranas lipídicas leva à destruição gradual da integridade destas estruturas, o que se traduz num aumento da permeabilidade das membranas celulares e conseqüente perda de seletividade para a entrada e/ou saída de iões, nutrientes e de substâncias tóxicas à célula, podendo mesmo culminar com a morte celular. Os danos nas membranas intracelulares afetam a atividade respiratória das mitocôndrias, provocam a degradação de pigmentos com a conseqüente perda da capacidade de fixação do carbono nos cloroplastos (Scandalios, 1997).

Embora o aumento dos níveis de EROs possa constituir uma ameaça para o metabolismo celular, as evidências sugerem que as EROs atuam como moléculas sinal na ativação das respostas de defesa aos fatores de stress (Mittler, 2002; Vranová *et al.*, 2002; Mittler *et al.*, 2004). Atualmente admite-se que as EROs podem assumir uma dualidade de funções dependendo das concentrações em que se encontram na célula; se por um lado, os elevados níveis de EROs são responsáveis por causarem danos oxidativos nas células, podendo mesmo levar à sua morte, por outro, a níveis moderados parecem ser usadas como mensageiros secundários na via de transdução do sinal em vários processos de resposta ao stress (Dat *et al.*, 2000, 2003; Foyer & Noctor, 2005a; Miller *et al.*, 2010). Provavelmente, a morte celular programada associada à resposta de hipersensibilidade, característica da interação incompatível planta-patogénio, é um dos exemplos melhor estudados que mostra o envolvimento das EROs na resposta à infeção pelo patogénio (Levine *et al.*, 1994; Lamb & Dixon, 1997; Torres & Dangl, 2005). A indução da morte celular no local de ataque do patogénio coincide com o aumento da produção de EROs, vulgarmente referido por “explosão oxidativa”, considerado essencial não só para o processo de morte celular durante a resposta de hipersensibilidade, mas também para a indução dos mecanismos de defesa contra os fatores de stress abiótico (Mittler *et al.*, 2004; Torres & Dangl, 2005). Segundo Foyer & Noctor (2005a), a “explosão oxidativa” representa um sinal que comunica às células as alterações no ambiente em redor para que ocorram os ajustamentos necessários, em termos de expressão genética e de estrutura da célula, que permitam à planta lidar com essas alterações e se adaptar à nova condição ambiental.

São vários os trabalhos que realçam o papel das EROs, particularmente do H₂O₂ como molécula sinalizadora do stress, intervindo numa série de respostas de defesa da planta, bem como em algumas das respostas reguladas por fitohormonas (ABA, auxinas) (Figura 1.5) (Neill *et al.*, 2002a,b; Wrzaczek *et al.*, 2010).

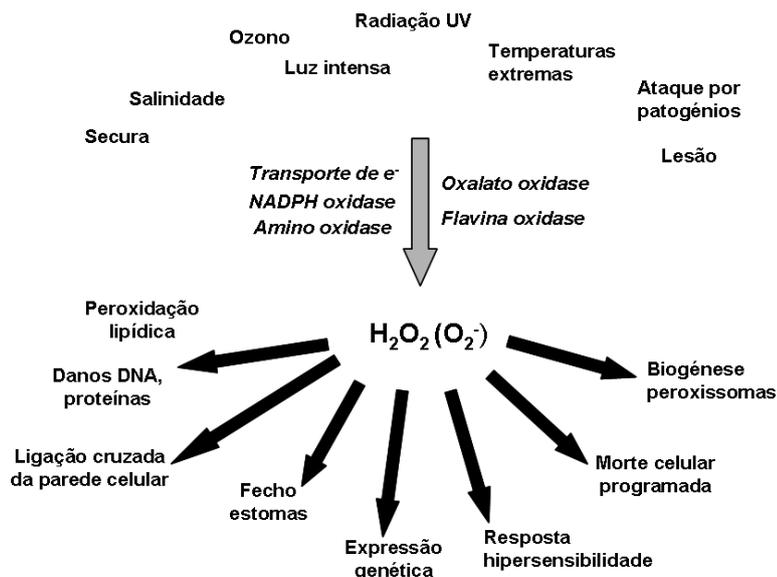


Figura 1.5 – Importância do H_2O_2 como molécula sinalizadora em vários processos de defesa na planta. A seta cinzenta representa os principais agentes responsáveis pela produção de H_2O_2 (condições ambientais desfavoráveis e diversas oxidases) e a seta preta indica os potenciais efeitos do H_2O_2 nas células. Adaptado de Neill *et al.* (2002a).

Embora menos reativa com a maioria das moléculas orgânicas do que as restantes EROs, o H_2O_2 atinge maiores concentrações *in vivo* e destaca-se na propagação do sinal oxidativo por ser uma molécula que se difunde rapidamente através das membranas biológicas para locais distantes do seu local de produção (Foyer *et al.*, 1997). Na tentativa de esclarecer o papel do H_2O_2 como molécula sinal, vários estudos mostram o seu envolvimento na indução da morte celular programada durante a resposta hipersensitiva e na expressão de genes durante as respostas de defesa (Prasad *et al.* 1994; Lamb & Dixon, 1997; Desikan *et al.*, 1998; Karpinski *et al.*, 1999). Em soja e em *A. thaliana* verificou-se que o H_2O_2 induziu a expressão dos genes que codificam a glutathione *S*-transferase (*GST*) e a glutathione peroxidase (*GPX*), enzimas que participam na remoção das EROs e de produtos resultantes da ação destas (Levine *et al.*, 1994; Desikan *et al.*, 1998; Rentel & Knight, 2004). O H_2O_2 levou também à expressão da peroxidase citosólica do ascorbato em culturas de embriões da planta de arroz (Morita *et al.*, 1999), tendo os trabalhos realizados em milho demonstrado a ação do H_2O_2 na regulação da expressão dos genes da catalase (*CAT*), nomeadamente na indução dos genes *CAT1* e *CAT3* em situações de stress osmótico e de lesão (Polidoros & Scandalios, 1999; Guan *et al.* 2000; Guan & Scandalios, 2000). Curiosamente, em batateira o aumento na atividade da catalase foi atribuído ao efeito do H_2O_2 na expressão do gene *CAT2*, um resultado que foi acompanhado pela presença de peroxissomas com inclusões paracrystalinas nas células (Almeida *et al.*, 2005). No estudo conduzido por Lopez-Huertas *et al.* (2000) verificou-se que vários fatores de stress que geravam H_2O_2 resultaram na proliferação de peroxissomas devido à indução dos genes (*PEX*) necessários à biogênese deste organelo, que foram também expressos após o

tratamento das plantas com solução de H_2O_2 . Apesar dos peroxissomas serem um local de produção de EROs na célula, estão também presentes as moléculas e enzimas com ação antioxidante, pelo que este organelo poderá ser importante na regulação do estado redox da célula. Do mesmo modo, Hanqing *et al.* (2010) detetaram que a acumulação do H_2O_2 em plantas de arroz sujeitas a stress salino aumentou a capacidade da via respiratória alternativa ao induzir a expressão dos genes (*AOX*) que codificam a oxidase alternativa, uma via que contribui para reduzir a produção de H_2O_2 nas mitocôndrias em condições de salinidade. Quando inibiram nessas plantas a acumulação endógena do H_2O_2 , a expressão e atividade da oxidase alternativa diminuíram, o que se traduziu num aumento da produção de EROs. Do que foi referido, deduz-se que o H_2O_2 induz a expressão dos genes que codificam as proteínas envolvidas na sua degradação, além de ativar os genes envolvidos na sua síntese através da via das NADPH oxidases e outras oxidases, o que pressupõe a existência de um complexo mecanismo que regula o estado oxidativo da célula (Neill *et al.*, 2002a; Swanson & Gilroy, 2010).

Perante a possibilidade do H_2O_2 poder induzir tolerância aos fatores abióticos, em vários trabalhos procedeu-se à aplicação exógena do peróxido tendo-se verificado, por exemplo, que as plântulas de milho tornavam-se tolerantes ao frio e que plantas de batateira micropropagadas de explantes nodais tratados com H_2O_2 eram mais tolerantes ao calor, enquanto as folhas de *A. thaliana* pulverizadas com H_2O_2 ficavam protegidas do excesso de luz (Prasad *et al.* 1994; Lopez-Delgado *et al.* 1998; Karpinski *et al.*, 1999).

Com base nos exemplos referidos é evidente o papel do H_2O_2 na sinalização de situações adversas com efeitos na ativação da expressão de genes relacionados com a defesa da célula, entre outras estratégias que são induzidas na planta em resposta ao H_2O_2 (Figura 1.5). Embora não sejam ainda conhecidos todos os componentes da via de transdução do sinal desde a perceção do H_2O_2 (ou de O_2^-) até à expressão dos genes de defesa, o influxo e aumento do cálcio citosólico é um dos primeiros fenómenos de sinalização regulados pelo peróxido de hidrogénio, com efeitos na ativação de uma série de cínases e indução de fatores de transcrição (Neill *et al.*, 2002b; Mittler *et al.*, 2004; Rentel & Knight, 2004). Uma vez que a produção de H_2O_2 é uma consequência comum a diversos fatores de stress e que o aumento intracelular do cálcio está associado à generalidade desses fatores, é provável que haja uma certa sobreposição nas vias de transdução do sinal utilizadas pelas plantas na indução das respostas adaptativas através de um fenómeno mediado pelo H_2O_2 e conhecido por tolerância cruzada (Knight & Knight, 2001; Neill *et al.*, 2002a).

Apesar das EROs terem sido consideradas ao longo de muito tempo como produtos citotóxicos do metabolismo aeróbio que se acumulam nas células durante as condições de stress, sabe-se atualmente que essas espécies, em particular o H_2O_2 , são componentes centrais na resposta e adaptação das plantas ao stress onde funcionam como moléculas sinalizadoras, parecendo cada vez mais importante o papel das EROs na regulação do estado redox das células, nomeadamente em processos de transdução de sinal (Jaspers & Kangasjärvi, 2010). Mas para que as EROs atuem como moléculas sinal e ativem os mecanismos de defesa, os seus níveis intracelulares devem ser mantidos sob um controlo estrito, pois em caso de concentrações elevadas podem ocorrer danos oxidativos e eventualmente a morte celular (Miller *et al.*, 2010). Do equilíbrio entre a produção de EROs pelas várias fontes intracelulares e a sua remoção através dos mecanismos de defesa antioxidante é determinada a função destas espécies na célula (Miller *et al.*, 2008).

1.2.2. Produção de EROs nas células

As reações redox são processos essenciais no metabolismo das plantas, tal como em outros organismos, através das quais as células transformam e distribuem a energia necessária para a manutenção e crescimento celulares (Halliwell, 2006). Fazem parte de processos biológicos como a fotossíntese, a respiração e a fotorrespiração que por envolverem o oxigénio molecular são responsáveis pela formação das EROs plantas. Não é assim de estranhar o conceito inicial de que a presença do dioxigénio no ambiente celular constitua uma ameaça oxidativa para as estruturas e processos celulares, sobretudo nos compartimentos subcelulares onde estão presentes as cadeias de transporte de eletrões (Alschner *et al.*, 1997; Foyer & Shigeoka, 2011). Com efeito, os cloroplastos são importantes fontes de EROs nos tecidos fotossintéticos, dado nestes organelos as concentrações de oxigénio serem mais elevadas (Steiger *et al.*, 1977). Os centros de reação dos fotossistemas I (PSI) e II (PSII) localizados nos tilacóides são os principais responsáveis pela formação das EROs (Figura 1.6) (Miller *et al.*, 2010). Em condições de elevado poder redutor ($\text{NADPH}/\text{NADP}^+$), o O_2 libertado pode ser reduzido em O_2^- pelos componentes (ferredoxina) da cadeia transportadora de eletrões associada ao PSI (Scandalios, 1997). Uma vez que a ferredoxina transfere os seus eletrões para o NADP^+ (via ferredoxina-NADP redutase), deduz-se que a quantidade de O_2^- formado está de certo modo relacionada com a quantidade de NADP^+ disponível que, por sua vez, depende da assimilação fotossintética do CO_2 (Bowler *et al.*, 1992). De facto, quando as plantas estão

expostas a condições ambientais suscetíveis de limitar a fixação de CO₂, como acontece em situações de secura e de salinidade devido ao fecho dos estomas em resposta à menor disponibilidade de água, é provável que ocorra um aumento da produção de EROs (Asada, 2006). Como é frequente nestas circunstâncias as plantas estarem sujeitas a uma intensidade luminosa que excede a capacidade de assimilar o CO₂, para além de ser favorecida a redução do O₂ no superóxido (reação de Mehler), em plantas com fotossíntese C₃, como é o caso da batateira, é ativada a via da fotorrespiração com a consequente formação de H₂O₂ (Foyer & Noctor, 2000). A baixa concentração de CO₂ favorece a oxigenação da ribulose 1,5-bifosfato através da RuBisCo para se formar o fosfoglicolato, que através da atividade da fosfoglicolato fosfatase presente nos cloroplastos é convertido no glicolato; este é posteriormente translocado para os peroxissomas onde é oxidado pela glicolato oxidase, gerando-se o glioxilato e a maior parte do H₂O₂ produzido durante a fotossíntese (Figura 1.6). O peróxido de hidrogénio é decomposto pela catalase presente nos peroxissomas, enquanto o superóxido gerado pela redução do O₂ nos cloroplastos é convertido através da enzima superóxido dismutase (Cu/ZnSOD) próxima do PSI em H₂O₂ que, por sua vez, é reduzido a água pela peroxidase do ascorbato associada aos tilacóides (tAPX) numa reação conhecida como ciclo água-água (Figura 1.6) (Miller *et al.*, 2010). À partida, a fotorredução do oxigénio em água através deste ciclo permite eliminar eficazmente o O₂⁻ e o H₂O₂ dos cloroplastos, evitando assim a sua interação com as moléculas alvo e a formação do OH⁻ (Asada, 1999).

O ¹O₂ pode ser também formado nos cloroplastos durante a fotossíntese, quando a clorofila do centro de reação do PSII transita para o estado excitado de tripleto e transfere a sua energia para o oxigénio molecular (Figura 1.6) (Bowler *et al.*, 1992). Em condições normais, os antioxidantes presentes nas membranas tilacóides (carotenóides, α-tocoferol) são suficientes para eliminar o ¹O₂ e reagir com o estado tripleto da clorofila, mas podem tornar-se insuficientes em condições de stress, como de luz intensa e de salinidade, que promovem o aumento da produção de ¹O₂ (Hideg *et al.*, 2002; Pérez-López *et al.*, 2010).

Além dos cloroplastos, os peroxissomas contribuem para a formação de EROs, especificamente do O₂⁻ por ação da xantina oxidase na matriz do organelo e de uma pequena cadeia de transporte de eletrões na membrana, em que participam a flavoproteína ferricianida redutase dependente do NADH e um citocromo do tipo *b* (del Río *et al.*, 2006). Já o H₂O₂ pode ser formado a partir da oxidação do glicolato durante a fotorrespiração, uma via especialmente importante durante as condições de stress abiótico que reduzem a

disponibilidade de CO₂ para a atividade da RuBisCo, como se viu atrás, bem como através da atividade enzimática da flavina oxidase ou por intermédio do O₂⁻ numa reação catalisada pela Cu/ZnSOD (Figura 1.6) (del Río *et al.*, 2006; Jaspers & Kangasjärvi, 2010). Durante o metabolismo dos ácidos gordos, os glioxissomas produzem H₂O₂ durante o processo de β-oxidação dos ácidos gordos (Mittler *et al.*, 2004).

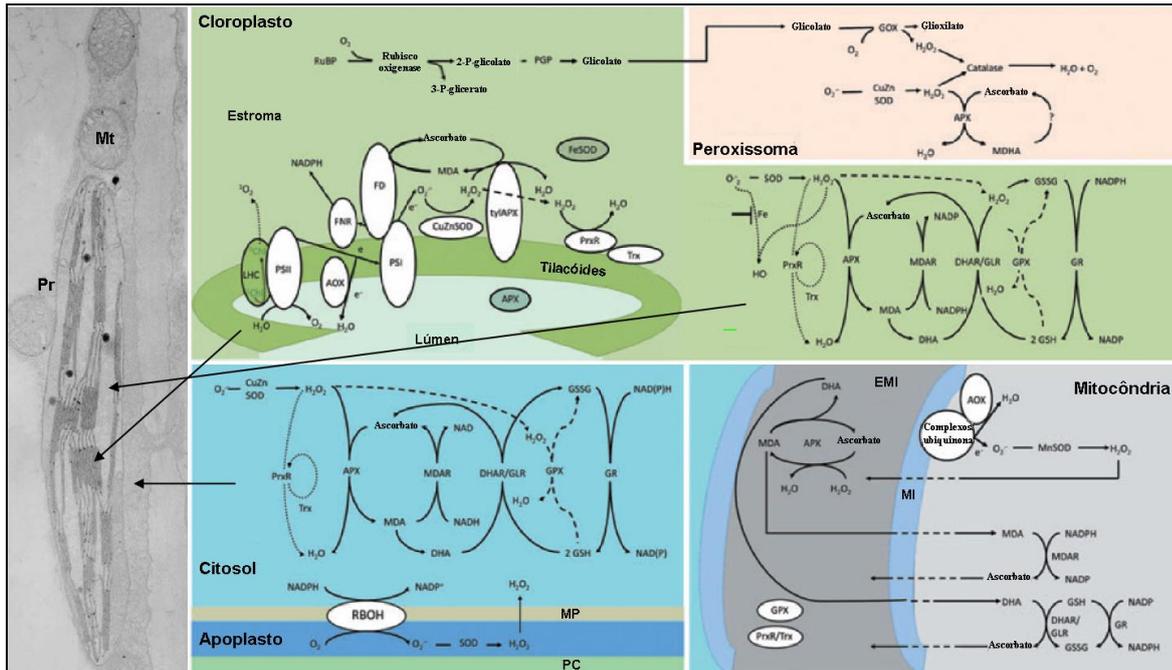


Figura 1.6 – Localização das vias de produção e de remoção de EROs nas células vegetais. O O₂⁻ e H₂O₂ produzidos nos cloroplastos são removidos através do ciclo água-água, no qual intervêm a superóxido dismutase (Cu/ZnSOD) e a peroxidase do ascorbato (tAPX); a enzima oxidase alternativa (AOX) associada às membranas dos tilacóides reduz a formação de O₂⁻. As EROs que escapam do controlo deste ciclo e/ou são produzidas no estroma podem ser eliminadas através da SOD férrica (FeSOD) e do ciclo ascorbato-glutationa. A peroxirredoxina (PrxR) e a glutaciona peroxidase (GPX) estão também envolvidas na remoção do H₂O₂ no estroma. No centro de reação (LHC) associado ao fotossistema II (PSII), a clorofila (Chl) excitada no seu estado tripleto é responsável pela formação de ¹O₂. As EROs produzidas nos peroxissomas (Pr) durante a fotorrespiração e/ou em consequência de outras reações são decompostas pela SOD, catalase (CAT) e APX. A SOD e os outros componentes do ciclo ascorbato-glutationa estão também presentes nas mitocôndrias (Mt) e no citosol. As NADPH oxidases (RBOHs) são as principais responsáveis pela produção de EROs no apoplasto. DHA, desidroascorbato; DHAR, DHA redutase; FD, ferredoxina; FNR, ferredoxina NADPH redutase; GLR, glutarredoxina; GR, glutaciona redutase; GOX, glicolato oxidase; GSH, glutaciona reduzida; GSSG, glutaciona oxidada; MI, membrana interna; EMI, espaço MI; MDA, monodesidroascorbato; MDAR, MDA redutase; PGP, fosfoglicolato fosfatase; MP, membrana plasmática; PC, parede celular; RuBP, ribulose-1,5-bifosfato; Trx, tiorredoxina. Adaptado de Miller *et al.* (2010).

Apesar das mitocôndrias serem a principal fonte de EROs nas células animais, a sua contribuição para a produção destas espécies nas plantas é menor quando comparada com os cloroplastos e peroxissomas (Foyer & Noctor, 2005b). Uma exceção pode ser encontrada nos tecidos não fotossintéticos onde as mitocôndrias parecem ser o organelo mais importante na formação de EROs (Navrot *et al.*, 2007). A cadeia transportadora de eletrões situada na membrana interna deste organelo contribui em grande parte para a produção de EROs através dos complexos respiratórios I e III. Durante a respiração, o oxigénio molecular pode ser reduzido nestes complexos formando radicais O_2^- que serão depois convertidos em peróxido de hidrogénio. O oxigénio pode também interagir com os outros componentes reduzidos da cadeia mitocondrial de transporte de eletrões como as flavinas, o citocromo *c* ou a ubiquinona e gerar o O_2^- (Møller, 2001). Este radical, sendo carregado, não atravessa a membrana da mitocôndria, acumula-se no seu interior sendo posteriormente reduzido a H_2O_2 através da SOD (MnSOD) (Figura 1.6) (Miller *et al.*, 2010). A presença da oxidase alternativa (AOX) na superfície interna da membrana mitocondrial contribui para reduzir a produção mitocondrial de EROs ao receber diretamente da ubiquinona os eletrões que seriam dirigidos ao complexo III da cadeia respiratória, reduzindo de imediato o oxigénio em água (Apel & Hirt, 2004).

Do mesmo modo que nos cloroplastos e peroxissomas, a produção de EROs nas mitocôndrias é aumentada por condições que interferem negativamente na fixação do CO_2 , nomeadamente a secura e a salinidade (Navrot *et al.*, 2007; Pastore *et al.*, 2007). Nestas situações aumenta a respiração mitocondrial e a probabilidade da formação de EROs através da transferência dos eletrões do citocromo da cadeia respiratória para o O_2 (Norman *et al.*, 2004). Para Atkin & Macherel (2009) o facto da taxa respiratória aumentar nessas condições é uma forma de aumentar o ATP mitocondrial de modo a compensar a síntese reduzida desta molécula nos cloroplastos.

Embora menos relevante na formação celular de EROs do que os outros organelos, o apoplasto é referenciado como um local em que ocorre a produção de H_2O_2 em resposta ao ABA e a situações de secura e salinidade (Hernández *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2005). As NADPH oxidases da membrana plasmática são as principais responsáveis pela formação das EROs induzida pelo ABA em situações de secura, bem como das EROs detetadas durante a interação incompatível entre a planta e o patogénio (Figura 1.5) (Torres & Dangl, 2005). Outras enzimas podem também intervir na produção apoplástica de EROs, como a oxalato oxidase que converte o oxalato em CO_2 e H_2O_2 , ou as amino-oxidases, bem como

as peroxidases ligadas à parede celular cuja atividade é induzida pela alcalinização da parede (Mittler *et al.*, 2002).

Como se pode ver, nas plantas em condições normais são produzidas EROs em consequência da intensa atividade oxidante que decorre nos diversos compartimentos da célula. A formação dessas espécies é incrementada em situações ambientais adversas através das vias já referidas (fotorrespiração, transporte fotossintético de elétrons, respiração mitocondrial). A este propósito, Polle (2001) construiu um modelo metabólico e estimou taxas de produção de $240 \mu\text{M s}^{-1}$ de O_2^- e de $0,5 \mu\text{M s}^{-1}$ de H_2O_2 nos cloroplastos em condições de crescimento normais, que aumentavam para valores da ordem de $240\text{--}720 \mu\text{M s}^{-1}$ e de $5\text{--}15 \mu\text{M s}^{-1}$, respetivamente, em situações de stress. Perante estes resultados, entende-se que as células tenham evoluído no sentido de desenvolver mecanismos capazes de removerem intracelularmente essas espécies reativas, de modo a evitar a ocorrência de stress oxidativo e todos os danos celulares associados a este fenómeno biológico. O controlo das EROs é conseguido através dos mecanismos de defesa antioxidante que têm como função evitar a sua acumulação e em caso de dano proceder à eliminação das moléculas afetadas (Gill & Tuteja, 2010).

1.2.3. Mecanismos de defesa antioxidante

O termo antioxidante aplica-se a qualquer substância capaz de neutralizar e/ou remover as EROs, sem o risco de se transformar num radical nefasto ao metabolismo celular (Noctor & Foyer, 1998). Como referido anteriormente, a regulação entre a produção e degradação das EROs é efetuada através de mecanismos antioxidantes e qualquer desequilíbrio nessa relação, quer pelo excesso de EROs ou pela falha no sistema de defesa antioxidante, desencadeia stress oxidativo (Dat *et al.*, 2000; Scandalios, 2005).

Os mecanismos de defesa contra a presença de EROs podem ser enzimáticos, envolvendo um conjunto de enzimas capazes de eliminar as espécies menos reativas e impedir a formação das mais reativas, e não enzimáticos, caracterizados por moléculas de baixo peso molecular que reagem diretamente com as EROs, podendo também funcionar como substratos dadores de elétrons essenciais à atividade de determinadas enzimas antioxidantes. Entre as enzimas destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), as peroxidases do ascorbato (APX) e do guaiacol (GPX), que participam na remoção das EROs, bem como as enzimas monodesidroascorbato redutase (MDHAR), desidroascorbato redutase (DHAR) e glutathiona redutase (GR) que estão envolvidas na

regeneração das formas ativas do ascorbato e da glutatona através do ciclo ascorbato-glutationa (Figura 1.6). O ascorbato (AsA) e a glutatona (GSH) são os principais metabolitos antioxidantes solúveis em água que fazem parte do sistema não enzimático, bem como os lipossolúveis α -tocoferol e carotenóides, entre outros (xantofilas, flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos). Estes componentes do sistema antioxidante encontram-se praticamente em todos os compartimentos subcelulares, proporcionando um sistema muito eficiente na desintoxicação das EROs e na proteção das moléculas biológicas contra o stress oxidativo (Figuras 1.6 e 1.7). Contudo, a eficiência do sistema antioxidante depende do equilíbrio entre as atividades das várias enzimas que atuam de forma interligada na eliminação do O_2^- e H_2O_2 da célula (Mittler *et al.*, 2004).

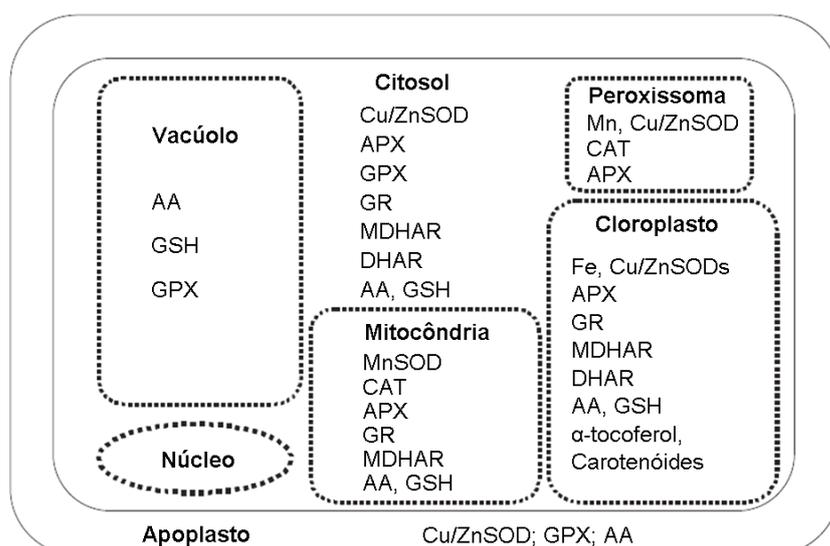


Figura 1.7 – Localização subcelular de enzimas e metabolitos do sistema de defesa antioxidante nas células vegetais. Adaptado de Scandalios (2005).

1.2.3.1. Enzimas antioxidantes

Superóxido dismutase

A SOD constitui a primeira linha de defesa celular contra as EROs ao catalisar a dismutação do radical O_2^- em O_2 e H_2O_2 de acordo com a reação representada na Tabela 1.1. Esta enzima foi pela primeira vez isolada a partir de sangue bovino como sendo uma proteína verde-azulada que continha cobre na sua constituição, julgando-se ser responsável pelo armazenamento deste metal, vindo a ser descoberta a sua ação catalítica por McCord e Fridovich em 1969 (Scandalios, 1993). Caracteriza-se por ser uma enzima ubíqua que se encontra largamente distribuída entre os organismos aeróbios e que está presente nos diferentes compartimentos subcelulares onde o O_2^- pode ser gerado (Figuras 1.6 e 1.7)

(Alscher *et al.*, 2002). A SOD assume um papel chave na defesa celular contra situações de stress oxidativo, não só ao determinar as concentrações de O_2^- e H_2O_2 , os dois substratos da reação Haber-Weiss, mas por catalisar a transformação do radical O_2^- de uma forma muito mais rápida (10 000 vezes) do que aquela que ocorre através da dismutação espontânea, evitando assim a toxicidade que caracteriza este elemento altamente reativo (Bowler *et al.*, 1992, 1994).

Tabela 1.1 – Principais enzimas antioxidantes. Adaptado de Gill & Tuteja (2010).

Enzimas antioxidantes	Reações catalisadas
Superóxido dismutase (SOD)	$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$
Catalase (CAT)	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$
Peroxidase do ascorbato (APX)	$H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + MDHA$
Peroxidase do guaiacol (GPX)	$H_2O_2 + GSH \rightarrow H_2O + GSSG$
Monodesidroascorbato redutase (MDHAR)	$MDHA + NAD(P)H \rightarrow AA + NAD(P)^+$
Desidroascorbato redutase (DHAR)	$DHA + 2GSH \rightarrow AA + GSSG$
Glutathiona redutase (GR)	$GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$

De acordo com o íon metálico presente no centro ativo da enzima, existem três tipos de SODs classificadas como Cu/ZnSOD quando contêm cobre e zinco, MnSOD se o metal for manganês ou FeSOD se for ferro. Estes tipos de SOD podem ser distinguidos pela diferente sensibilidade que apresentam ao cianeto de potássio e H_2O_2 , sendo a Cu/ZnSOD caracterizada por ser sensível aos dois inibidores, a FeSOD sensível ao H_2O_2 e a MnSOD resistente a ambos os inibidores (Becana *et al.*, 1989). Em termos de estrutura química, a Fe- e a MnSOD são muito semelhantes, embora tenham divergido o suficiente para que o Fe^{2+} não possa restabelecer a atividade da MnSOD ao substituir o átomo de manganês no centro ativo. A molécula de Cu/ZnSOD possui um átomo de cobre e um de zinco no seu centro ativo, pelo que as propriedades elétricas desta enzima diferem bastante das SODs de Fe e Mn que se repercutem em diferenças ao nível estrutural (Scandalios, 1997). A homologia partilhada pelas FeSOD e MnSOD estende-se também ao domínio das sequências aminoacídicas, de tal modo que a comparação das sequências de aminoácidos deduzidas dos três tipos de SOD sugere que as SODs de Mn e Fe são as mais antigas tendo, provavelmente, surgido da mesma enzima ancestral, enquanto a Cu/ZnSOD terá evoluído separadamente nos eucariontes (Tsang *et al.*, 1991). Admite-se que a razão evolutiva para a separação das SODs em termos de exigência do cofator possa estar relacionada com a variação na disponibilidade dos metais de transição em relação ao teor de O_2 na atmosfera ao longo das eras geológicas. Nesta perspetiva, é proposto o grupo das

FeSODs ser o mais antigo das SODs, dado que no início a forma Fe^{2+} seria a mais abundante, mas à medida que os níveis de O_2 foram aumentando, a quantidade de Fe^{2+} diminuiu, a disponibilidade dos íons Mn^{3+} e Cu^{2+} aumentou progressivamente, o que levou a que passassem a ser usados como cofatores no centro ativo da enzima (Alscher *et al.*, 2002). Cohu & Pilon (2007) confirmaram em diferentes espécies de plantas que a disponibilidade dos cofatores metálicos determina a expressão das SODs, tendo mostrado que a limitação de cobre aumentou a expressão da FeSOD em detrimento da Cu/ZnSOD.

Entre as SODs, a Cu/ZnSOD é certamente a mais abundante em quase todos os eucariontes, tendo sido também detetada em bactérias e cianobactérias (Bertini *et al.*, 1998); nas plantas, é também a mais abundante das três metaloproteínas, distribuindo-se pelo citosol, cloroplastos, peroxissomas e apoplasto (Gómez *et al.*, 2004a). Por sua vez, a MnSOD encontra-se na matriz mitocondrial de plantas, animais e bactérias, embora Sandalio *et al.* (1987) tenham detetado a sua presença nos peroxissomas das plantas; já a FeSOD, não tendo sido localizada em tecidos animais, está presente nos cloroplastos das plantas, surgindo associada às membranas tilacóides em plantas de tabaco (Figura 1.7) (Van Camp *et al.*, 1996).

O número de isoenzimas, bem como a abundância relativa de cada tipo de SOD variam de planta para planta e são influenciados pelos estímulos ambientais e de desenvolvimento (Bowler *et al.*, 1992). Por exemplo, em milho foram encontradas cinco isoenzimas em todos os tecidos da planta (Scandalios, 1997), na batateira observou-se a presença de sete isoenzimas de SOD (Fidalgo *et al.*, 2004) e numa outra planta C_3 (trigo) foram visualizadas apenas três isoenzimas (Santos *et al.*, 1999). De um modo geral, a atividade da SOD total é aumentada em resposta a situações ambientais desfavoráveis, confirmando-se a sua importância na defesa das plantas contra o stress oxidativo causado por essas situações (Yu & Zengel, 1999; Martinez *et al.*, 2001; Gabara *et al.*, 2003; Verma & Dubey, 2003; Kochhar & Kochhar, 2005; Bhargava *et al.*, 2007; Arbona *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010). Estudos realizados com plantas transgênicas vieram reforçar o papel desta enzima na tolerância ao stress oxidativo. Plantas de tabaco onde a Cu/ZnSOD foi sobreexpressa nos cloroplastos mostraram-se mais resistentes ao stress oxidativo causado pela luz intensa e baixas temperaturas (Gupta *et al.*, 1993), e o mesmo foi observado nas batateiras transformadas com cDNAs de Cu/ZnSOD plastidial e citosólica que foram mais tolerantes ao stress oxidativo induzido pelo calor ou metilviologénio do que as não transformadas (Perl *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 2006).

Adicionalmente, em alguns estudos foi possível relacionar o aumento da atividade de um determinado tipo de SOD com os locais da célula que são aparentemente mais afetados por certo tipo de stresses. Por exemplo, a maior atividade da SOD detetada em ervilheiras sujeitas a elevado nível de salinidade foi atribuída às atividades da FeSOD plastidial e da MnSOD mitocondrial e peroxissomal, em resposta ao aumento da produção de superóxido nesses organelos (Hernández *et al.*, 1993, 1999; Gómez *et al.*, 1999, 2004a). Anteriormente, Tsang *et al.* (1991) tinham já detetado que os transcritos de FeSOD ou de MnSOD aumentavam sempre que o fator de stress oxidativo afetava os cloroplastos ou as mitocôndrias, respetivamente. Assim, conclui-se que a existência de diversas formas enzimáticas de SOD, a sua localização intracelular e as alterações que sofrem durante o desenvolvimento ou em resposta aos estímulos exteriores, pressupõe que cada uma das isoenzimas desempenhe funções metabólicas distintas nas plantas (Scandalios, 1997). Por outro lado, o facto da SOD nas plantas ser codificada por múltiplos genes aliado à compartimentação subcelular das diferentes formas leva a admitir que a regulação da expressão das SODs será variável de acordo com os sinais ambientais (Raychaudhuri & Deng, 2000).

Catalase

A CAT é uma das enzimas responsáveis pelo controlo da concentração intracelular de H_2O_2 , daí assumir um importante papel na proteção contra os efeitos nocivos da acumulação desta ERO durante situações de stress. A ação desta enzima combinada com a da SOD permite converter o radical superóxido em água e oxigénio molecular, prevenindo a formação do tóxico e reativo OH^- (Dat *et al.*, 2000).

A CAT encontra-se em todos os organismos aeróbios, caracteriza-se por ser uma enzima tetramérica que contém um grupo prostético heme, que na presença de elevadas concentrações de H_2O_2 decompõe esta molécula em água e oxigénio molecular, através de uma reação em que o próprio H_2O_2 atua como aceitador e dador de moléculas de hidrogénio, não precisando assim de um substrato redutor para a sua atividade (Tabela 1.1). Quando as concentrações de H_2O_2 são reduzidas, a CAT pode comportar-se como uma ‘peroxidase’ e utilizar outros dadores de hidrogénio em substituição do H_2O_2 (etanol, ascorbato) (Scandalios *et al.*, 1997). Entre as enzimas que degradam o H_2O_2 , a CAT é a única que consegue catalisar este substrato sem consumir poder redutor, proporcionando à célula um mecanismo eficiente para remover o H_2O_2 (Scandalios, 2005).

Apesar desta enzima apresentar uma atividade catalítica muito elevada, possui baixa afinidade para o substrato, uma vez que a reação requer o acesso simultâneo de duas moléculas de H_2O_2 ao centro ativo da enzima (Willekens *et al.*, 1997). Depreende-se que são necessários níveis elevados de H_2O_2 para a enzima ser eficiente (Arora *et al.*, 2002). De facto, a enzima possui um elevado K_m , pelo que não é facilmente saturada pelo H_2O_2 ; sendo assim, a sua atividade aumenta linearmente com o aumento de concentração do H_2O_2 , assegurando a homeostasia do H_2O_2 na célula (Scandalios, 2005). No estudo realizado por Polidoros & Scandalios (1999) foi demonstrado que elevadas concentrações de H_2O_2 induziam a expressão dos genes da CAT (*Cat*), enquanto as concentrações baixas parecem ter inibido a expressão desses genes.

A catalase é encontrada sobretudo nos peroxissomas e glioxissomas, onde participa na remoção do H_2O_2 gerado durante a fotorespiração e β -oxidação dos ácidos gordos (Figuras 1.6 e 1.7) (Smirnoff, 1995). Em mitocôndrias foi já detetada a sua presença e envolvimento na remoção do H_2O_2 , embora a um nível muito inferior ao encontrado nas mitocôndrias de células animais (Willekens *et al.*, 1997; Peixoto *et al.*, 2004). Ainda assim, alguns autores contestam a presença e a função desta enzima nas mitocôndrias de células vegetais (Mittler, 2002; Navrot *et al.*, 2007). O mesmo parece suceder com a sua presença no citosol, que surge referenciada nos trabalhos conduzidos por Scandalios em milho (Scandalios *et al.*, 1997; Scandalios, 1990, 2005). Apesar de uma localização mais restrita do que a SOD, a CAT mostra-se importante na defesa contra o stress oxidativo ao evitar a difusão do H_2O_2 pela célula (Bowler *et al.*, 1992).

Ao contrário das células animais onde é encontrada uma única forma, nas plantas existem diversas formas enzimáticas de catalase produto de diferentes genes, conforme foi observado em espécies como *A. thaliana*, milho, *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana glauca* (Willekens *et al.*, 1994; Frugoli *et al.*, 1996; Scandalios *et al.*, 1997). O número encontrado é variável entre espécies, sendo possível que na mesma espécie a presença das isoenzimas varie em função do tecido analisado.

A presença de diversas isoenzimas de CAT nos vários tecidos e ao longo das fases de desenvolvimento da planta, bem como em diferentes condições de crescimento, sugere que as isoenzimas poderão assumir diferentes funções fisiológicas, para além da remoção do H_2O_2 (Scandalios *et al.*, 1997). Com efeito, estudos realizados em milho permitiram identificar os genes (*Cat1*, *Cat2* e *Cat3*) que codificam as três isoenzimas de catalase, verificando-se que a expressão de cada um dos genes *Cat* responde variavelmente aos

diferentes sinais ambientais (Scandalios *et al.*, 1997). Compreende-se assim que a CAT apresente um comportamento variável entre plantas e dependente do tipo de stress, verificando-se nalguns estudos que a atividade da enzima não esteve relacionada com a tolerância ao stress oxidativo (Balestrasse *et al.*, 2001; León *et al.*, 2002; Cavalcanti *et al.*, 2004, 2007; Cho & Seo, 2005), enquanto noutros revelou ser um componente importante na defesa antioxidante contra várias condições de stress abiótico (Santos *et al.*, 2004; Koca *et al.*, 2007; Nagamiya *et al.*, 2007; Semane *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007; Yazici *et al.*, 2007; Arbona *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2009; Pérez-López *et al.*, 2009).

Peroxidase do ascorbato

As peroxidases são enzimas ubíquas encontradas em todas as plantas verdes, algas, fungos e bactérias aeróbias, responsáveis pela redução do H_2O_2 em água (Shigeoka *et al.*, 2002). Estas enzimas encontram-se distribuídas pela célula e apresentam maior afinidade para o H_2O_2 do que a catalase, no entanto, requerem a presença de um substrato redutor (Tabela 1.1). Nas células animais, as peroxidases que usam a glutathiona reduzida (GSH) como dador de eletrões são as mais importantes na eliminação do H_2O_2 , enquanto nas células vegetais são as peroxidases que utilizam o ascorbato como molécula redutora (Noctor & Foyer, 1998; Møller, 2001; Asada, 2006). Embora a peroxidase do guaiacol participe também na eliminação celular do H_2O_2 , por isso faz parte do sistema antioxidante, a sua atividade é baixa nos organelos onde a produção de EROs é evidente como nos cloroplastos, peroxissomas e mitocôndrias (Asada, 1997). É um tipo de peroxidase menos específica relativamente ao dador de eletrões do que a peroxidase do ascorbato (APX), importante em outros processos fisiológicos como a biossíntese de lenhina e do etileno, estabelecimento de ligações cruzadas entre glicoproteínas e na defesa contra patogénios (Amako *et al.*, 1994).

A importância da APX na eliminação celular do H_2O_2 nas plantas advém do facto da enzima estar presente em praticamente todos os compartimentos da célula – citosol, cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas (Figuras 1.6 e 1.7), associado à elevada afinidade para o H_2O_2 , mesmo quando este está presente a baixas concentrações (Mittler, 2002). A enzima utiliza duas moléculas de ascorbato (AsA) para reduzir o H_2O_2 a água, gerando em simultâneo duas moléculas do radical monodesidroascorbato (MDHA), de acordo com a equação seguinte:



Compreende-se que para a atividade da APX o ascorbato terá que estar disponível na forma reduzida, logo é fundamental a sua regeneração a partir da forma oxidada (Foyer & Noctor, 2000). De facto, se a concentração desta molécula redutora for baixa (inferior a 20 μM), a enzima perde rapidamente a sua atividade na presença do H_2O_2 (Foyer & Shigeoka, 2011). Estudos realizados em mutantes *vtc1* de *A. thaliana* contendo pouco ascorbato mostraram uma diminuição na atividade da APX e uma maior sensibilidade dessas plantas a situações de stress (Conklin *et al.*, 1997).

Nas plantas superiores conhecem-se, pelo menos, cinco formas enzimáticas de APX classificadas com base na sua localização subcelular: a APX solúvel no estroma (sAPX) e a ligada às membranas dos tilacóides onde o complexo PSI está localizado (tAPX) nos cloroplastos, a forma citosólica (cAPX) e as formas associadas às membranas dos peroxissomas (pAPX) e das mitocôndrias (mitAPX) (Jiménez *et al.*, 1997; Shigeoka *et al.*, 2002). As isoenzimas da APX divergem entre si na especificidade do substrato, no pH ótimo de ação, na massa molecular, entre outras características (Bunkelmann & Trelease, 1996). As APX cloroplastidial e mitocondrial têm uma elevada especificidade para o ascorbato como dador de elétrons e são extremamente instáveis na sua ausência, já as APX citosólica e peroxissomal são menos específicas pois podem oxidar fenóis, nomeadamente o guaiacol ou pirogallol, a taxas apreciáveis para além do ascorbato (Jiménez *et al.*, 1998a; Asada, 1999).

As APXs são codificadas por uma família multigénica em que a expressão dos diversos genes varia de acordo com os sinais metabólicos e ambientais (Noctor & Foyer, 1998). Por exemplo, os níveis de transcritos e a atividade da APX, em particular da forma citosólica, aumentaram paralelamente à acumulação de H_2O_2 após a exposição de plantas a condições adversas (Yoshimura *et al.*, 2000; Pekker *et al.*, 2002). Segundo Morita *et al.* (1999), a expressão da cAPX é regulada pelo nível celular de H_2O_2 , verificando-se que a sua acumulação induz a expressão da isoenzima. No estudo proteómico efetuado em plantas de *A. thaliana* sujeitas à combinação do calor com a secura, entre as proteínas acumuladas estava a cAPX (Koussevitzky *et al.*, 2008).

Dos estudos realizados sobressai a importância da cAPX na proteção celular contra o H_2O_2 proveniente dos cloroplastos ou de outros compartimentos subcelulares em condições de stress oxidativo. De certo modo, poderá explicar o aumento generalizado de atividade

da APX observado em diversos trabalhos experimentais que usaram a fração solúvel para avaliarem o comportamento da APX e de outras enzimas do sistema antioxidante nas plantas em situações de stress abiótico (Lin & Kao, 2000; Parida *et al.*, 2004; Vyas & Kumar, 2005; Yang *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2009; Faisal & Anis, 2009). Nessas situações, as APXs plastidiais são as primeiras a serem inativadas pela falta de AsA no organelo, a atividade da cAPX é também prejudicada pela diminuição do AsA, embora a um ritmo mais lento, e perante a acumulação do H₂O₂ apenas a CAT é capaz de se manter ativa (Mano *et al.*, 2001). Nesta perspectiva, Mittler (2002) considera que a APX e a CAT pertencem a duas classes de enzimas com diferentes funções na remoção do H₂O₂; por um lado, a forte afinidade da APX pelo H₂O₂ torna-a responsável pela modulação dos níveis celulares de H₂O₂ para a sinalização e ativação dos mecanismos de defesa, por sua vez, a CAT é responsável pela prevenção dos danos celulares ao remover o H₂O₂ em excesso.

A utilização do ascorbato como dador de elétrões liga a APX a uma série de reações em que estão envolvidas três outras enzimas que asseguram a manutenção do ascorbato e da glutathiona no estado reduzido, ou seja, nas formas ativas enquanto moléculas antioxidantes. As enzimas são a monodesidroascorbato redutase (MDHAR), a desidroascorbato redutase (DHAR) e a glutathiona redutase (GR), que juntamente com a APX participam no ciclo ascorbato-glutathiona (AsA-GSH) (Smirnoff, 1995). Estas enzimas estão presentes nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas e citosol, juntamente com o ascorbato e a glutathiona (Figuras 1.6 e 1.7) (Jiménez *et al.*, 1997, 1998b; Asada, 1999). A distribuição intracelular das quatro enzimas sugere a importância do ciclo não só no controlo da concentração do H₂O₂ gerado nesses organelos, mas também na regulação dos níveis de ascorbato e glutathiona fundamentais na homeostasia redox intracelular (Kuzniak & Skłodowska, 2005).

Outras enzimas do ciclo ascorbato-glutathiona

A remoção do H₂O₂ pela APX constitui o primeiro passo do ciclo AsA-GSH (Foyer & Shigeoka, 2011). O AsA é então oxidado pela APX em monodesidroascorbato (MDHA), um radical que pode ser dismutado espontaneamente em AsA e em desidroascorbato (DHA), o produto final da oxidação do AsA. No entanto, o MDHA pode ser reduzido a AsA pela via da monodesidroascorbato redutase (MDHAR) que usa o NADPH como substrato redutor (Tabela 1.1), embora o citocromo do tipo b ou a ferredoxina reduzida possam ser também usados (Asada, 1999). Por sua vez, o DHA é reduzido a AsA pela ação

da desidroascorbato redutase (DHAR) que usa a glutatona (GSH) como dador de eletrões. Desta reação forma-se a glutatona oxidada (GSSG) que é posteriormente reduzida a GSH utilizando o poder redutor do NADPH, numa reação catalisada pela glutatona redutase (GR) e que completa o ciclo (Tabela 1.1; Figura 1.8) (Davey *et al.*, 2000). O ascorbato e a glutatona não são consumidos nesta via, participam na transferência cíclica de equivalentes redutores que envolve as quatro enzimas e que permite a redução do H_2O_2 em água a partir da oxidação do NADPH (Noctor & Foyer, 1998). Em condições normais, admite-se que o poder redutor usado na via do AsA-GSH provém do transporte fotossintético de eletrões nas membranas do cloroplasto ou das atividades da glucose-6-fosfato desidrogenase e da malato desidrogenase para a produção de NADPH (Davey *et al.*, 2000); contudo, não está devidamente esclarecido a fonte de energia redutora para remover o peróxido de hidrogénio através deste ciclo em situações de stress oxidativo que prejudicam o processo fotossintético (Mittler, 2002).

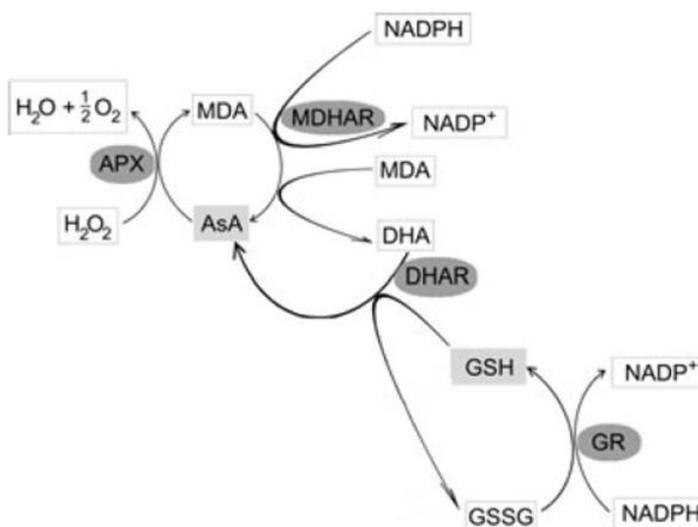


Figura 1.8 – Ciclo ascorbato-glutationa envolvido na remoção do peróxido de hidrogénio e na regeneração dos metabolitos antioxidantes (AsA e GSH). Adaptado de Pérez-López *et al.* (2010).

Como anteriormente referido, os cloroplastos constituem um importante local de produção de EROs nas células vegetais, estando particularmente sujeitos aos efeitos nocivos dessas espécies, não só pela presença do aparelho e pigmentos fotossintéticos e enzimas que participam no ciclo de Calvin-Benson, mas também pela elevada concentração de ácidos gordos polinsaturados nos tilacóides, os principais alvos da peroxidação (Smirnoff, 1995). A ausência de atividade de CAT nesse local leva a que o peróxido de hidrogénio gerado nos tilacóides a partir da fotorredução do O_2 no PSI, com a intervenção da SOD, seja metabolizado através do ciclo AsA-GSH, impedindo assim sua difusão pelo organelo (Asada, 2006). As elevadas concentrações de AsA e de GSH nos

cloroplastos favorecem a atividade das APXs plastidiais e a regeneração do AsA via DHAR e GR, o que torna o ciclo AsA-GSH especialmente importante no controlo dos níveis de H₂O₂ e na dissipação do excesso de energia fotoquímica nos cloroplastos em condições de stress (Foyer & Shigeoka, 2011). Não é assim de estranhar que os componentes do ciclo AsA-GSH, nomeadamente a atividade das duas enzimas chave do processo, a APX e a GR, bem como os níveis dos metabolitos antioxidantes sejam avaliados em vários estudos realizados em plantas e culturas de células expostas a meios adversos, de forma a estabelecer-se a relação entre os elementos enzimáticos e não enzimáticos na defesa antioxidante dos modelos biológicos ensaiados (Aravind & Prasad, 2005; Garneczarska, 2005; Kuźniak & Skłodowska, 2005; Locato *et al.*, 2009; Pérez-López *et al.*, 2010).

A GR é uma flavoproteína encontrada nos organismos fotossintéticos, quer procariontes, quer eucariontes, que intervém na proteção das plantas contra o stress oxidativo ao catalisar a redução da glutathiona no ciclo AsA-GSH (Tabela 1.1) (Edwards *et al.*, 1990). A GSH mantida através da GR é necessária para a função das proteínas biologicamente ativas ao proteger os grupos cisteína da ação das EROs (Yannarelli *et al.*, 2007). Daí ser frequente assistir-se ao aumento da atividade da GR em diversas situações em que ocorre stress oxidativo, tais como salinidade, secura, a radiação UV, elevada intensidade luminosa ou a contaminação por metais pesados (Foyer *et al.*, 1991; Edwards *et al.*, 1994; Verma & Dubey, 2003; Vyas & Kumar, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2006; Rao & Reddy, 2008). No caso concreto da planta do milho, a sensibilidade ao frio está relacionada com a ausência de atividade da GR nas células da bainha e, conseqüentemente, com a incapacidade destas para regenerarem a GSH (Kingston-Smith & Foyer, 2000; Pastori *et al.*, 2000). A localização exclusiva da atividade da GR, e também da DHAR, nas células do mesófilo foliar, leva a admitir que a GSSG, tal como o DHA, sejam transportados para o mesófilo para aí serem reduzidos (Noctor *et al.*, 2002).

Os estudos realizados em plantas transgênicas vieram confirmar a importância da GR na tolerância a diversos fatores de stress ao contribuir para o equilíbrio redox da célula. Aono *et al.* (1993, 1995) mostraram que plantas transgênicas de tabaco com elevada atividade de GR eram tolerantes à fotooxidação induzida pelo tratamento com herbicida ou com o poluente dióxido de enxofre. Também em tabaco, mas transformado com o gene *gor* de *E. coli*, a atividade da GR surgia aumentada em condições de stress oxidativo, apesar deste aumento não ter efeito na quantidade de GSH mas sim nos níveis de AsA (Foyer *et al.*,

1991). Usando o mesmo modelo biológico mas com reduzida atividade da enzima, Ding *et al.* (2009) observaram plantas com grande sensibilidade ao stress oxidativo, confirmando a função da GR na manutenção dos níveis de AsA.

A enzima localiza-se no estroma dos cloroplastos, nas mitocôndrias e citosol, tendo sido também detetada na matriz peroxissomal (Figuras 1.6 e 1.7) (Edwards *et al.*, 1990; Jiménez *et al.*, 1997; del Río *et al.*, 2002). Assim, em função da compartimentação intracelular existem diversas formas da GR, as isoenzimas plastidial, citosólica, mitocondrial e peroxissomal, cuja regulação é variável com os tecidos da planta e em condições de stress. De um modo geral, cerca de 80% da atividade total da GR localiza-se nos cloroplastos e em situações de stress verifica-se o aumento preferencial da atividade da GR plastidial, o que é consistente com a função da enzima e da GSH na prevenção dos efeitos oxidativos durante a fotossíntese e na estabilização das enzimas do ciclo de Calvin (Halliwell & Foyer, 1978; Noctor *et al.*, 2002). O facto da atividade das diferentes isoenzimas ser diferentemente afetada pelo stress, sugere que o aumento da atividade da GR num compartimento subcelular específico contribui para a manutenção da GSH essencial à homeostasia redox (Kuźniak & Skłodowska, 2005; Locato *et al.*, 2009). Apesar da pequena contribuição da GR peroxissomal para a atividade total da GR, esta isoenzima parece ter um papel importante em condições de stress ao assegurar a disponibilidade de GSH para reagir com o óxido nítrico (NO), gerado nos peroxisomas, e formar a S-nitrosoglutationa (GSNO), uma espécie reativa de azoto que funciona como molécula sinal a longa distância capaz de induzir a expressão dos genes relacionados com a defesa (Romero-Puertas *et al.*, 2006; Barroso *et al.*, 2006).

A DHAR contribui para o equilíbrio redox ao regular os níveis de AsA na célula, sendo determinante para a tolerância a situações adversas que induzem a produção de EROs (Chen & Gallie, 2006; Gill & Tuteja, 2010). O envolvimento desta enzima na proteção contra o stress oxidativo levou a que fosse estudada em alguns sistemas biológicos e, à semelhança das outras enzimas, a capacidade das plantas para crescerem em ambientes adversos esteve relacionada com o aumento da sua atividade e/ou expressão (Ben Amor *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006; Chen & Gallie, 2008; Gillespie *et al.*, 2011). De tal modo, que a acumulação de DHA e o aumento da atividade da DHAR foram já considerados indicadores bioquímicos do stress oxidativo nas plantas (Shimaoka *et al.*, 2003). Nesta perspetiva, a sobre-expressão da enzima permitiu aumentar a tolerância das plantas a algumas situações de stress abiótico, como aconteceu nas plantas transgénicas de A.

thaliana e de tabaco expostas a stresses vários, que através da maior atividade da APX e dos níveis superiores de AsA, desenvolveram-se melhor do que as plantas não transformadas, verificando-se o contrário quando a expressão da DHAR era suprimida (Chen & Gallie, 2005; Ushimaru *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2010). Acrescido ao seu papel na defesa antioxidante foi proposto o envolvimento da DHAR no crescimento celular e foliar, e no funcionamento dos estomas, através do controlo dos níveis de AsA, uma vez que este e respetivas formas oxidadas (MDHA e DHA) estão implicados nesses processos (Chen & Gallie, 2004, 2006).

A DHAR é muito específica no que diz respeito à molécula dadora de eletrões, de tal modo, que na falta de GSH e na presença de outros substratos (NADH, NADPH, cisteína ou tioredoxina reduzida) a enzima é incapaz de catalisar a redução do DHA (Hossain & Asada, 1984). A enzima é encontrada no citosol e no estroma dos cloroplastos (Figura 1.8), embora Jiménez *et al.* (1997, 1998b) tenham detetado a sua atividade nas mitocôndrias e peroxissomas, pelo que se admite que existam diversas proteínas com atividade DHAR (Hossain & Asada, 1984). Embora as tioredoxinas tenham atividade do tipo DHAR, verifica-se que são inibidas na presença de concentrações relativamente baixas de DHA, o que evidencia que a DHAR é um componente importante do sistema enzimático para evitar o stress oxidativo (Morell *et al.*, 1997).

1.2.3.2. Antioxidantes não enzimáticos

Para além das enzimas, existem pequenas moléculas capazes de neutralizar, remover ou transformar as EROs em moléculas menos reativas. Entre essas moléculas destacam-se o ascorbato e a glutatona presentes na fase aquosa de vários compartimentos celulares e o α -tocoferol associado às membranas celulares (Ahmad *et al.*, 2009).

Ascorbato

Nas plantas, caracteriza-se por ser o antioxidante mais abundante que se acumula praticamente em todos os tecidos vegetais, atingindo as maiores concentrações nos tecidos fotossintéticos e meristemáticos e em alguns frutos. Em geral, a sua concentração é superior nas folhas adultas onde os cloroplastos completamente desenvolvidos podem acumular no estroma concentrações que oscilam entre 20 até 300 mM (Smirnoff, 2000). Apesar de cerca de 30-40% do ascorbato total estar presente nos cloroplastos, o metabolito é também encontrado noutros locais da célula como o apoplasto, vacúolo, mitocôndria e

citossol, podendo neste caso atingir concentrações próximas de 20 mM (Figura 1.7) (Foyer & Noctor, 2005b). Estima-se que aproximadamente 10% do ascorbato intracelular esteja no apoplasto que, segundo Conklin & Barth (2004), constitui a primeira linha de defesa contra as EROs geradas neste espaço pelo ozono e outros poluentes atmosféricos.

Em circunstâncias normais, o AsA existe maioritariamente na forma reduzida o que é conseguido através da síntese de novo e da eficiente regeneração do AsA via enzimas do ciclo AsA-GSH, de modo a que no final os seus produtos de oxidação (MDHA e DHA) contribuam em cerca de 10% para o AsA total (Conklin & Barth, 2004). É o metabolito cuja concentração mais influencia o estado redox do meio intracelular, pelo que a regeneração do AsA é extremamente vantajosa e uma forma de evitar a perda da forma DHA, uma molécula particularmente instável ao pH do estroma (Smirnoff & Wheeler, 2000).

A capacidade para ceder eletrões numa série de reações enzimáticas e não enzimáticas faz do AsA o principal composto envolvido na eliminação das EROs na fase aquosa (Blokhina *et al.*, 2003). Esta molécula pode reagir diretamente com os radicais superóxido e hidroxilo e singleto de oxigénio, e reduzir o peróxido de hidrogénio a água através da reação da APX (Noctor & Foyer, 1998). Nos cloroplastos, o AsA atua também como cofator da violaxantina de-epoxidase, a enzima responsável pela formação da zeaxantina, sabendo-se que esta xantofila, juntamente com outros carotenóides, contribui para dissipar o excesso de energia fotoquímica e proteger os fotossistemas da fotooxidação (Asada, 1999). Uma das características mais importantes da atividade antioxidante do AsA consiste na regeneração do α -tocoferol a partir da sua forma oxidada, o radical α -tocoferoxil, assegurando assim a função deste composto lipossolúvel na proteção das estruturas membranares contra os efeitos nocivos dos radicais livres (Beyer, 1994). Daqui se conclui da importância do AsA na fotoproteção, cujas funções na fotossíntese passam ainda por ceder eletrões para o PSII e preservar a atividade das enzimas que contêm iões metálicos como grupos prostéticos (Foyer & Shigeoka, 2011). Compreende-se que o AsA seja a principal molécula envolvida na proteção dos cloroplastos contra as EROs resultantes da fotorredução do O₂ e fotorrespiração, cuja concentração pode aumentar ainda mais em situações de intensa luminosidade ou que limitam a assimilação fotossintética do CO₂ (Smirnoff, 2000). Com efeito, assistiu-se a um aumento dos níveis de AsA nas plântulas de *Picea asperata* mantidas sob elevada intensidade luminosa acompanhada de défice hídrico, tendo-se observado o mesmo resultado nas plantas de cevada crescidas em ambiente salino

sob níveis elevados de CO₂, bem como nas células em suspensão de *Dunaliella* cultivadas em condições de excesso de luz e baixa temperatura (Yang *et al.*, 2008; Haghjou *et al.*, 2009; Pérez-López *et al.*, 2010). Também a exposição de plantas a substratos com elevados teores de metais pesados ou à radiação UV-B induziu um aumento do ascorbato, o que mostra a sua importância na defesa contra o stress oxidativo (Hideg *et al.*, 2006; Agarwal, 2007; Domínguez *et al.*, 2009). As experiências realizadas em plantas mutantes de *A. thaliana vtcl* que acumulam apenas 30% do AsA quantificado nas do tipo selvagem contribuíram de modo significativo para caracterizar a função do AsA na adaptação a condições ambientais adversas. Essas plantas quando expostas a stresses vários (poluentes ozono e dióxido de enxofre, radiação UV-B, salinidade) apresentaram elevados níveis de H₂O₂ e de peroxidação lipídica (Conklin *et al.*, 1996, 1997, 2000; Conklin & Barth, 2004; Huang *et al.*, 2005), tendo Conklin *et al.* (1997) restabelecido a tolerância das plantas ao stress após o tratamento com um precursor da via biossintética do AsA (L-galactona-1,4-lactona), demonstrando assim a importância do metabolito na proteção contra os efeitos oxidativos.

A obtenção em 1996 do primeiro mutante *vtcl* “abriu caminho” ao conhecimento da via biossintética do AsA (Wheeler *et al.*, 1998), o que possibilitou não só o esclarecimento das funções fisiológicas do AsA nas plantas, como também o isolamento e caracterização de alguns dos genes envolvidos no metabolismo do AsA (Smirnoff *et al.*, 2001). A manipulação desses genes com vista ao aumento da produção de AsA permitirá melhorar o valor nutricional e a tolerância das plantas com interesse agrícola a fatores de stress (Conklin *et al.*, 2006; Dowdle *et al.*, 2007).

A importância do AsA nas células vegetais ultrapassa a função antioxidante, ao atuar como cofator de diversas enzimas, nomeadamente das hidroxilases que participam na síntese da hidroxiprolina, dos flavonóides e do etileno, estando também implicado na regulação do ciclo celular (Smirnoff & Wheeler, 2000). A evidência é baseada no facto da aplicação exógena de AsA acelerar a proliferação celular nos meristemas das raízes de *Allium* e *Pisum*, aumentando a quantidade de células que transitam da fase G1 para a S. Quando os níveis de AsA nesses tecidos diminuem as células permanecem na fase G1, não se dividem, verificando-se nessas células uma maior quantidade e atividade da enzima oxidase do ascorbato (AO) (Davey *et al.*, 2000). À partida, o estado redox do AsA determina o avanço do ciclo celular e a diminuição da relação AsA/DHA durante as

situações de stress oxidativo parece estar relacionada com a paragem da divisão celular (Potters *et al.*, 2002).

Se o AsA intracelular pode influenciar a divisão celular, o AsA apoplástico parece regular a expansão da parede e o alongamento celular. Com efeito, os níveis de AsA no apoplasto parecem ser regulados pela AO, cuja atividade está sobretudo localizada na parede celular e associada à expansão celular. A atividade desta enzima é particularmente elevada nos tecidos em rápido crescimento, como sejam as sementes em germinação ou durante o desenvolvimento dos frutos, e o MDHA produzido poderá ter um papel fundamental na regulação da expansão celular ao induzir a atividade da H⁺-ATPase na membrana plasmática (Smirnov, 1996). A concentração do AsA junto à parede celular pode também influenciar o processo de lenhificação e a atividade da peroxidase da parede, sabendo-se que o envolvimento do AsA no metabolismo da parede celular passa também por funcionar como substrato para a biossíntese do ácido oxálico (Smirnov & Wheeler, 2000).

O AsA intervém em muitos processos do metabolismo das plantas que vão além das funções de defesa e de cofator enzimático, influenciando também o desenvolvimento das plantas ao regular processos tão vários que vão desde a mitose e alongamento celular até à senescência e morte celular (Potters *et al.*, 2002; Conklin & Barth, 2004). Para alguns autores, o AsA assume maior importância ao proporcionar informação sobre o estado redox da célula, fazendo parte das vias de sinalização que regulam a expressão dos genes relacionados com as respostas de defesa aos stresses biótico e abiótico (Foyer & Noctor, 2005a,b, 2011; Noctor, 2006; Foyer & Shigeoka, 2011).

Glutationa

A glutatona (GSH) é o tiol mais abundante nas plantas que participa, direta ou indiretamente, em diversos fenómenos biológicos de importância vital para a célula, em que se destacam as funções na defesa e proteção celular (Noctor *et al.*, 2002). Este tripéptido (γ -glutamilcisteinilglicina; γ -Glu-Cis-Gli) constituído por ácido glutâmico (Glu), cisteína (Cis) e glicina (Gli) é conhecido por desempenhar um papel central no sistema de defesa ao reagir quimicamente com o singlete de oxigénio e os radicais superóxido e hidroxilo, enquanto participa enzimaticamente na remoção do peróxido de hidrogénio e na regeneração do AsA através do ciclo AsA-GSH (Blokhina *et al.*, 2003). Destaca-se ainda na proteção das proteínas contra a desnaturação causada pela oxidação dos grupos tiol

durante situações de stress, e a sua capacidade para quelatar iões metálicos como o cobre diminui a possibilidade de gerar radicais livres, prevenindo a peroxidação lipídica. Todas estas funções envolvem a oxidação do grupo tiol (-SH) para formar a glutathiona dissulfeto (GSSG). Apesar de existir nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), o seu estado reduzido prevalece nos tecidos em condições normais, distribuído por vários locais da célula como o citosol, vacúolo, mitocôndrias, cloroplastos e apoplasto (Figura 1.7) (Jiménez *et al.*, 1998b; Foyer & Noctor, 2011). A GSH funciona como um “tampão” redox que contribui para a manutenção do estado reduzido dos componentes celulares durante as condições normais de crescimento e de stress oxidativo, o que a torna num elemento essencial para a homeostasia redox (Foyer & Noctor, 2005a; Meyer, 2008). Esta propriedade faz com que a GSH participe na regulação do ciclo celular, nomeadamente na transição da fase G1 para a S, admitindo-se que o efeito que tem na ativação da divisão celular interfira com a regulação mediada pelas auxinas (Foyer *et al.*, 2001; Potters *et al.*, 2010).

O elevado nível de GSH em relação à GSSG pode ser mantido pela atividade da GR, através do aumento da síntese ou diminuição da degradação do metabolito, ou por intermédio do transporte de GSH e GSSG (Szalai *et al.*, 2009). O transporte de glutathiona a longa distância é conhecido e parece colmatar a diferente capacidade que os tecidos têm para a síntese e uso da GSH, para além da GSH ser usada como forma de transportar o enxofre reduzido das folhas para as outras partes da planta (Noctor *et al.*, 2002).

Em situações normais, a atividade da GR é suficiente para reduzir a GSSG de modo a manter a concentração intracelular de GSH acima dos 95%; já em situações de stress extremo, a oxidação da GSH excede a redução de GSSG e, perante a diminuição da relação GSH/GSSG, é estimulada a síntese e acumulação de glutathiona (Foyer *et al.*, 2001). Este efeito foi observado durante a exposição de choupos a um ambiente enriquecido em ozono, posteriormente ao tratamento de plantas de milho com baixas temperaturas e durante a resposta de hipersensibilidade em plantas de cevada inoculadas com o agente causador de míldio (Gupta *et al.*, 1991; Vanacker *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2004b). O estudo realizado por Mittova *et al.* (2003) confirmou não só a importância da GSH na tolerância das espécies de tomateiro ao stress salino, como evidenciou que as enzimas envolvidas na síntese da GSH são induzidas em resposta ao stress. As enzimas em causa são a γ -glutamilcisteína sintetase e a glutathiona sintetase, que a partir dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina e do ATP como cofator, conduzem em duas etapas à formação sequencial

do dipéptido γ -glutamilcisteína e da GSH. Uma vez que estão localizadas no citosol e estroma dos plastídios admite-se que é nesses locais da célula que ocorre a biossíntese da GSH (Noctor *et al.*, 2002).

Não é tecnicamente fácil quantificar a GSH nos organelos. Estima-se que os plastídios contêm as concentrações mais elevadas (1–4,5 mM) e que daqui é exportada para os restantes compartimentos e para fora da célula, admitindo-se a existência de transportadores intracelulares de GSH, embora ainda desconhecidos (Szalai *et al.*, 2009). Sabe-se, no entanto, que existem gradientes específicos entre certos compartimentos celulares, como é caso do citosol e apoplasto e/ou do citosol e vacúolo, estabelecidos por diferentes taxas de síntese e transporte de GSH, que por influenciarem a razão GSH/GSSG têm repercussões no metabolismo celular (Hartmann *et al.*, 2003). O transporte de glutatona ao nível da membrana plasmática tem sido objeto de estudo, nomeadamente do citosol para o apoplasto, dada a importância em disponibilizar a GSH necessária à defesa do apoplasto contra o stress oxidativo. Embora as concentrações de glutatona no vacúolo sejam baixas, é sabido que em situações de stress oxidativo a GSSG pode ser transportada para esse local por via dos transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) no tonoplasto, que podem também transportar a GSH mas sob a forma conjugada (Foyer *et al.*, 2001; Szalai *et al.*, 2009). Uma característica da GSH é a sua capacidade para se ligar a produtos tóxicos do metabolismo como os peróxidos lipídicos, ou a agentes eletrofílicos contribuindo para a desintoxicação de herbicidas e de outros xenobióticos. As glutatona-S-transferases (GSTs) são responsáveis pela formação desses conjugados no citosol, que são posteriormente compartimentados e degradados no vacúolo. A GSH é também substrato da enzima fitoquelatina sintase que gera os péptidos conhecidos por fitoquelatinas, que formam complexos com os iões metálicos que são depois armazenados no vacúolo, impedindo a sua acumulação no citosol (Cobbett, 2000). A quelação dos metais pelas fitoquelatinas é o mecanismo mais conhecido de tolerância ao stress por metais pesados, conforme foi observado em plantas expostas ao cádmio (Semane *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). Não é assim de estranhar que o aumento da concentração de GSH esteja relacionado com a capacidade das plantas para lidar com o stress oxidativo induzido por metais, verificando-se que se a concentração for baixa as plantas tornam-se muito sensíveis devido à síntese reduzida de fitoquelatinas (Xiang *et al.*, 2001; Demirevska-Kepova *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007).

A noção de que a GSH participa não só na remoção direta das EROs, mas pode também proteger as células contra os efeitos oxidativos do stress através da ativação de processos de defesa, incluindo a ativação da própria via biossintética, levou a sugerir o seu envolvimento na sinalização redox (Meyer, 2008). Nesta via de sinalização, a GSH interage com as EROs e eventuais perturbações na relação GSH/GSSG alteram o estado redox intracelular, que se traduzem em modificações na expressão génica (Kocsy *et al.*, 2001; Foyer & Noctor, 2011). Compreende-se que o par GSH/GSSG possa estar envolvido na perceção das EROs, fazendo parte das vias de transdução do sinal que induzem a síntese da própria GSH e ativam os mecanismos de defesa (Foyer & Noctor, 2005a, 2011; Noctor *et al.*, 2002; Noctor, 2006). Em consequência da aplicação exógena de glutathiona (GSSG) assistiu-se a um aumento do conteúdo foliar de GSH e à transcrição dos genes que codificam determinadas proteínas de patogénese (PR, 'Pathogenesis-related proteins') e diversas APXs, paralelamente à libertação de cálcio no citosol, o que mostra que a acumulação da glutathiona é tão importante na transdução do sinal como na defesa contra as EROs (Gómez *et al.*, 2004c).

α -Tocoferol

Os tocoferóis e os tocotrienóis formam a vitamina E e fazem parte das membranas celulares, onde são conhecidos pela atividade antioxidante e pelo seu contributo para a preservação da estabilidade destas estruturas. Os tocoferóis englobam quatro isómeros (α -, β -, γ -, δ -tocoferol), que diferem entre si pelo número e posição dos grupos metilo no anel de 2-metil-6-cromanol (Figura 1.9).

Os tocoferóis são encontrados nos plastídios, localizados nas membranas do envelope e dos tilacóides e nos plastoglóbulos, sendo o α -tocoferol o isómero predominante que constitui mais de 90% do tocoferol foliar (Foyer & Noctor, 2003). Para além do mais abundante, o α -tocoferol é o isómero com maior atividade antioxidante de-

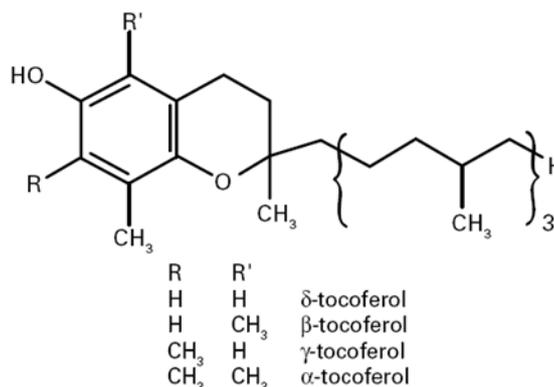


Figura 1.9 – Estrutura química dos tocoferóis. Adaptado de Munné-Bosch & Alegre (2002a).

vido à presença de três grupos metilo na sua estrutura molecular (Blokchina *et al.*, 2003). Nos plastídios é sintetizado a partir do γ -tocoferol por intermédio da γ -

tocoferolmetiltransferase, justificando de certo modo os elevados níveis de α -tocoferol que são detetados nas folhas de muitas espécies de plantas (Gill & Tuteja, 2010). A sua síntese foi detetada apenas nas plantas, algas e algumas cianobactérias, sendo esta distribuição reveladora da função destes compostos na proteção contra as EROs produzidas durante a fotossíntese (Munné-Bosch, 2005).

O α -tocoferol é particularmente ativo nas membranas tilacoidais ao remover as espécies $^1\text{O}_2$ e OH^- e os radicais lipídicos derivados da oxidação dos ácidos gordos polinsaturados, impedindo a formação de novos radicais livres e a reação em cadeia da peroxidação lipídica. O α -tocoferol pode neutralizar o $^1\text{O}_2$ através de um mecanismo de transferência de energia, podendo reagir quimicamente com esta ERO para gerar diferentes quinonas e epóxidos. Um desses produtos, a α -tocoferol quinona, com propriedades antioxidantes idênticas às do α -tocoferol, parece estar envolvido no fluxo cíclico de elétrons associado ao PSII, para além de dissipar o excesso de energia deste fotossistema (Munné-Bosch & Alegre, 2002a). O α -tocoferol já era conhecido por estar envolvido na proteção das moléculas de clorofila da fotooxidação (Wise & Naylor, 1987), e as evidências mais recentes que apontam para a interação do α -tocoferol e da respetiva quinona com o PSII, reforçam o papel deste composto na proteção das estruturas membranares do stress fotooxidativo (Kruk *et al.*, 2000; Krieger-Liszkay & Trebst, 2006). Contudo, a formação da α -tocoferol quinona e dos outros produtos oxidados pode levar à perda do antioxidante, dada a impossibilidade de regenerar o α -tocoferol a partir destes derivados. No entanto, quando o α -tocoferol reage com os produtos da peroxidação lipídica (radicais alcóxilo, peróxilo) dá-se a formação dos radicais tocoferóxilo, a partir dos quais é possível regenerar o α -tocoferol pela intervenção do AsA, embora a GSH e a coenzima Q possam também intervir (Munné-Bosch & Alegre, 2002b). A regeneração do α -tocoferol é extremamente útil para evitar a acumulação destes radicais que representam a forma pró-oxidante do tocoferol, especialmente na presença dos iões metálicos de transição e de outros agentes oxidantes. Por outro lado, permite reaproveitar o α -tocoferol para outras funções, como por exemplo ligar-se aos ácidos gordos livres, lisofosfolípidos e outros produtos da hidrólise de fosfolípidos característicos de fenómenos de stress, protegendo assim os componentes membranares dos efeitos nocivos destas substâncias (Blokhina *et al.*, 2003).

Nos cloroplastos, o α -tocoferol destaca-se dos outros compostos antioxidantes pelo facto de preservar a integridade das membranas, para além de aumentar a rigidez destas estruturas, influenciando certas propriedades como a fluidez e a permeabilidade à

passagem de pequenas moléculas e iões (Munné-Bosch & Alegre, 2002a). A função do α -tocoferol na estabilidade membranar associada ao seu contributo para a homeostasia redox nos cloroplastos tornam-no num elemento importante durante o desenvolvimento das plantas e na resposta ao stress. De facto, em várias situações de stress oxidativo os níveis de α -tocoferol surgem aumentados, e a sua diminuição é reveladora de uma situação de stress extremo, que conduz à degradação dos pigmentos fotossintéticos e eventualmente à desorganização do sistema lamelar (Lin *et al.*, 2004; Munné-Bosch & Alegre, 2003; Munné-Bosch, 2005; Shao *et al.*, 2008). Apesar de num grupo de plantas nativas e crescidas na região mediterrânica os níveis dos pigmentos fotossintéticos, bem como a fixação fotossintética do CO₂ terem decrescido durante o verão, o teor de α -tocoferol foi suficiente para evitar danos irreversíveis no aparelho fotossintético. Por sua vez, a diminuição observada em plantas sujeitas ao défice hídrico indicou a suscetibilidade destas ao stress oxidativo (Munné-Bosch & Alegre, 2000a,b; Munné-Bosch *et al.*, 2001). De um modo geral, as plantas tolerantes apresentam níveis mais elevados de α -tocoferol em situações de stress do que as plantas classificadas como sensíveis. Nesta perspetiva, o α -tocoferol tem sido relacionado com a tolerância ao stress oxidativo, a ponto de ser reconhecido como um indicador de tolerância (Ashraf & Harris, 2004; Munné-Bosch, 2005).

De acordo com Munné-Bosch (2005), os níveis de α -tocoferol variam durante o desenvolvimento da planta e em resposta às condições ambientais adversas, resultado de um aumento da síntese, degradação ou da regeneração do composto. Por exemplo, durante a senescência foliar a biossíntese do α -tocoferol é aumentada, e a sua acumulação nas folhas senescentes traduz a necessidade de uma maior proteção dos cloroplastos contra a peroxidação dos ácidos gordos libertados das membranas tilacoidais pela ação das lipases e lipoxigenases (Smirnoff, 1993; Munné-Bosch & Peñuelas, 2003; Abbasi *et al.*, 2007). O stress oxidativo induzido por fatores ambientais ativa também a expressão dos genes relacionados com a biossíntese dos tocoferóis, e assim se explica a acumulação do α -tocoferol em plantas sujeitas a ambientes salinos e com falta de água (Munné-Bosch & Alegre, 2003; Parida & Das, 2005). No entanto, determinadas fitohormonas relacionadas com o stress (ácido jasmónico, ácido salicílico e ABA) parecem estar envolvidas na regulação desses genes, conforme Munné-Bosch (2005) documentou. Mas caso o fator de stress se intensifique, os níveis endógenos de α -tocoferol tendem a diminuir perante a acumulação das EROs nos cloroplastos, uma vez que a degradação deste antioxidante

excede a sua síntese. E se a insuficiência do α -tocoferol não for compensada pelos antioxidantes hidrofílicos a peroxidação lipídica aumenta, bem como o risco de morte celular (Munné-Bosch & Alegre, 2002b). Segundo Munné-Bosch (2005) este tipo de resposta é característico da generalidade de plantas sensíveis ao stress. Do mesmo modo, a falta de α -tocoferol acelera a senescência foliar e o processo de envelhecimento em geral, conforme Abbasi *et al.* (2009) confirmaram em plantas transgênicas de tabaco.

O facto do α -tocoferol poder regular a concentração intracelular das EROs e de fitohormonas como o ácido jasmónico, que controlam não só o crescimento e desenvolvimento, mas também a resposta das plantas ao stress, leva a admitir que o α -tocoferol possa estar envolvido na sinalização e interagir com os principais componentes das vias de transdução do sinal, o que denota que as suas funções na célula excedem a atividade antioxidante (Munné-Bosch & Alegre, 2002a; Hyun *et al.*, 2011).

1.3. Mecanismos fisiológicos de tolerância à salinidade

O conceito de tolerância ao sal está vulgarmente associado à capacidade das plantas para crescerem e completarem o seu ciclo de vida num ambiente salino (Parida & Das, 2005). Mas para se desenvolverem num ambiente salino, as plantas terão que se adaptar à situação de stress osmótico e evitar a toxicidade pelos iões Na^+ e o Cl^- de modo a assegurar o normal funcionamento metabólico. As plantas utilizam diferentes estratégias para lidar com a salinidade, sendo algumas baseadas em estruturas anatómicas ou que envolvem um conjunto de células e/ou tecidos numa série coordenada de processos que requerem a organização estrutural que existe na planta intacta, podendo ser ainda usadas as estratégias intrínsecas à própria célula (Binzel *et al.*, 1985; Anil *et al.*, 2007). Daí a tolerância à salinidade ser uma característica fisiologicamente complexa que envolve a regulação sincronizada de diferentes processos que operam nos diversos níveis de organização estrutural das plantas (Flowers, 2004). Geneticamente a tolerância salina é também complexa. Cerca de 8% dos genes da planta são afetados ao nível da transcrição pela salinidade, estimando-se que menos do que 25% dos genes regulados pelo sal são específicos da salinidade (Ma *et al.*, 2006; Qureshi *et al.*, 2007). Se se considerar ainda os mecanismos de controlo pós-traducionais, conclui-se que o grande desafio atual ainda passa por compreender os mecanismos através dos quais as plantas se adaptam aos ambientes salinos (Shabala *et al.*, 2010). A complexidade fisiológica e genética que

caracteriza a tolerância salina poderá justificar a variação que existe não só entre grupos de plantas taxonomicamente distintos, bem como entre espécies ou entre plantas da mesma espécie nas respostas ao stress salino.

De acordo com Munns & Tester (2008), os mecanismos de tolerância à salinidade podem ser agrupados em três categorias: aqueles que minimizam a entrada do sal na planta e evitam a sua acumulação nas folhas, conhecidos pelos mecanismos de “exclusão do sal”; os que minimizam a quantidade de sal que se acumula no citosol através da compartimentação dos iões Na^+ e Cl^- aos níveis celular e tecidual; e aqueles que conferem à planta a capacidade de tolerar a componente osmótica do stress salino através da acumulação nas células de uma diversidade de solutos. Apesar de não ter sido referido por Munns & Tester (2008), pode-se incluir ainda o mecanismo de defesa antioxidante frequentemente induzido nas plantas como forma de se protegerem do stress oxidativo associado à salinidade. De notar, que as mudanças metabólicas aos níveis da célula e da planta conducentes à tolerância salina surgem associadas a alterações nos padrões de expressão de proteínas, em resultado do stress salino modificar a expressão genética (Timperio *et al.*, 2008).

1.3.1. Controlo da absorção e exclusão do sal

Na maioria das plantas, as folhas constituem o local mais suscetível à toxicidade pelo sal, logo é necessário que em meios salinos haja um controlo no movimento do sal para a raiz, e desta para os órgãos aéreos, através do fluxo hídrico que se estabelece ao longo da planta (Hasegawa *et al.*, 2000). Num compromisso de ajustar o potencial hídrico das células e evitar a toxicidade do Na^+ e Cl^- , um dos processos afetados pela acumulação de NaCl no meio externo é a regulação da entrada de iões, sobretudo do Na^+ e K^+ , e da sua distribuição pela planta (Tester & Davenport, 2003). Em muitas glicófitas, a exclusão do sal é a estratégia mais comum para evitar a sua acumulação nas folhas, tendo-se estabelecido uma relação inversa entre a absorção e a tolerância salina (Munns & James, 2003). Com efeito, o conceito de tolerância salina nas glicófitas é frequentemente associado à capacidade destas excluírem o Na^+ e Cl^- das partes aéreas, mantendo assim elevada a razão K^+/Na^+ nos seus tecidos (Teakle *et al.*, 2007; Teakle & Tyerman, 2010).

À partida, as raízes excluem a maioria do sal dissolvido no meio externo e, de acordo com a estimativa de Munns *et al.* (2006) baseada numa concentração externa de 100 mM NaCl , a exclusão deverá ser da ordem dos 98%, permitindo que não mais do que 2% do sal

seja absorvido e transportado no xilema para os órgãos aéreos, de modo a que o crescimento não seja afetado por esta concentração salina. Contudo, nem todas as espécies apresentam a taxa de exclusão referida, em algumas é inferior ao valor referido, acabando por absorver mais sal do que o desejável, conforme Munns (2005) mostrou em diferentes cereais. Com base nos trabalhos conduzidos em trigo, admite-se que a diferença entre genótipos na tolerância ao sal esteja relacionada com a quantidade de sódio que é excluído pelas raízes e que se reflete na concentração transportada para as folhas (Munns *et al.*, 2003; Munns & James, 2003). Embora num estudo recente em cevada, o cereal considerado mais tolerante ao sal, tenha sido demonstrado que a exclusão do Na^+ não é determinante na tolerância salina, bem pelo contrário, entre os cereais é aquele que apresenta as concentrações mais elevadas de Na^+ no tecido xilémico; neste caso, a tolerância surge associada à capacidade das plantas para manterem no xilema uma elevada razão K^+/Na^+ e de compartimentalizarem o Na^+ acumulado nas folhas (Shabala *et al.*, 2010).

Com base no exemplo da cevada, e de outras espécies tolerantes como o algodoeiro em que a exclusão do Na^+ não é a mais eficaz, acabando por acumular mais sódio nos órgãos aéreos, a tolerância salina está relacionada com a maior capacidade dessas plantas para regularem o transporte do Na^+ e Cl^- no sentido de minimizar a quantidade que estes iões atingem nos tecidos em crescimento (Teakle & Tyerman, 2010). Mesmo as halófitas, caracterizadas por acumularem elevadas concentrações de NaCl nas partes aéreas, mostram-se muito eficientes no controlo da absorção e transporte do Na^+ , pelo que a absorção não é proporcional à salinidade externa, nem exibem taxas de transporte superiores às das glicófitas em situações de elevada salinidade (Yeo, 1998). São vários os mecanismos envolvidos na regulação do transporte do Na^+ e Cl^- em situações de stress salino, baseados na seletividade das células da raiz para a entrada dos iões, no controlo do movimento dos iões para o xilema a partir do simplasto da raiz, ou na recuperação destes a partir do xilema antes que cheguem aos órgãos aéreos mais sensíveis (Munns, 2002; Munns *et al.*, 2006). A importância destes processos no controlo da acumulação de Na^+ e Cl^- nas folhas e no contributo para a tolerância salina em algumas espécies foi evidenciada em diversos trabalhos de revisão (Tester & Davenport, 2003; Horie & Schroeder, 2004; Apse & Blumwald, 2007; Munns & Tester, 2008; Plett & Møller, 2010; Teakle & Tyerman, 2010). A possibilidade da recirculação do sódio para a raiz tem sido sugerida como forma de evitar as concentrações excessivas do ião nos ápices caulinares e nas

folhas, contribuindo, de certo modo, para a tolerância à salinidade (Tester & Davenport, 2003; Shabala & Cuin, 2008). Num estudo comparativo, Perez-Alfocea *et al.* (2000) detetaram que a recirculação do Na^+ no floema era superior na espécie de tomateiro tolerante ao sal do que na menos tolerante. Contudo, estudos em que se procedeu à quantificação do Na^+ e Cl^- na seiva floémica mostraram que a retranslocação destes iões a partir das folhas é praticamente insignificante quando comparada com o fluxo de entrada por via do xilema, continuando presentes nas folhas mesmo após a remoção do sal do substrato (Munns, 1985; Munns *et al.*, 1986, 2006). Para além de que o processo de transporte associado à recirculação do sódio via floema não foi ainda identificado (Apse & Blumwald, 2007).

Para Munns (1993, 2005) outros mecanismos são mais relevantes para excluir o sal dos órgãos metabolicamente ativos e conferir tolerância à salinidade, nomeadamente reter os iões nas células da bainha foliar, como acontece nos cereais, ou nas células vacuolizadas da epiderme, minimizando assim a acumulação de Na^+ no mesófilo foliar. A compartimentação do sal em estruturas especializadas da folha como as glândulas salinas, características de algumas halófitas, ou nas folhas mais velhas, é fundamental para proteger a atividade metabólica das folhas mais jovens, menos aptas para a compartimentação intracelular do Na^+ .

1.3.2. Regulação iónica ao nível celular

Apesar das plantas disporem de diferentes estratégias para reduzirem a translocação do sal da raiz para a parte aérea, mesmo assim têm que lidar com uma proporção variável que chega às folhas e que se acumula nas células. A manutenção de baixas concentrações de Na^+ e Cl^- no citosol das células é de extrema importância para a sobrevivência das plantas em ambientes salinos. Uma vez na célula, o método mais simples para evitar a acumulação iónica no citosol a níveis tóxicos para as proteínas e inibidores da atividade de muitas enzimas essenciais, e que fomentam a desorganização das membranas e a produção de EROs é através da compartimentação dos iões nos vacúolos (Mahajan *et al.*, 2008; Plett & Møller, 2010; Teakle & Tyerman, 2010). No entanto, a exclusão do Na^+ do citosol pode ser feita, em menor extensão, por exclusão para o apoplasto. Para este espaço da célula ou para o vacúolo, a exclusão do ião depende de sistemas transportadores ao nível da membrana plasmática e do tonoplasto. Estes sistemas caracterizam-se por proteínas transportadoras que incluem as bombas de prótons H^+ -ATPases e H^+ -PPase (pirofosfatase)

e os transportadores secundários do tipo antiporte Na^+/H^+ , que por estarem envolvidos na regulação do efluxo do Na^+ e na compartimentação vacuolar são determinantes na tolerância ao sal (Horie & Schroeder, 2004; Türkan & Demiral, 2009).

Num meio salino, o gradiente eletroquímico determina o influxo passivo do Na^+ através da membrana plasmática, mediado por canais catiónicos não seletivos (NSCCs) e pelos transportadores de K^+ de elevada afinidade (HKTs) e por outros menos específicos (Anil *et al.*, 2007). A compartimentação vacuolar, que reduz os níveis deste ião no citosol, em termos energéticos facilita ainda mais o influxo passivo (Niu *et al.*, 1995). No entanto, o movimento iónico através da membrana terá que estar ajustado com o transporte para o vacúolo de modo a prevenir a acumulação do Na^+ no citosol (Cheeseman, 1988). Assim sendo, o efluxo do ião para o espaço apoplástico através da membrana plasmática é um processo ativo que depende do gradiente eletroquímico gerado pela bomba de prótons da membrana plasmática (PM- H^+ -ATPase) à custa do consumo de energia fornecida pela hidrólise de ATP. Este gradiente transmembranar é fundamental para a energização do antiportador Na^+/H^+ da membrana plasmática que associa ao movimento de H^+ para o citosol a exclusão do Na^+ (Figura 1.10) (Apse & Blumwald, 2007). Noutros organismos, como acontece nas células animais e nas algas foi descrito a extrusão do Na^+ da célula através da Na^+ -ATPase, mas nas plantas superiores o antiportador Na^+/H^+ constitui o principal mecanismo envolvido na homeostasia do sódio, pelo que a sua atividade é essencial para o crescimento das plantas em condições salinas (Zhu, 2003). De tal modo, que a indução da atividade do transportador em resposta ao stress salino foi detetada em diferentes espécies como aconteceu na halófita *A. nummularia* e nas espécies de tomateiro cultivado e halofítico, ou mesmo em *A. thaliana* (Wilson & Shannon, 1995; Blumwald *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2003). No entanto, a ativação do antiportador pelo NaCl e subsequente transporte do Na^+ para o apoplasto depende do gradiente de H^+ gerado pelo aumento da atividade da PM- H^+ -ATPase. Daí que esta bomba de prótons seja fundamental para a homeostasia iónica, como foi evidente em diversas plantas e culturas de tecido caloso expostas a concentrações elevadas de NaCl (Ballesteros *et al.*, 1998; Vera-Estrella *et al.*, 1999; Sibole *et al.*, 2005; Olías *et al.*, 2009). Adicionalmente, a tolerância ao sal de certas cultivares de trigo esteve relacionada com o aumento de atividade da PM- H^+ -ATPase, o que demonstra o contributo desta proteína membranar para a tolerância (Yang *et al.*, 2004). Conclui-se que a adaptação a meios salinos por via do antiportador Na^+/H^+ da

membrana plasmática pressupõe que haja um aumento do bombeamento de H^+ necessário à energização do transportador (Blumwald *et al.*, 2000).

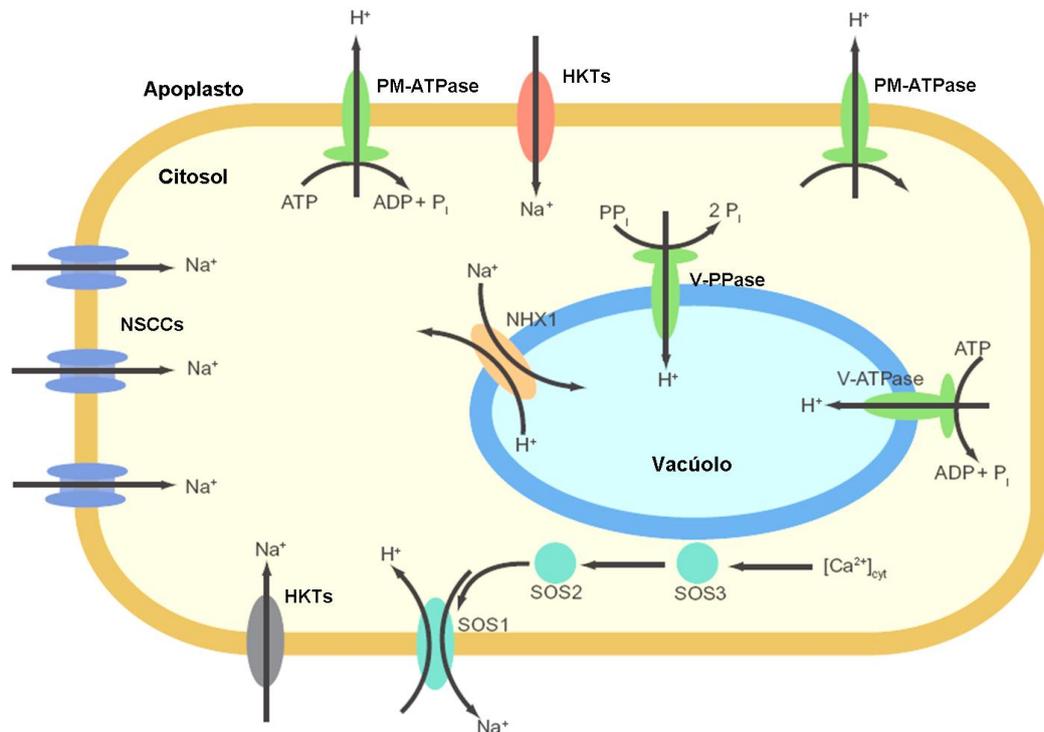


Figura 1.10 – Regulação da homeostasia iônica (Na^+) através dos transportadores iônicos e bombas de H^+ que estão envolvidos na exclusão e na compartimentação celular do Na^+ através das membranas plasmática e vacuolar, respetivamente. Para além destes intervenientes, encontram-se representados os canais e transportadores que se admite serem responsáveis pelo influxo passivo do Na^+ , bem como a via de sinalização SOS que regula a expressão e atividade dos transportadores iônicos. Nesta via, os níveis de Ca^{2+} no citosol são alterados após a perceção do stress salino por intermédio de um recetor na membrana plasmática. A proteína SOS3 reage às alterações de cálcio e interage com SOS2 para formar o complexo SOS3/SOS2 que, por sua vez, fosforila e ativa o antiportador Na^+/H^+ da membrana plasmática (SOS1). O complexo SOS3/SOS2 pode também ativar ou suprimir as atividades de outros transportadores envolvidos na homeostasia iônica, incluindo o antiportador Na^+/H^+ do tonoplasto (NHX1), as bombas $V-H^+$ -ATPase e $V-H^+$ -PPase, e os transportadores de K^+ e Na^+ da membrana plasmática (Zhu, 2002; Türkan & Demiral, 2009). Adaptado de Plett & Møller (2010).

Os mecanismos que regulam a expressão e atividade dos transportadores têm sido estudados, em particular a via de sinalização que regula o transporte de Na^+ na célula. Com o objetivo de identificar alguns dos componentes dessa via, diversos mutantes *sos* extremamente sensíveis ao sal de *A. thaliana* foram analisados e identificados três genes (*SOS1*, *SOS2* e *SOS3*) que funcionam numa via comum conhecida por regular a homeostasia iônica e a tolerância das plantas ao sal (Liu *et al.*, 2000). A via SOS envolve três componentes, a proteína SOS3 com ligação ao Ca^{2+} e que atua como sensor deste, a proteína cínase SOS2 do tipo serina/treonina que é ativada pela SOS3 na presença do

cálcio, e a proteína SOS1 localizada na membrana plasmática com atividade transportadora do tipo antiporte Na^+/H^+ , cuja expressão é sobre-regulada pela salinidade e controlada pelo complexo SOS3/SOS2 (Figura 1.10) (Shi *et al.*, 2000).

Os estudos realizados nas plantas mutantes *sos* puderam mostrar que a atividade do antiportador SOS1 não só é determinante no efluxo do Na^+ e na tolerância da *A. thaliana*, como poderá também funcionar como sensor do excesso de Na^+ (Zhu *et al.*, 1998; Zhu, 2003; Qiu *et al.*, 2003). A importância desta via de sinalização na homeostasia iônica e na regulação da expressão de alguns dos genes envolvidos nas respostas ao stress salino é demonstrada em algumas publicações (Apse & Blumwald, 2007; Mahajan *et al.*, 2008; Türkan & Demiral, 2009; Hauser & Horie, 2010).

1.3.2.1 Compartimentação vacuolar do Na^+

As células vegetais estão estruturalmente bem preparadas para a compartimentação dos íons devido à presença do vacúolo, descrito como o maior compartimento subcelular que ocupa mais de 80% do volume celular (Neuhaus, 2007). A compartimentação do Na^+ e Cl^- no vacúolo previne os efeitos tóxicos dos íons no citosol, pelo que constitui um mecanismo essencial na tolerância das plantas a ambientes salinos, quer das glicófitas, quer das halófitas. Só assim se pode explicar as elevadas concentrações de Na^+ que são quantificadas em folhas que funcionam normalmente sem mostrarem sinais de toxicidade pelo sal. Como acontece na halófito *Mesembryanthemum crystallinum* que é capaz de acumular na célula até 1 M de Na^+ , ou noutras que suportam concentrações próximas à da água do mar (Vera-Estrella *et al.*, 1999; Läuchli & Grattan, 2007). Concentrações acima de 200 mM são comuns em plantas crescidas em meios salinos, ainda que níveis desta ordem inibam completamente a atividade *in vitro* das enzimas. Conforme se referiu na secção 1.1., as atividades das enzimas isoladas de halófitas ou de plantas não tolerantes são igualmente inibidas *in vitro* pelo excesso de NaCl, o que sugere que a compartimentação do Na^+ é um mecanismo essencial em todas as plantas e não resultado da evolução diferencial das enzimas das plantas halofíticas (Munns & Tester, 2008). Com a exceção da presença eventual de glândulas excretoras de sal nas plantas tolerantes, a diferença entre estas e as plantas sensíveis à salinidade reside na maior eficiência da compartimentação vacuolar das primeiras (Yeo, 1998). Além disso, as halófitas usam o sódio confinado no vacúolo como osmólito, o que é vantajoso para a manutenção da turgescência e expansão celulares (Bohnert *et al.*, 1995).

Por vezes, confunde-se o teor de Na^+ nos tecidos da planta salinizada (folhas, caules ou raízes) com o teor citosólico, pois nas vulgares análises dos elementos inorgânicos nos tecidos vegetais não é tido em conta que uma parte significativa do Na^+ acumulado pode estar retido no vacúolo (Chen *et al.*, 2005). A microanálise por raios-X tem permitido localizar e estimar as concentrações dos iões acumulados nos compartimentos celulares. Um dos trabalhos pioneiros com esta técnica foi realizado em células de tabaco adaptadas a elevada salinidade (428 mM NaCl), que confirmou a acumulação dos iões Na^+ e Cl^- no vacúolo a concentrações da ordem de 780 mM e 624 mM, respetivamente, enquanto que os níveis de ambos os iões no citosol estavam abaixo de 100 mM (Binzel *et al.*, 1988). Os resultados obtidos da microanálise por raios-X em folhas da halófita *A. spongiosa* crescida em meio com 600 mM NaCl revelou concentrações iónicas consideravelmente superiores no vacúolo do que no citosol, o que evidencia que a compartimentação iónica é um mecanismo que possibilita às plantas suportarem níveis elevados de salinidade (Storey *et al.*, 1983). No entanto, e também recorrendo a esta técnica, Ottow *et al.* (2005) concluíram que a estratégia usada nas folhas de *Populus euphratica* para lidar com a salinidade (400 mM NaCl) consistiu na acumulação do Na^+ no apoplasto e não no vacúolo. Outros organelos, como os plastídios e mitocôndrias, podem também acumular algum Na^+ e contribuir para compartimentação subcelular do ião (Zhu, 2003). Mas, de um modo geral, os vacúolos são os organelos que mais fazem baixar o Na^+ no citosol, cuja concentração tende para não exceder os 150 mM, independentemente do teor salino no meio externo (Wang *et al.*, 2001). Para além de que a compartimentação vacuolar de Na^+ e Cl^- gera uma pressão osmótica elevada no interior do organelo favorável à entrada de água e ao crescimento da célula (Gaxiola *et al.*, 2001). Adicionalmente, contribui para a manutenção de uma razão K^+/Na^+ relativamente elevada no citosol fundamental para a homeostasia iónica em condições salinas (Fukuda *et al.*, 2004a). A compensação osmótica é feita no citosol pela acumulação de solutos orgânicos cuja natureza é variável, havendo referências a incrementos nos níveis de açúcares e de aminoácidos (Olmos & Hellín, 1996; Santos & Caldeira, 1999). Nas células de tabaco adaptadas ao sal, o Na^+ e Cl^- acumulados foram os principais solutos utilizados no ajustamento osmótico, tendo estado também envolvidos na osmoregulação de *P. euphratica* crescido na presença de NaCl (Binzel *et al.*, 1987; Ottow *et al.*, 2005). Apesar da acumulação de solutos orgânicos em ambos os modelos experimentais, o seu contributo para o ajustamento osmótico foi menor comparativamente ao dos solutos iónicos, o que parece ser vantajoso em termos

metabólicos. A estratégia em usar sobretudo os elementos inorgânicos no ajustamento osmótico é mais favorável do ponto de vista energético, uma vez que o sódio é um elemento abundante, enquanto que a síntese dos solutos orgânicos implica um consumo de energia que seria benéfico para o crescimento da planta (Zhu, 2001). Segundo Munns & Tester (2008), a exigência em ATP para a síntese dos solutos compatíveis nas células foliares é consideravelmente superior à quantidade necessária para acumular o sal como osmólito.

Os vacúolos são capazes de armazenar uma elevada quantidade de íons sódio e cloreto, entre outros, mas para que se estabeleça um gradiente de concentração em relação ao citosol o transporte de ambos para o vacúolo terá que ser ativo. O transporte do Na^+ é mediado pelo antiportador Na^+/H^+ que, à semelhança do antiporte localizado na membrana plasmática, utiliza o gradiente eletroquímico de H^+ gerado pelas bombas $\text{V-H}^+-\text{ATPase}$ e $\text{V-H}^+-\text{PPase}$ associadas ao tonoplasto (Figura 1.10). Estas proteínas são responsáveis pelo bombeamento de H^+ para o interior do organelo, a partir do consumo de ATP e de pirofosfato (PPi) respetivamente, criando um gradiente de H^+ transmembranar fundamental à energização dos sistemas de transporte ativo secundário, determinantes das funções associadas ao vacúolo como a osmorregulação, controlo de pH e armazenamento de íons e nutrientes (Martinoia *et al.*, 2007).

Desde há muito que se admite o envolvimento do antiportador Na^+/H^+ vacuolar no transporte do Na^+ e na capacidade das plantas para crescerem em meios salinos. As primeiras evidências do mecanismo de transporte do tipo antiporte Na^+/H^+ surgiram no tecido de reserva da espécie tolerante *B. vulgaris* e nas respetivas culturas de células em suspensão mantidas na presença de NaCl, tendo a ativação do antiportador Na^+/H^+ sido essencial para a tolerância destas ao sal (Blumwald & Poole, 1985, 1987). A atividade do antiportador foi também observada na halófita *M. crystallinum* exposta a 200 mM NaCl, ao passo que em *Plantago* a sua atividade foi detetada apenas na espécie tolerante ao sal (*P. maritima*) e não na sensível (*P. media*) (Garbarino & DuPont, 1988; Staal *et al.*, 1991; Barkla *et al.*, 1995). A ausência de atividade do transportador nas plantas sensíveis ao sal parece reforçar a noção de que estas plantas dependem da exclusão do Na^+ ao nível da membrana plasmática e não acumulam o ião no vacúolo (Blumwald, 2000).

Apesar das indicações sobre a função do antiportador Na^+/H^+ na compartimentação e homeostasia do Na^+ , a sua importância na tolerância salina foi confirmada após a identificação em *A. thaliana* do gene *AtNHX1*, homólogo do gene que codifica o

antiportador Na^+/H^+ vacuolar em *Saccharomyces cerevisiae* (*ScNHX1*), e posteriores estudos de sobre-expressão em várias plantas (Gaxiola *et al.*, 1999). Com efeito, a sobre-expressão do *AtNHX1* e de genes homólogos (*OsNHX1* e *TNHX1*) aumentou a tolerância à salinidade em *A. thaliana*, *Brassica napus* e *O. sativa* (Apse *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001; Apse & Blumwald, 2002; Fukuda *et al.*, 2004b; Brini *et al.*, 2007). Nestas plantas, o teor de Na^+ aumentou em consequência da exposição ao sal, no entanto, assistiu-se a um aumento dos níveis de transcritos e da proteína, bem como da atividade do antiportador no tonoplasto. A acumulação de Na^+ eventualmente contribuiu para manter a turgescência celular, ainda que conservando o ião a baixos níveis no citosol devido à sua compartimentação no vacúolo (Plett & Møller, 2010). Em plantas conhecidas pela sua tolerância ao sal, como é o caso das halófitas *M. crystallinum* e *A. gmelini*, e das plantas e culturas de células de *B. vulgaris*, assistiu-se a um aumento da expressão dos genes do antiportador do tipo NHX1 induzido pelo stress salino (Chauhan *et al.*, 2000; Hamada *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2002). Em *Gossypium hirsutum* verificou-se que a expressão do gene que codifica o antiportador Na^+/H^+ (*GhNHX1*) foi mais elevada nas cultivares tolerantes ao sal (Wu *et al.*, 2004), tendo-se observado um resultado idêntico nos genótipos mais resistentes de *Triticum aestivum* (Saqib *et al.*, 2005).

O gradiente eletroquímico de H^+ através da membrana vacuolar gerado pela V-H^+ -ATPase e V-H^+ -PPase constitui a força motriz para o transporte ativo secundário e acumulação de iões e de outros solutos no vacúolo, o que é revelador da importância das duas bombas de prótons na resposta ao stress salino. Embora a V-H^+ -ATPase seja uma proteína membrana generalizada em todos os eucariontes, a V-H^+ -PPase é encontrada nas plantas, em algumas algas e nas bactérias fotossintéticas. Para além de ser única na célula, a V-H^+ -PPase utiliza o PPI como fonte de energia, um substrato simples e de elevada energia, subproduto de diversas reações metabólicas em que se incluem os processos de síntese de proteínas, RNA, amido e celulose, ou a β -oxidação de ácidos gordos e a conversão do piruvato em fosfoenolpiruvato (Maeshima, 2000). Já a V-H^+ -ATPase está presente no sistema membrana de outros organelos além do vacúolo (retículo endoplasmático, complexo de Golgi), onde é responsável pela acidificação do interior destes compartimentos intracelulares, e cuja estrutura se assemelha às ATPases que existem nas mitocôndrias e cloroplastos (ATPases tipo F) (Barkla & Pantoja, 1996). Em contraste com a V-H^+ -PPase que consiste num só polipéptido de cerca de 80 kDa, a V-H^+ -ATPase é uma proteína multimérica composta por cerca de onze subunidades diferentes,

dependendo da espécie, com um peso molecular que ronda os 400-650 kDa. Caracteriza-se por dois domínios funcionais, o domínio periférico (V_1) hidrofílico voltado para o citosol e formado pelas sub-unidades A (70 kDa) e B (60 kDa), responsáveis pela atividade catalítica da enzima, e pelas subunidades C–H que ligam este setor ao domínio hidrofóbico inserido no tonoplasto (V_0) (Figura 1.11). O setor (V_0) é composto pela subunidade *a* e por várias cópias da subunidade *c* que compõem o canal de passagem dos prótons (Martinoia *et al.*, 2007).

Ao nível do tonoplasto, a $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ é a bomba de prótons mais abundante na maioria das plantas, estima-se que compõe até 35% da proteína total da membrana, enquanto que a $V\text{-H}^+\text{-PPase}$ pode constituir 1 a 10% da proteína total (Dietz *et al.*, 2001). Embora haja exceções como acontece nos tecidos jovens em crescimento e nos bagos de uva em que a $V\text{-H}^+\text{-PPase}$ é predominante, contribuindo para o pH

vacuolar altamente ácido (inferior a três) dos bagos (Maeshima, 2000). A sua estrutura aparentemente simples faz com que esteja menos sujeita à degradação provocada pela exposição dos bagos ao calor do que a $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$, tendo-se já confirmado a sua estabilidade a elevadas temperaturas, o que leva a admitir que a $V\text{-H}^+\text{-PPase}$ poderá ser a bomba de prótons mais ativa na acidificação do lúmen vacuolar em situações de stress (Martinoia *et al.*, 2007).

Nesta perspetiva, a sobre-expressão do gene da $V\text{-H}^+\text{-PPase}$ (*AVP1*) em *A. thaliana* resultou em plantas muito mais resistentes a elevadas concentrações de NaCl e à falta de água do que as plantas não transformadas (Gaxiola *et al.*, 2001). Anteriormente tinha sido já visto que a expressão heteróloga da pirofosfatase (*AVP1*) em leveduras restabelecia a tolerância salina de linhas mutantes sensíveis ao sal (Gaxiola *et al.*, 1999), e este resultado foi mais tarde confirmado por Gao *et al.* (2006) em plantas de tabaco.

Em princípio, a maior expressão de uma das bombas de H^+ deverá aumentar a compartimentação dos iões no vacúolo perante o gradiente prótonico gerado (Silva & Gerós, 2009). Assim foi observado na halófito *Salicornia bigelovii* crescida na presença de

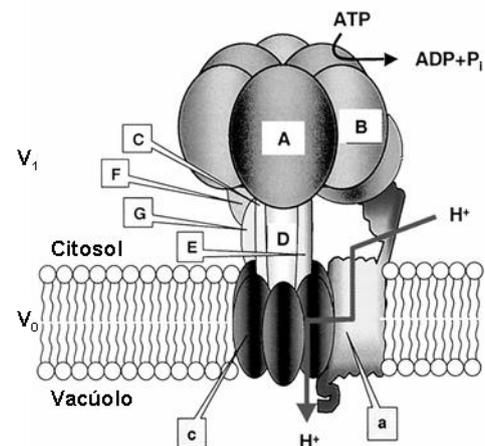


Figura 1.11 – Estrutura da $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$. O complexo da enzima é composto pelo domínio periférico à membrana responsável pela hidrólise de ATP (V_1), e pelo domínio transmembranar (V_0) que está envolvido na translocação dos prótons através do tonoplasto. Adaptado de Dietz *et al.* (2001).

elevada concentração salina, em que o aumento dos níveis de V-H⁺-PPase e da sua atividade de bombeamento estimulou o transporte de Na⁺ para o vacúolo por via do antiportador Na⁺/H⁺ (Parks *et al.*, 2002). Em cevada, o stress salino aumentou de forma idêntica os níveis de transcritos da V-H⁺-PPase (*HVPI*) e do antiportador Na⁺/H⁺ vacuolar (*HvNHX1*), o que indica que em situações de salinidade a expressão de ambos os transportadores envolvidos na acumulação do Na⁺ é coordenada (Fukuda *et al.*, 2004a). Estudos realizados mostraram que a expressão simultânea dos genes *AVPI* e *NHX1* em *A. thaliana* e na planta do arroz foi mais eficiente no aumento da tolerância salina do que a expressão apenas do antiportador (Zhao *et al.*, 2006; Brini *et al.*, 2007).

A coexistência de dois sistemas enzimáticos distintos a desempenhar a mesma função na membrana vacuolar é, aparentemente, paradoxal. É frequentemente aceite que a V-H⁺-ATPase tem um papel predominante na formação do gradiente eletroquímico transmembranar, ao passo que a V-H⁺-PPase parece funcionar como um sistema auxiliar no bombeamento de H⁺, principalmente nos tecidos mais jovens onde a produção de PPI é mais intensa (Façanha & de Meis, 1998). Rea e Sanders (1987) propuseram que, ao invés de ambas as enzimas operarem em paralelo no bombeamento de H⁺ para o interior do vacúolo, o gradiente de H⁺ gerado pela V-H⁺-PPase poderia promover a síntese de ATP, ativando o funcionamento reverso da ATPase, principalmente em condições de stress onde a produção de energia poderá estar mais comprometida. Em vesículas de tonoplasto de milho, a síntese de ATP foi obtida em resposta ao gradiente de H⁺ gerado pela hidrólise de PPI, o que mostra que a V-H⁺-PPase pode funcionar como um sistema de conservação de energia ao manter os níveis citosólicos de ATP (Façanha & de Meis, 1998). Rea & Poole (1993) já tinham salientado a importância fisiológica da V-H⁺-PPase na manutenção do gradiente protónico em condições de fornecimento reduzido de ATP, tendo os trabalhos de Carystinos *et al.* (1995) e de Darley *et al.* (1995) mostrado que em situações de baixa produção de ATP, como acontece na sequência da exposição de plantas a baixas temperaturas ou de anóxia, a V-H⁺-PPase pode substituir a V-H⁺-ATPase na acidificação do vacúolo, um aspeto que foi mais tarde confirmado por Martinoia *et al.* (2007). Contudo, em situações de salinidade tem-se verificado que a V-H⁺-ATPase é a enzima que mais contribui para a energização do sistema de antiporte Na⁺/H⁺ e, conseqüentemente, para a tolerância salina de várias plantas. Assim aconteceu nas plântulas de *Vigna unguiculata* em que o stress salino induziu a expressão da V-H⁺-ATPase e o aumento da sua atividade (Otoch *et al.*, 2001), bem como na halófito *S. salsa* sujeita a elevada salinidade (Wang *et*

al., 2001; Qiu *et al.*, 2007). Do mesmo modo, nas células em suspensão de *P. euphratica* a quantidade de proteína e a atividade da V-H⁺-ATPase aumentaram com a exposição ao NaCl, tendo a atividade da V-H⁺-PPase decrescido (Ma *et al.*, 2002). Foi proposto que a V-H⁺-PPase pode ser diretamente inibida pelo sal devido à semelhança do Na⁺ com o K⁺, um dos cofatores da enzima (Rea & Poole, 1993). Mais tarde, Silva *et al.* (2010) confirmaram em vesículas de tonoplasto de *P. euphratica* que a atividade de bombeamento da V-H⁺-PPase foi reduzida pelo NaCl adicionado ao meio de reação.

Apesar da discrepância nos resultados entre os vários estudos, é notória a importância das duas bombas de H⁺ para a tolerância salina, sobressaindo ainda que a atividade de ambas é regulada pelo sal, embora de um modo diferente, sabendo-se que a resposta da V-H⁺-PPase pode ser também modulada pela fase de desenvolvimento em que a planta se encontra ou por fatores inerentes ao tecido em estudo (Maeshima, 2001).

1.3.3. Acumulação de solutos compatíveis

A compartimentação do Na⁺ e Cl⁻ no vacúolo requer um aumento coordenado da pressão osmótica nos restantes compartimentos subcelulares e no citosol de modo a que estes mantenham a sua turgescência e volume (Munns & Tester, 2008). Isto pode ser conseguido através da síntese e acumulação no citosol e organelos de solutos orgânicos, que não interferem com a atividade metabólica normal, mesmo estando presentes em elevadas concentrações, daí serem conhecidos por solutos compatíveis. Inclusive, muitos deles parecem ter uma função protetora contra os efeitos nocivos da salinidade, pelo que é frequente a designação de osmoprotetores (Tester & Davenport, 2003). Mas este processo de ajustamento osmótico não só é necessário para equilibrar a pressão osmótica do citosol com a do vacúolo, como assume especial importância nas espécies que excluem o sal como mecanismo de resposta à salinidade, que dependem da acumulação de compostos orgânicos, ou de iões como o K⁺ e o Ca²⁺, para evitar a perda de água das células (Hasegawa *et al.*, 2000). Como se referiu atrás, em termos energéticos é mais penalizador para a planta depender em pleno da acumulação de metabolitos orgânicos para aumentar a sua tolerância osmótica em ambientes salinos, pois a síntese destes solutos envolve um elevado consumo de fotoassimilados que são desviados de outros processos metabólicos essenciais no crescimento das plantas (Munns & Tester, 2008). Estudos feitos em tomateiro e na planta do sorgo crescidos na presença de NaCl mostraram que o ajustamento osmótico à custa da acumulação de açúcares esteve associado com a

diminuição do crescimento (Sacher & Staples, 1985; Yang *et al.*, 1990). Para Munns & Tester (2008) o mecanismo baseado na exclusão do sal permite à planta evitar o problema da toxicidade iônica, mas a menos que a exclusão do Na⁺ seja compensada pela absorção de K⁺, estabelece-se uma forte dependência da síntese de solutos que poderá pôr em risco o balanço energético da planta. Por outro lado, é sabido que a salinidade reduz o fornecimento de fotoassimilados para o crescimento caulinar através da redução da fotossíntese ou da taxa de transporte dessas substâncias para as zonas de crescimento (Yang & Lu, 2005). Daí que a capacidade da planta para manter a turgescência através do ajustamento osmótico é condicionada pelo fornecimento de fotoassimilados (Munns, 1988). À partida, a maior disponibilidade de fotoassimilados contribui para a resistência das plantas ao sal (De Costa *et al.*, 2007). Neste aspeto, as plantas e/ou linhas celulares que acumulam Na⁺ e Cl⁻ e os usam como principais osmólitos, chegando mesmo a exibir uma correlação positiva entre a tolerância e as concentrações intracelulares dos iões, como acontece na linha celular de tabaco adaptada ao sal e na planta de cevada, bem como na maioria das halófitas, recorrem aos solutos orgânicos para outras funções na célula (Binzel *et al.*, 1987; Munns & James, 2003; Flowers & Colmer, 2008). Ottow *et al.* (2005) observaram em *P. euphratica* um ligeiro aumento dos níveis de aminoácidos em resposta ao stress salino, que apesar de não terem um papel ativo na osmoregulação, que pertenceu ao sódio, estiveram envolvidos na estabilização das proteínas, contribuindo para a osmoproteção.

A função dos solutos compatíveis ultrapassa o efeito na manutenção da turgescência celular, estando também envolvidos na estabilização de proteínas e estruturas membranares, para além de poderem participar na remoção das EROs (Ashraf & Foolad, 2007). Para Munns (2005), a função destes solutos na célula é variável com a sua concentração, isto é, as elevadas concentrações contribuem para o ajustamento osmótico, ao passo que as baixas concentrações desempenham uma função protetora. Os solutos compatíveis caracterizam-se por serem moléculas altamente solúveis, em geral de baixo peso molecular, neutras ou polares e com uma elevada capacidade de hidratação (Sairam & Tyagi, 2004). Englobam diversos açúcares, aminoácidos e aminas quaternárias. Uma característica comum nas plantas expostas ao sal e também a outras situações de stress que induzem a perda de água, incluindo a secura e as temperaturas extremas, é a acumulação desses solutos, que se admite ser essencial para a tolerância a esses fatores de stress (Bohnert *et al.*, 1995; Chen & Murata, 2002; Wahid *et al.*, 2007). Vários estudos referem

uma relação positiva entre a acumulação de diversos solutos orgânicos e a tolerância ao stress osmótico resultado da salinidade ou do déficit hídrico (Smirnoff, 1998; Watanabe *et al.*, 2000; Longstreth *et al.*, 2004; Gill & Tuteja, 2010). Este facto motivou a transformação genética de algumas plantas para o aumento da produção de determinados osmólitos com o objetivo de elevar a sua tolerância ao stress (Chen & Murata, 2002; Roosens *et al.*, 2002; Molinari *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010b). Em alternativa, foi possível contrariar os efeitos das condições ambientais adversas através da aplicação exógena de alguns solutos, nomeadamente de glicinabetaína e de prolina. Ashraf & Foolad (2007) descreveram alguns exemplos que evidenciam os efeitos positivos da aplicação exógena destes dois compostos na produtividade de várias plantas com interesse agrícola sujeitas a condições de stress. Acrescente-se que os danos ultraestruturais induzidos pela salinidade em organelos como os cloroplastos e mitocôndrias foram evitados pelo tratamento das plantas com glicinabetaína (Rahman *et al.*, 2002).

A natureza química dos solutos compatíveis envolvidos na tolerância osmótica varia com os grupos taxonómicos. Entre os aminoácidos, a prolina é acumulada por um conjunto de plantas taxonomicamente diverso em resposta a situações de stress osmótico e não só, por isso é considerada um dos solutos compatíveis mais comuns. A glicinabetaína é o composto quaternário de amónio mais conhecido nas plantas, embora a sua acumulação esteja confinada a um grupo mais restrito de espécies sujeitas sobretudo a condições de secura e de calor (Smirnoff, 1998; Wang *et al.*, 2010b). Em certas halófitas e espécies conhecidas por acumularem elevados níveis de Na^+ em meios salinos, como é o caso das plantas de beterraba, cevada ou de espinafre, a concentração de glicinabetaína pode atingir elevadas concentrações nos cloroplastos e citosol, enquanto que em outras a sua acumulação é inferior ao necessário para impedir a desidratação (Marschner, 1995; Bartels & Sunkar, 2005; Ashraf & Foolad, 2007). Ao que parece em espécies como *O. sativa*, *A. thaliana* ou *N. tabacum* não é possível produzir naturalmente o composto devido à falha de algumas das enzimas envolvidas na sua síntese (Rhodes & Hanson, 1993).

A acumulação de diferentes tipos de hidratos de carbono é também referida em algumas plantas crescidas em condições de stress, a ponto de ter sido sugerido o seu envolvimento na tolerância ao stress osmótico (Khavari-Nejad & Mostofi, 1998; Watanabe *et al.*, 2000; Kerepesi & Galiba, 2000; Bartels & Sunkar, 2005). Sacarose, manitol e sorbitol são alguns dos hidratos de carbono que mais contribuem para o ajustamento osmótico em plantas sob stress salino. Estes compostos parecem ter um papel ativo na proteção da integridade

membranas ao interagirem com os grupos polares dos fosfolípidos e na estabilização de complexos proteicos ou enzimas. De acrescentar, que constituem uma forma de reserva de carbono o que é útil em situações de stress (Parida & Das, 2005; Manchanda & Garg, 2008).

A acumulação de prolina é uma resposta bem conhecida a situações de déficit hídrico e salinidade não só em plantas, mas também noutros organismos (Ashraf & Harris, 2004; Manchanda & Garg, 2008). Para além do calor, sabe-se que outros tipos de stress são igualmente indutores da sua acumulação, como é o caso do excesso de cádmio, a elevada intensidade luminosa ou a radiação UV, no entanto, os níveis acumulados parecem ser inferiores aos induzidos pelo sal (Claussen 2005; Kishor *et al.*, 2005; Fidalgo *et al.*, 2011). A acumulação de prolina em condições de stress osmótico resulta essencialmente do aumento da sua síntese, que ocorre no citosol e plastídios, e do decréscimo da degradação que tem lugar nas mitocôndrias. Nessas condições, a prolina é sintetizada sobretudo a partir do glutamato através de duas reações redutoras sucessivas catalisadas pela Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR), respetivamente. Uma outra via metabólica que envolve a molécula precursora ornitina, transaminada em Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato pela enzima mitocondrial ornitina- δ -aminotransferase, contribui igualmente para a acumulação de prolina. Verifica-se que em plantas jovens de *A. thaliana* a via da ornitina, juntamente com a do glutamato, promovem a acumulação do aminoácido durante o stress salino, enquanto que a via do glutamato é ativada nas plantas adultas (Türkan & Demiral, 2009). Ambas as vias parecem contribuir para o aumento dos níveis de prolina em *Medicago truncatula* exposta ao sal, independentemente da fase de desenvolvimento (Armengaud *et al.*, 2004).

Os trabalhos realizados no âmbito do stress salino são unânimes em atribuir à prolina um papel no ajustamento osmótico dado o aumento considerável do aminoácido nas células vegetais em meios salinos. Em células da halófita *Distichlis spicata* tratadas com 200 mM NaCl, estimou-se uma concentração citosólica de prolina em mais de 230 mM (Ketchum *et al.*, 1991). A acumulação do aminoácido atingiu nas folhas da brássica *Pringlea antiscorbutica* sob stress salino teores 2-3 vezes superiores no citosol do que no vacúolo (Aubert *et al.*, 1999). Outros estudos são concordantes em mostrarem que os níveis elevados de prolina são característicos das plantas tolerantes à salinidade (Demiral & Türkan, 2006; Koca *et al.*, 2007; Aghaei *et al.*, 2008), mas nem sempre é evidente a correlação entre a acumulação do osmólito e a tolerância ao stress. Acontece, por exemplo,

na planta de cevada em que os elevados teores do aminoácido quantificados nas cultivares mais suscetíveis à salinidade parecem não ter tido um papel relevante na tolerância, sendo uma consequência da situação de stress (Chen *et al.*, 2007b; Widodo *et al.*, 2009). De igual modo, o mutante de *A. thaliana eskimo-1* descrito como um acumulador de prolina em condições salinas revelou-se sensível ao sal (Ghars *et al.*, 2008). Lutts *et al.* (1996b) já havia concluído que a acumulação de prolina parecia não estar relacionada com o ajustamento osmótico das plantas de arroz submetidas a stress salino, tendo os autores interpretado este tipo de resposta como um indicador de suscetibilidade em vez de um indicador de tolerância ao sal.

Apesar de alguma controvérsia em torno da função da prolina na osmoregulação, o papel da prolina na tolerância ao sal deverá ser devidamente esclarecido, nomeadamente avaliar se a relação com a tolerância ao stress é específica da espécie ou se é afetada pelas condições experimentais, antes de ser usada como um indicador de tolerância ao sal (Ashraf & Harris, 2004). Contudo, são mais as evidências que descrevem a existência de uma relação positiva entre a acumulação de prolina e a tolerância ao stress do que o contrário. Nesta perspetiva, a manipulação genética da via biossintética da prolina tem permitido a obtenção de plantas com maior tolerância ao stress osmótico, tal como Kishor *et al.* (1995) mostraram nas transgênicas de tabaco em que a sobre-expressão do gene de uma das enzimas da via (P5CS) levou à acumulação de prolina e à maior tolerância à secura e salinidade. Em sentido inverso, Hong *et al.* (2000) ao impedirem a inibição dessa enzima pelo mecanismo de ‘feedback’ induzido pela própria prolina, conseguiram ter no final plântulas de tabaco capazes de crescerem na presença de 200 mM NaCl. Uma estratégia mais acessível para melhorar o comportamento das plantas em condições adversas consiste na aplicação exógena de prolina (Ashraf & Foolad, 2007).

Em alguns estudos é notório o efeito osmoprotetor da prolina fornecida pelo exterior, nomeadamente nas culturas de células em suspensão de *N. tabacum* cultivadas em meio salino onde a prolina exógena não só impediu a morte celular, como atenuou o efeito inibidor do sal no crescimento das células e aumentou a atividade das enzimas do ciclo AsA-GSH, conferindo uma maior proteção contra o stress oxidativo (Okuma *et al.*, 2000; Hoque *et al.*, 2007a,b; Banu *et al.*, 2009). A atividade antioxidante da prolina foi confirmada por vários autores (Okuma *et al.*, 2004; Molinari *et al.*, 2007; Krishnan *et al.*, 2008; Gill & Tuteja, 2010) e, sendo capaz de remover as EROs, a prolina protege as proteínas, DNA e estruturas membranares dos danos causados por estas espécies, além de

poder ligar-se a íons metálicos e evitar a formação do radical OH^- (Miller *et al.*, 2010). Acrescente-se ainda a capacidade da prolina para dissipar o excesso de poder redutor durante as condições de stress, o que reforça o seu contributo na célula para a homeostasia redox. O facto de ser degradada na mitocôndria e de estar associada à cadeia respiratória faz com que a prolina possa ser uma fonte de energia importante para a recuperação do crescimento após o stress. A noção de que a prolina pode atuar ainda como uma molécula de sinalização e influenciar a proliferação ou a morte celular, e regular as respostas de defesa aos stresses abiótico e biótico é um outro aspeto da diversidade funcional que a caracteriza (Szabados & Saviouré, 2009).

1.3.4. Indução do sistema de defesa antioxidante

As plantas em meios salinos têm que lidar não só com o défice hídrico resultante do efeito osmótico e com o desequilíbrio iónico e toxicidade provocados pela acumulação do Na^+ e Cl^- , mas também com o aumento da produção de EROs associado a estes efeitos (Hernández *et al.*, 1995, 1999; Hernández & Almansa, 2002; Foyer & Noctor, 2003; Mahajan *et al.*, 2008). É sabido que a salinidade é um dos fatores abióticos indutores de stress oxidativo nas plantas. Como foi referido atrás (secção 1.2.2.), condições que reduzem a difusão de CO_2 através dos estomas e do mesófilo foliar, limitando o fornecimento de CO_2 para a atividade da RuBisCo e o consumo de NADPH pelo ciclo de Calvin, como acontece com a salinidade, estimulam a produção de EROs. Os cloroplastos, peroxissomas e mitocôndrias são organelos com uma elevada atividade metabólica oxidante pelo que são importantes fontes de EROs, ficando particularmente expostos aos efeitos citotóxicos das mesmas. Os efeitos das EROs e as suas consequências foram descritas na secção 1.2.1. Foyer e colaboradores (Foyer & Noctor, 2003, 2005a; Foyer & Shigeoka, 2011) consideram que grande parte dos prejuízos causados pela exposição das plantas a situações adversas está relacionada com os danos oxidativos a nível celular. Nesta perspetiva, as plantas tolerantes ao sal para além de serem capazes de regular a absorção e a compartimentação iónica, deverão apresentar um sistema antioxidante eficiente que as proteja da ação das EROs e impeça que se acumulem na célula (Mahajan & Tuteja, 2005). As plantas defendem-se destas espécies através da indução da atividade de enzimas como a SOD, CAT e APX que eliminam as EROs através de uma série de reações, e das enzimas que participam na regeneração das formas ativas dos compostos antioxidantes (MDHAR, DHAR e GR). Estes compostos de baixo peso molecular (AsA, GSH e α -tocoferol, entre

outros) reagem diretamente com as EROs e são fundamentais para a homeostasia redox na célula. A atividade coordenada dessas enzimas distribuídas pelos diferentes compartimentos celulares, juntamente com os compostos antioxidantes compensa o aumento da formação das EROs em situações de stress através da sua remoção, regulando os níveis internos destas espécies para que atuem como moléculas sinal (Hernández & Almansa, 2002).

O grau de stress oxidativo nas plantas sujeitas a condições ambientais desfavoráveis é controlado pelo sistema de defesa antioxidante (Türkan & Demiral, 2009). Assim, é esperado que plantas com maior capacidade antioxidante, constitutiva ou induzida pelo sal, sejam mais tolerantes à salinidade (Ellouzi *et al.*, 2011). Para Xiong & Zhu (2002), a capacidade para remover as EROs e reduzir os seus efeitos sobre os componentes celulares representa uma característica de tolerância ao stress salino. De facto, vários estudos mostram que o crescimento das plantas em condições salinas está associado ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes que lhes confere maior proteção contra o stress oxidativo (Lin & Kao, 2000; Lee *et al.*, 2001; Goreta *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007; Yazici *et al.*, 2007; Ashraf & Ali, 2008; Pérez-López *et al.*, 2009). A maioria dos resultados aponta para uma relação direta entre a atividade antioxidante e a tolerância ao sal, como foi observado nos génotipos tolerantes de beterraba ou de trigo, que mostraram maior capacidade para lidarem com a presença das EROs através da ativação do sistema antioxidante enzimático (Sairam & Srivastava, 2002; Bor *et al.*, 2003; Sairam *et al.*, 2005). Mesmo nas halófitas, os dados sugerem que a indução do sistema defesa antioxidante é um componente importante na adaptação à salinidade (Cai-Hong *et al.*, 2005; Ben Amor *et al.*, 2006; Ellouzi *et al.*, 2011).

Nos estudos realizados em ervilheiras foi possível concluir que a salinidade altera a quantidade e atividade de algumas das enzimas antioxidantes, bem como os níveis de transcritos correspondentes, embora se tenha verificado que a tolerância ao sal envolve a indução de determinadas isoformas das enzimas SOD, APX, DHAR e GR. Desses estudos sobressai ainda a importância da atividade antioxidante no controlo dos níveis de EROs nos cloroplastos, mitocôndrias e citosol, que de uma forma coordenada contribui para a tolerância das plantas a condições salinas (Gómez *et al.*, 1999, 2004a; Hernández *et al.*, 1993, 1995, 1999, 2000; Hernández & Almansa, 2002; Noreen & Ashraf, 2009). Neste sentido, tem havido a preocupação em aumentar a proteção contra o stress oxidativo mediante a sobre-expressão de isoformas da SOD e da APX, ou mesmo da CAT,

conseguindo-se plantas mais resistentes à secura e salinidade (Wang *et al.*, 1999; Badawi *et al.*, 2004a,b; Wang *et al.*, 2004; Nagamiya *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010a).

Quando as plantas são substituídas por culturas de células adaptadas à salinidade é igualmente evidente o envolvimento do sistema defesa antioxidante na aquisição da tolerância ao sal. Gossett *et al.* (1994a,b) demonstraram que a tolerância observada na planta intacta está também presente nas culturas de tecido caloso correspondentes, onde a maior atividade das enzimas antioxidantes conferia-lhes a capacidade para impedir acumulação das EROs e crescer na presença de 150 mM NaCl. A resposta do tecido caloso ao stress salino foi avaliada em duas espécies *Acanthophyllum*, tendo o tecido da menos sensível ao sal (*A. glandulosum*) apresentado a maior atividade antioxidante, ficando protegido dos efeitos oxidativos, nomeadamente da peroxidação lipídica (Niknam *et al.*, 2011). Através de linhas celulares de espécies como *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum* e *Helianthus annuus* selecionadas *in vitro* para crescerem em meios salinos foi possível concluir que a tolerância ao sal a nível celular envolve também a indução do sistema antioxidante (Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999; Benavides *et al.*, 2000; Davenport *et al.*, 2003). De notar, que a aquisição de tolerância ao NaCl, ou a um agente osmótico, pode levar ao aumento de tolerância a um outro fator de stress, como foi o caso da linha celular de algodoeiro tolerante a NaCl que mostrou ser também tolerante ao herbicida paraquato, ou das células de batateira adaptadas a stress osmótico imposto por polietilenoglicol (PEG) que exibiram elevada tolerância a 200 mM de NaCl (Leone *et al.*, 1994a; Gossett *et al.*, 1996). Este fenómeno de “tolerância cruzada” parece estar associado a um aumento da atividade antioxidante que ocorreu nas células tolerantes ao sal ou ao PEG.

1.3.5. Acumulação de proteínas associadas à salinidade

A tolerância à salinidade está associada a modificações morfológicas e fisiológicas que resultam em grande parte de alterações nos padrões de expressão genética. A salinidade modifica a expressão genética, de tal modo, que alguns genes são expressos mais intensamente, enquanto que outros são menos, podendo mesmo ser reprimidos, o que se traduz no aumento dos níveis de algumas proteínas e na diminuição de outras, ou então na inibição da síntese e desaparecimento de determinadas proteínas (Parker *et al.*, 2006; Timperio *et al.*, 2008). No entanto, pode ocorrer a expressão de certos genes e ocasionar o aparecimento de novas proteínas, vulgarmente referidas por “proteínas de stress”. Estas proteínas têm merecido especial interesse por se admitir que estão diretamente envolvidas

na tolerância das plantas ao stress, pelo que se tem procurado esclarecer as funções das mesmas nas respostas de defesa e os mecanismos que regulam a sua síntese (Wahid *et al.*, 2007; Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008). Alguns autores consideram que a forma de esclarecer os mecanismos desenvolvidos pelas plantas para lidar com as condições ambientais adversas passa por identificar as proteínas que são induzidas em resposta ao stress (Parker *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2009; Zörb *et al.*, 2009). Por outro lado, é igualmente importante identificar os genes que codificam essas proteínas e que normalmente são expressos apenas na presença do fator de stress. Esta informação será extremamente útil no melhoramento genético para se conseguirem plantas melhor adaptadas ao stress, tal como Salekdeh & Komatsu (2007) exemplificaram para diferentes culturas. Apesar dos esforços, apenas algumas das proteínas associadas ao stress foram identificadas e conhecidos os processos fisiológicos em estão envolvidas. É o caso das proteínas LEA ('Late embryogenesis abundant') que, para além de serem características das sementes, acumulam-se nas plantas expostas a condições indutoras de défice hídrico como a secura, salinidade e temperaturas extremas, cuja função parece estar associada com a proteção dos componentes celulares dos efeitos nocivos da perda de água, nomeadamente evitar a formação de agregados proteicos e preservar a integridade das estruturas celulares (Goyal *et al.*, 2005). Um outro grupo de proteínas, as desidrinas surgem também associadas com a tolerância à secura e salinidade ao reduzirem o impacto negativo da desidratação e do stress oxidativo (Sun & Lin, 2010), embora Wise (2003) as tenha incluído no grande grupo das proteínas LEA. As proteínas de choque térmico (HSPs, 'Heat shock proteins') características da resposta ao calor e importantes na termotolerância como proteínas chaperonas, têm sido também detetadas em condições de secura e salinidade, à semelhança do que acontece com as LEAs, o que levou a admitir que contribuem para a homeostasia celular nessas situações (Timperio *et al.*, 2008).

A tolerância salina de certos modelos experimentais e a variação observada entre cultivares tem sido explicada com base nas alterações do padrão proteico. Por exemplo, a adaptação de uma linha celular de tabaco a elevada salinidade esteve associada ao aumento dos níveis de determinadas cadeias polipeptídicas e à síntese de novo de um polipéptido de 26 kDa, que desaparecia após o cultivo da linha celular em meio sem sal (Ericson & Alfinito, 1984; Singh *et al.*, 1985). Este polipéptido contribuía em cerca de 12% para a proteína total das células adaptadas ao NaCl e a sua síntese e acumulação coincidia com o ajustamento osmótico induzido não só pela presença do sal no meio de cultura, mas

também do PEG (Binzel *et al.*, 1985; Singh *et al.*, 1989). Esta proteína foi designada por osmotina pois parece estar envolvida na adaptação osmótica das células de *N. tabacum* e de *S. tuberosum* crescidas na presença do sal e do agente não iônico (LaRosa *et al.*, 1989; Leone *et al.*, 1994a). Trata-se de uma proteína alcalina com três isoformas conhecidas que está sobretudo localizada no vacúolo, embora se encontre também no citosol e associada às membranas plasmática e vacuolar (Singh *et al.*, 1987). Apesar de estar associada com a tolerância à salinidade, permanece ainda por esclarecer a função biológica da osmotina, já que apresenta elevada homologia com a taumatina e com outras proteínas envolvidas nas reações de defesa contra os agentes patogénicos, sendo também acumulada em resposta à infeção por estes agentes. O facto de mostrar uma atividade antimicrobiana levou a que fosse considerada uma proteína PR (Afroz *et al.*, 2011). Este aspeto sugere que há uma semelhança nos mecanismos utilizados pelas plantas para lidar com as várias situações de stress (Timperio *et al.*, 2008). Provavelmente, os sinais que regulam a expressão dos genes envolvidos nas respostas de defesa aos vários stresses são comuns. Referiu-se já que as EROs atuam como moléculas sinalizadoras que modulam diferentes processos de defesa na planta, tendo sido sugerido que as células vegetais pressentem as EROs por via de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox que, por sua vez, ativam a expressão das HSPs e de outras proteínas que têm um papel ativo de defesa, como é o caso das enzimas antioxidantes (Mittler *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2008). Também é conhecido que a expressão de diversos genes é regulada pelo aumento dos níveis endógenos de ABA, como acontece com o gene da osmotina e com alguns genes *rab* ('*responsive to ABA*') que são induzidos em resposta ao stress osmótico (Skriver & Mundy, 1990). É geralmente aceite que o ABA fomenta a tolerância ao stress pois, se por um lado, é evidente a sua acumulação nas células e tecidos vegetais na sequência do tratamento salino ou da exposição a situações de défice hídrico ou de baixa temperatura, por outro lado, a aplicação exógena de ABA acelera e aumenta a resistência de linhas celulares e de plantas a esses fatores de stress (Chandler & Robertson, 1994; Leone *et al.*, 1994a; Pruvot *et al.*, 1996). Esta aplicação resulta no aumento da expressão de genes como *MnSod*, *CAT1* e *GRI* e no aumento da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, APX e GR) (Zhu & Scandalios, 1994; Bueno *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2010). Do mesmo modo, a aplicação externa da fitohormona aumenta a síntese da proteína CDSP 34 ('*Chloroplastic drought-induced stress protein*'), mas não da CDSP 32, que apesar de ambas se acumularem nas plantas de batateira sujeitas à secura e a stress salino, pressupõe que um

outro sinal estará envolvido na indução da síntese da proteína de 32 kDa (Pruvot *et al.*, 1996). Independentemente das vias de sinalização envolvidas na regulação da síntese das CDSPs, estas proteínas são abundantes nos cloroplastos das plantas expostas ao sal, pelo que foi proposto que a CDSP 32 acumulada no estroma participa na osmoregulação do organelo, enquanto que a CDSP 34 localizada nos tilacóides parece proteger a integridade destas estruturas e do aparelho fotossintético dos efeitos do stress oxidativo (Eymery & Rey, 1999; Broin *et al.*, 2000).

Contudo, convém ressaltar que nem todas as proteínas sintetizadas em resposta ao stress participam em processos fisiológicos conhecidos, ou estão relacionadas com a defesa das plantas e envolvidas na recuperação da homeostasia celular perante as limitações ambientais. Para Singh *et al.* (1985) a maioria dessas proteínas aparece como uma resposta imediata da célula ao ambiente alterado, ou em consequência de danos celulares, e apenas algumas estão envolvidas na adaptação das plantas ao “novo ambiente”. Quando se estuda o efeito de fatores de stress no comportamento da planta, um aspeto a considerar é que algumas das alterações observadas no padrão de expressão de proteínas podem dever-se a lesões celulares. Por exemplo, situações de “choque”, caracterizadas pela exposição abrupta da planta ou linha celular a um fator de stress de elevada intensidade, podem conduzir a danos irreversíveis nos componentes celulares a nível das membranas e da conformação funcional das proteínas, ao passo que a exposição gradual ao fator em causa possibilita que as plantas ativem uma série de reações de defesa que as protegem e permitem que retomem o seu desenvolvimento num ambiente desfavorável (Leone *et al.*, 1994b; Srivastava *et al.*, 2004; Zörb *et al.*, 2009). Assim, para conhecer os mecanismos celulares utilizados por um organismo para fazer face às perturbações no seu ambiente, é importante distinguir os polipéptidos cuja síntese está associada com a capacidade das plantas para lidar com o fator adverso daqueles que são produto de lesões na célula. A este propósito, Leone *et al.* (1994b) compararam o padrão de expressão proteica das células de batateira gradualmente adaptadas à presença do PEG com o padrão das células não adaptadas sujeitas a choque osmótico e verificaram que a síntese proteica não foi inibida nas células adaptadas, bem pelo contrário, a síntese de um conjunto vasto de proteínas aumentou, em contraste com o padrão das células sujeitas ao tratamento de choque em que a síntese proteica foi fortemente inibida.

As plantas, mais do que os outros organismos, estão sujeitas a perturbações ambientais súbitas, pelo que dependem da plasticidade do seu proteoma para se defenderem e

adaptarem a essas alterações. O proteoma de um sistema biológico não é estático, é afetado por múltiplos fatores como o ciclo celular, o tipo de tecido analisado e o estado fisiológico em que se encontra, e pelas mudanças nas condições do meio (Jorrín-Novo *et al.*, 2009). Todos os tipos de stress afetam qualitativa e/ou quantitativamente o proteoma de um organismo, de um tecido ou de uma linha celular. Sabe-se que diferentes famílias de proteínas estão associadas com a resposta da planta ao stress, podendo ser sintetizadas de novo e/ou mais ou menos expressas na presença do fator de stress (Timperio *et al.*, 2008). Entre outras funções, essas proteínas estão envolvidas na sinalização do stress e na transdução do sinal, na regulação da transcrição e tradução, nos mecanismos de defesa, no transporte de solutos (ex. transportadores ABC), no metabolismo dos hidratos de carbono e aminoácidos, na síntese de osmólitos ou no reforço da parede celular (Rensink *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2005; Ahsan *et al.*, 2007; Bhushan *et al.*, 2007; Zhen *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008; Xiao *et al.*, 2009; Manaa *et al.*, 2011).

A eletroforese bidimensional (2-D) como técnica que permite a separação de proteínas com elevada capacidade de resolução, tem sido utilizada para analisar e comparar as alterações nos padrões de expressão proteica induzidas pelo stress salino, no sentido de se proceder à identificação das proteínas associadas à salinidade e obter pistas sobre as suas funções fisiológicas e possível envolvimento na tolerância. Aghaei *et al.* (2008) identificaram várias proteínas diferencialmente expressas pelo sal no proteoma caulinar de duas cultivares de batateira com diferente tolerância à salinidade em que se incluíam, entre outras, as proteínas de defesa (HSPs, osmotina, TSI-1 ‘Tomato Stress Induced’, calreticulina), as proteínas envolvidas na fotossíntese (RuBisCo, anidrase carbónica) e na síntese proteica (glutamina sintetase). Enquanto que a maioria das proteínas com funções na fotossíntese e síntese proteica surgiam diminuídas em ambas as cultivares, as proteínas relacionadas com a defesa surgiam aumentadas apenas na cultivar definida como tolerante, com destaque para a osmotina que era detetada somente nesta cultivar. Já se referiu que a fotossíntese é um dos processos mais afetados pela salinidade e através da 2-D foi possível demonstrar o impacto da acumulação do Na^+ nos cloroplastos de milho ao reduzir o nível de expressão de proteínas relacionadas com a maquinaria fotossintética (Zörb *et al.*, 2009). O aumento da enzima RuBisCo ativase e de ferritina foi visualizado após a separação por 2-D das proteínas de plantas de arroz expostas ao stress salino, que mostrou também que as concentrações de algumas proteínas envolvidas na resposta ao stress oxidativo (SOD e APX) e de outras reconhecidas por participarem na fotorrespiração e no metabolismo do

carbono e do azoto surgiam aumentadas (Abbasi & Komatsu, 2004; Yan *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2006). Nesta cultura, Menezes-Benavente *et al.* (2004) já havia mostrado que a salinidade induzia o aumento da expressão dos genes envolvidos no sistema de defesa antioxidante das folhas e, segundo Parker *et al.* (2006), o aumento dos níveis de ferritina durante o stress salino é favorável para reduzir a produção do radical OH^- através da reação de Fenton.

A maioria dos resultados obtidos com recurso à 2-D aponta para a regulação das enzimas do sistema antioxidante não só pela salinidade, mas também por outras situações adversas, provavelmente em resultado do stress oxidativo (Castro *et al.*, 2005; Ahsan *et al.*, 2007; Zhen *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2009). A análise funcional das proteínas diferencialmente expressas pela secura entre genótipos com diferente tolerância tem mostrado que a abundância das proteínas do sistema de defesa antioxidante é superior nas plantas mais tolerantes à falta de água (Kottapalli *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2009; Xu & Huang, 2010; Zhao *et al.*, 2011). Embora seja evidente que a concentração de algumas proteínas que intervêm na fotossíntese diminui pela exposição à secura, o decréscimo é mais acentuado entre as plantas sensíveis, o que parece indicar que a capacidade para manter a fotossíntese e o mecanismo de defesa antioxidante ativos são requisitos importantes na adaptação ao stress hídrico (Zhao *et al.*, 2011).

Um outro fator comum a várias situações adversas é a indução de proteínas das famílias das PRs, nomeadamente as proteínas pertencentes à família das PR-10 que surgem aumentadas pelo stress salino, secura, exposição a herbicidas e ao ataque de agentes patogénicos (Pnueli *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2006).

Embora o stress salino diminua a abundância de grupos de proteínas com importantes funções no metabolismo celular, é certo que outros surgem aumentados, como acontece com as proteínas envolvidas na homeostasia redox e na defesa contra o efeito osmótico do sal que, à partida, contribuem para a tolerância salina. Se os estudos bioquímicos têm proporcionado informação útil sobre os processos utilizados pelas plantas para lidarem com a salinidade, a abordagem proteómica veio realçar a complexidade da resposta ao sal ao facultar novos dados sobre os mecanismos de adaptação e de regulação da expressão genética. A identificação das proteínas envolvidas na tolerância possibilita a identificação e clonagem dos respetivos genes, abrindo perspectivas ao desenvolvimento de plantas mais resistentes à salinidade por via da engenharia genética (Xiao *et al.*, 2009).

1.4. Culturas *in vitro* como modelo para os estudos de salinidade

A importância das culturas *in vitro* foi durante muito tempo reconhecida pela sua aplicação na multiplicação de espécies de difícil propagação pelos métodos convencionais. A possibilidade da conservação de germoplasma e da produção de plantas isentas de doenças por via da cultura de meristemas aumentou o interesse pela cultura de tecidos para a seleção e propagação clonal (Brown & Thorpe, 1995). Além das aplicações práticas, a investigação em biologia vegetal também beneficiou com a utilização das técnicas de culturas *in vitro*, na medida em que estes modelos contribuíram para a aquisição de novos conhecimentos em áreas como a morfologia, fisiologia, bioquímica e genética (Fidalgo, 1995). Mas, talvez seja no campo da biotecnologia vegetal que as potencialidades da cultura de tecidos têm sido mais exploradas, onde deram um importante contributo no melhoramento de plantas ao serem usadas na hibridação somática, na indução de variação genética por mutagenese *in vitro* e seleção de mutantes, ou dando suporte à engenharia genética para a obtenção de plantas transgênicas (Brown & Thorpe, 1995; Oliveira, 2000; Hossain *et al.*, 2006; Arzani, 2008).

A variabilidade genética é a base para um programa de melhoramento e, neste sentido, as culturas de tecidos também podem ser úteis pela variação somaclonal que induzem, permitindo obter variantes que durante a regeneração apresentam características que interessam preservar tais como a resistência a fatores de stress, biótico ou abiótico, ou com características melhoradas de produção (Larkin & Scowcroft, 1981; Brown & Thorpe, 1995; Mohamed *et al.*, 2000; Jain, 2001; Arzani, 2008). Com efeito, a cultura de tecidos baseada na seleção *in vitro* é referenciada como um método alternativo viável para o desenvolvimento de plantas tolerantes ao stress. A seleção *in vitro* consiste na exposição de uma grande população de células/tecido caloso a um meio de cultura onde está presente o fator de stress e as células/tecido caloso que sobrevivem, mostrando tolerância a esse fator, são selecionadas. Em geral, dois métodos têm sido utilizados na obtenção das células tolerantes: i) a seleção gradual, em que as culturas de células são expostas a concentrações crescentes do fator de stress e ii) a seleção direta, no qual as culturas são expostas diretamente à concentração mais elevada desse fator sem qualquer tipo de aclimação, daí este procedimento ser também conhecido por “tratamento de choque”. As linhas selecionadas poderão ser posteriormente transferidas para meios de cultura adequados à regeneração de plantas por embriogênese somática ou organogênese, ou então serem usadas como modelo experimental para o estudo dos mecanismos de tolerância a nível

celular (Miki *et al.*, 2001; Sharry & Silva, 2006; Queirós *et al.*, 2007; Hossain *et al.*, 2007; Batková *et al.*, 2008; Rai *et al.*, 2011).

A seleção *in vitro* tem sido usada com sucesso para a obtenção de linhas celulares tolerantes à salinidade e à seca através da adição ao meio de cultura de NaCl e PEG ou manitol, respectivamente, havendo também referências à introdução de metais pesados com a finalidade de isolar células resistentes a estes elementos (Leone *et al.*, 1994a; Rout *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2000; Mohamed *et al.*, 2000; Samantaray *et al.*, 2001; Davenport *et al.*, 2003; Gandonou *et al.*, 2006; Rout & Sahoo, 2007). Provavelmente, o NaCl tem sido o fator de stress mais utilizado na seleção *in vitro* a crer na lista de referências apresentada por Rai *et al.* (2011), onde são referidas diversas espécies em que foram conseguidas linhas celulares capazes de crescer na presença de concentrações de NaCl que prejudicam o crescimento da planta. Em algumas situações as linhas selecionadas foram utilizadas para a regeneração *in vitro* e posteriormente encaminhadas para os programas de melhoramento (Basu *et al.*, 1997; Ochatt *et al.*, 1999; Hossain *et al.*, 2007; Hassan *et al.*, 2008), mas na maioria dos casos as linhas foram caracterizadas a nível fisiológico e bioquímico com o objetivo de contribuir para o conhecimento dos mecanismos subjacentes à tolerância à salinidade (Olmos & Hellín, 1996; Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 1999; Davenport *et al.*, 2003; Gandonou *et al.*, 2006).

Segundo alguns autores, a aplicação da biotecnologia no aumento da tolerância salina de várias plantas com interesse agrícola será bem sucedida se estiverem definidos para cada cultura os indicadores de tolerância salina aos níveis da célula e da planta intacta. Mas para tal, é importante esclarecer os mecanismos fisiológicos de tolerância à salinidade a nível celular e avaliar o impacto desses mecanismos na tolerância da planta para pôr à disposição dos melhoradores um conjunto de critérios que facilitem a seleção (Cheeseman, 1988; Munns, 1993, 2002; Shannon & Grieve; Ashraf & Harris, 2004; Mansour & Salama, 2004; Ashraf, 2009). Não tem sido fácil avaliar a tolerância salina de uma planta com base nos critérios vulgarmente utilizados (níveis de produção, taxa de crescimento, parâmetros biométricos ou outros), daí os critérios fisiológicos serem referidos como os mais objetivos para avaliar essa característica (Singh & Chatrath, 2001; Ashraf & Harris, 2004). A este propósito, e sabendo-se do envolvimento do sistema antioxidante na defesa das plantas contra o stress oxidativo induzido pela salinidade, Ashraf (2009) propôs a possibilidade das enzimas e/ou os metabolitos antioxidantes serem usados como critérios no rastreio da tolerância salina. Mas, apesar da maioria dos estudos relacionarem a tolerância ao sal com

a atividade antioxidante, existe uma variação notória entre espécies, e mesmo entre cultivares, pelo que não é possível validar este critério para todas as espécies (Ashraf & Harris, 2004).

Os mecanismos utilizados pelas plantas para alcançarem a tolerância salina são complexos, além de variarem com as espécies, são condicionados pela fase de desenvolvimento em que a planta se encontra, pela estrutura e funções dos órgãos que influenciam o comportamento da planta em ambientes salinos (Qureshi *et al.*, 2007). Nesta perspectiva, as culturas de células em suspensão ou de tecido caloso crescidas em meios salinos constituem uma alternativa atrativa ao uso da planta intacta para estudar os mecanismos celulares de tolerância à salinidade, dado representarem um sistema experimental homogêneo, em que as variáveis do meio são facilmente controladas, que evita a complexidade fisiológica e estrutural da planta intacta e a interferência de fatores ligados ao desenvolvimento da planta (Leone *et al.*, 1994b; Lutts *et al.*, 2004).

Oportunamente foram descritas as diferentes estratégias que as plantas utilizam para lidar com a salinidade; se umas dependem de estruturas morfológicas ou da organização e especialização de células e de tecidos que existem na planta intacta, outras envolvem processos inerentes à própria célula. Apesar das culturas *in vitro* poderem constituir um modelo simplificado dos fenômenos fisiológicos que estão envolvidos na resposta das plantas à salinidade, elas permitem analisar a nível celular e molecular alguns desses fenômenos, que não seriam devidamente esclarecidos nos estudos em plantas (Ben-Hayyim *et al.*, 1987; Leone *et al.*, 1994b; Lutts *et al.*, 2004). De notar, que muitas das características relacionadas com a tolerância das plantas ao sal refletem-se a nível celular (Cheeseman, 1988; Hasegawa *et al.*, 2000; Mansour & Salama, 2004); a compartimentação vacuolar do Na⁺ e Cl⁻, o ajustamento osmótico e a indução do sistema de defesa antioxidante são alguns dos processos celulares já comentados que são utilizados pelas glicófitas e halófitas na adaptação a ambientes salinos (Munns & Tester, 2008). Além de que algumas das respostas observadas nas culturas de células em condições salinas são comuns às detetadas nas plantas nas mesmas condições (Ben-Hayyim *et al.*, 1987; Binzel *et al.*, 1987, 1988; Olmos & Hellín, 1996; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Vera-Estrella *et al.*, 1999; Davenport *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2004; Lutts *et al.*, 2004; Anil *et al.*, 2007; Batková *et al.*, 2008). De tal modo, as plantas têm sido substituídas pelas culturas *in vitro* nos estudos de salinidade, em particular de tolerância salina, embora essa substituição implique uma correlação positiva entre os graus de tolerância das plantas e das culturas. Esta

correlação verifica-se em algumas espécies (Gossett *et al.*, 1994b; Lutts *et al.*, 1996c, 2004; Rus *et al.*, 1999; Vera-Estrella *et al.*, 1999), enquanto noutras as células em cultura tendem a apresentar maior tolerância salina do que as plantas intactas, havendo situações em que a tolerância é menor (Smith & McComb, 1981; Naik & Widholm, 1993; Perez-Alfocea *et al.*, 1994; Hawkins & Lips, 1997; Bajji *et al.*, 1998; Santos & Caldeira, 1999). Nos casos em que não existe paralelismo na tolerância salina entre os dois níveis de organização é provável que a resistência ao sal da espécie em causa dependa da organização anatómica e fisiológica que existe na planta intacta, daí as células em cultura não se mostrarem tolerantes, conforme parece suceder nas halófitas; em contraste, nas glicófitas verifica-se um elevado grau de correlação entre a resposta das plantas à salinidade e a das culturas *in vitro*, o que pressupõe que a tolerância nestas plantas é determinada por mecanismos que operam a nível celular (Smith & McComb, 1981; Naik & Widholm, 1993; Bajji *et al.*, 1998; Mansour & Salama, 2004). Mesmo assim é importante comparar o comportamento das culturas *in vitro* com o das plantas expostas à salinidade antes das primeiras serem usadas como modelo experimental para estabelecer o grau de tolerância da planta, pois há que atender que as células em cultura crescem num ambiente hormonal, osmótico e nutricional diferente do das células na planta intacta, que poderá ter consequências a nível da regulação da expressão genética (Dracup, 1991; Perez-Alfocea *et al.*, 1994; Rus *et al.*, 1999).

Embora se reconheça que as culturas *in vitro* não simulam com precisão as condições fisiológicas da planta, elas constituem um sistema experimental útil que já proporcionou uma série de conhecimentos sobre vários processos fisiológicos e bioquímicos das plantas, entre os quais, a tolerância salina. Apesar de alguma controvérsia em torno do seu uso como modelo biológico no estudo da tolerância salina, há quem considere o melhor sistema para distinguir os processos que operam a nível da célula daqueles que são específicos dos tecidos/órgãos e que dependem da integridade funcional da planta, com a vantagem adicional das culturas possibilitarem a obtenção de novos genótipos tolerantes (Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Bajji *et al.*, 1998; Lutts *et al.*, 2004; Rai *et al.*, 2011).

1.5. Abordagens para aumentar a tolerância à salinidade

A situação atual da salinidade em muitas regiões áridas e semi-áridas do globo terrestre e que se prevê que venha a agravar nas próximas décadas levou a que vários autores

sugerissem que a forma de minimizar o problema baseia-se no aumento da tolerância das plantas, de modo a que estas possam ser cultivadas em áreas já afetadas pela acumulação de sais. A recuperação dessas áreas por via da drenagem interna e pela adoção de práticas culturais adequadas nem sempre é viável pelos elevados custos envolvidos, além de requerer a aplicação de quantidades adicionais de água que nem sempre existe disponível. Portanto, a alternativa economicamente mais viável passa pela opção por culturas e/ou cultivares que possam produzir satisfatoriamente sob condições de salinidade o que, por um lado, evita o abandono das terras salinizadas e, por outro, assegura a produção de alimentos para fazer face às necessidades atuais da população mundial que se prevê que continue a aumentar nos próximos tempos (Chen *et al.*, 2005; Yamaguchi & Blumwald, 2005; Barrett-Lennard & Setter, 2010). O objetivo de se conseguirem culturas tolerantes à salinidade já é antigo. De acordo com Epstein *et al.* (1980), já em 1941 se considerava a possibilidade de se selecionarem plantas capazes de crescerem em condições salinas e, posteriormente, Jacobsen & Adams (1958) justificavam essa necessidade. Mas, foi nos últimos 30 anos que o conceito de adaptação das plantas a meios salinos passou a fazer mais sentido, quando houve a percepção que a tolerância salina tem uma base genética evidenciada pela existência das halófitas e das diferenças de tolerância entre génotipos de uma mesma espécie glicofítica, a par de uma certa pressão gerada no sentido de se desenvolverem plantas mais tolerantes em face da progressiva diminuição da área de cultivo e da menor abundância de água potável (Wang *et al.*, 2003).

O melhoramento pelos métodos tradicionais tem tido pouco sucesso na introdução de novas cultivares tolerantes, em parte devido às dificuldades na avaliação da tolerância salina nos ensaios de campo onde nem todos os fatores do meio são devidamente controlados, acabando por interferir na resposta das plantas à salinidade, e onde parece haver uma falta de consenso sobre os critérios a usar no processo de seleção (Richards, 1996; Arzani, 2008; Cuin *et al.*, 2010). Adicionalmente, a variação na sensibilidade ao sal com o estado ontogénico da planta também não facilita o processo de seleção dos génotipos tolerantes ao sal (Shannon & Grieve, 1999). Além de que a tolerância ao stress salino é uma característica multigénica, pelo que as técnicas tradicionais de melhoramento assentes em cruzamentos inter e intraespecíficos nem sempre são viáveis na obtenção de híbridos resistentes ao sal, apesar da utilização de marcadores moleculares de DNA terem facilitado a seleção (Cuartero *et al.*, 2006).

Uma alternativa tem sido o desenvolvimento de novos genótipos tolerantes com o auxílio das técnicas de engenharia genética. Com este propósito, vários autores consideram que numa primeira abordagem é essencial caracterizar os processos celulares determinantes da tolerância salina, de modo a se identificarem os genes envolvidos nesses processos e para tal, as halófitas e glicófitas mais tolerantes são referidas como as plantas modelo apropriadas para esse fim (Bohnert & Jensen, 1996; Flowers *et al.*, 1997; Borsani *et al.*, 2003; Cuartero *et al.*, 2006; Barrett-Lennard & Setter, 2010). De momento, são várias as referências na literatura alegando a obtenção de plantas com maior tolerância ao sal por via da manipulação dos genes envolvidos na síntese de osmólitos, na proteção da integridade celular e na defesa contra o stress oxidativo, ou na regulação da homeostasia iônica (Borsani *et al.*, 2003; Apse & Blumwald, 2002; Wang *et al.*, 2003; Yamaguchi & Blumwald, 2005). Apesar dos resultados encorajadores, o comportamento dessas plantas ainda não foi avaliado no campo, ou quando foi, os parâmetros analisados não eram os mesmos entre os estudos realizados, encontrando-se as plantas em diferentes fases de desenvolvimento, pelo que tem sido difícil avaliar o grau de tolerância conferido pela expressão dos diferentes genes (Arzani, 2008). Para Flowers (2004) é importante explorar outras vias alternativas à engenharia genética, uma vez que a tolerância salina resulta da combinação de mecanismos que operam nos diferentes níveis de organização da planta que são, por sua vez, controlados por um número variável de genes, o que significa que ainda há um longo caminho a percorrer até se conseguir transformar geneticamente as plantas sensíveis em tolerantes. Entretanto, há que considerar as potencialidades das culturas de tecidos para a obtenção de novos genótipos tolerantes. Referiu-se atrás que as células em cultura podem adaptar-se a elevados níveis de salinidade e num reduzido espaço e intervalo de tempo é possível selecionar um grupo de células que resiste à presença do sal, com a vantagem adicional de se poder regenerar um largo número de plantas a partir dessas células. A aplicação desta metodologia em alternativa às técnicas convencionais baseia-se na ocorrência de variações genéticas entre as células/tecidos em cultura e as plantas regeneradas, que podem suceder com maior frequência se as culturas estiverem expostas a fatores adversos. A variação somaclonal é assim aproveitada para a seleção *in vitro* de linhas variantes e no caso da característica em estudo se manter estável quer ao nível das células/tecido caloso, quer ao nível das plantas regeneradas e da descendência será muito útil nos programas de melhoramento (Tal, 1994; Kaeppeler *et al.*, 2000; Jain, 2001; Li *et al.*, 2007; Arzani, 2008; Rai *et al.*, 2011).

Desde a primeira referência em *N. tabacum*, muitas tentativas têm sido feitas para regenerar plantas tolerantes ao sal a partir de culturas de células em suspensão ou de tecido caloso selecionadas pela sua capacidade para crescerem em meios contendo concentrações relativamente elevadas de NaCl (Nabors *et al.*, 1980; Miki *et al.*, 2001; Sharry & Silva, 2006; Rai *et al.*, 2011). No entanto, são ainda poucos os variantes somaclonais obtidos através da seleção *in vitro* que reúnem características para serem integrados nos programas de melhoramento (Tal, 1994; Winicov, 1991, 1996; Ochatt *et al.*, 1999; Shankhdhar *et al.*, 2000; Hossain *et al.*, 2007). Em certos casos tem-se verificado a perda da capacidade de regeneração durante a seleção, pois parece que o elevado potencial osmótico dos meios salinos prejudica a atividade metabólica conducente à organogénese (Vijayan *et al.*, 2003; Sharry & Silva, 2006). Noutras situações, as plantas não mantêm o mesmo grau de tolerância ao sal que as culturas que lhes deram origem, o que pode estar em parte associado com a ocorrência do fenómeno de adaptação epigenética. Acontece que as células em cultura sujeitas a stress salino podem mostrar-se tolerantes devido a alterações epigenéticas transmitidas apenas por divisões mitóticas, e sendo estas alterações bastante frequentes nas culturas *in vitro* dificultam a seleção das células mutantes caracterizadas pela estabilidade da tolerância salina transmitida através da meiose e que, à partida, se mantém após a regeneração das plantas (Tal, 1994). O problema da adaptação epigenética pode ser minimizado evitando a exposição gradual das células ao NaCl durante o processo de obtenção das linhas, pois quando assim acontece as células não tolerantes podem ficar sujeitas a fenómenos de metilação do DNA que ocasionam as modificações epigenéticas, enquanto que a opção pela seleção direta tende a reduzir a proliferação de células epigeneticamente adaptadas (Tal, 1994; Guo *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010). Sobre este aspeto, o recurso aos marcadores moleculares como os RAPDs poderá ser vantajoso para identificar a base genética ou epigenética da tolerância salina das linhas celulares selecionadas (Ochatt *et al.*, 1999).

1.5.1. Tecnologia dos marcadores RAPD

Entre os métodos possíveis de serem usados para a deteção de alterações genéticas induzidas pela cultura de tecidos (AFLP², RFLP³, DAF⁴, SSR⁵), o método dos

²AFLP – ‘Amplified Fragment Length Polymorphism’

³RFLP – ‘Restriction Fragment Length Polymorphism’

⁴DAF – ‘DNA amplification fingerprinting’

⁵SSR – ‘Simple sequence repeats’

polimorfismos amplificados ao acaso (RAPD⁶) tem sido um dos mais utilizados, nomeadamente para avaliar a estabilidade genética de plantas micropropagadas e para identificar variantes somaclonais (Ochatt *et al.*, 1999; Jain, 2001; Soneji *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2004; Chakrabarti *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Venkatachalam *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010). Além de ser o método de deteção de polimorfismos no DNA mais utilizado para discriminar híbridos diversos e caracterizar cultivares, sendo também usado na análise da diversidade genética e no estabelecimento de relações filogenéticas entre grupos taxonómicos (Singh *et al.*, 2006; Dikshit *et al.*, 2007; Agarwal *et al.*, 2008; Chakrabarty & Datta, 2010; Moon *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2011).

O método RAPD centra-se na pesquisa de marcadores moleculares baseados na molécula de DNA como fonte de informação de polimorfismos, recorrendo à reação de amplificação do DNA conhecida por PCR ('Polymerase Chain Reaction') e ao uso de pequenas sequências arbitrárias de nucleotídeos ('primers') capazes de se ligarem a cada uma das cadeias de DNA genómico (Tingey & del Tufo, 1993). Pelo facto desta técnica não exigir o conhecimento prévio da sequência de DNA genómico e envolver pequenas quantidades da molécula poderá justificar o seu interesse para a deteção de diferenças genéticas entre indivíduos em diversos estudos. Além disso, é uma técnica relativamente rápida, eficiente e simples de executar, e menos dispendiosa quando comparada com outras (Williams *et al.*, 1990; Devos & Gale, 1992; Agarwal *et al.*, 2008). Provavelmente, estas razões fizeram com que a metodologia RAPD fosse aplicada na construção de mapas genéticos de espécies como *Prunus persica*, *Corylus avellana* e de *Eucalyptus* (Chaparro *et al.*, 1994; Grattapaglia & Sederoff, 1994; Mehlenbacher *et al.*, 2006), e alargada à identificação de marcadores moleculares associados à resistência a doenças e à tolerância à salinidade em várias espécies vegetais (Martin *et al.*, 1991; Paran & Michelmore, 1993; Nguyen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008). Inclusivamente, o método já foi utilizado para detetar alterações genéticas induzidas pela exposição de plantas a solos contaminados por cádmio (Liu *et al.*, 2005, 2009). A possibilidade de se obter padrões de marcadores RAPD, por vezes designados por 'fingerprinting' ou impressão digital do DNA, específicos para cada planta e que não são influenciados pela fase de desenvolvimento ou pelas condições ambientais faz com que a tecnologia dos marcadores RAPD seja útil na identificação e certificação de cultivares (Agarwal *et al.*, 2008). Por exemplo, Moon *et al.* (2010) recorreram à análise RAPD para identificar e discriminar espécies com interesse medicinal

⁶RAPD – 'Random Amplified Polymorphic DNA'

que são frequentemente confundidas com a mesma designação devido às semelhanças morfológicas entre elas. Num outro estudo, a mesma análise serviu para discriminar novas cultivares de roseira obtidas por mutagenese *in vitro* relativamente ao material que lhes deu origem (Chakrabarty & Datta, 2010).

As alterações genéticas e epigenéticas que são frequentes nas culturas de tecidos, e que podem ter repercussões no fenótipo das plantas regeneradas o que, pode ser vantajoso para o melhoramento, mas um inconveniente para a propagação clonal, podem ser analisadas através da tecnologia RAPD (Larkin & Scowcroft, 1981; Kaepler *et al.*, 2000; Jain, 2001; Li *et al.*, 2007). Alguns laboratórios optaram por esta técnica para verificar a fidelidade genética de várias plantas propagadas *in vitro* com o objetivo de validarem os protocolos de micropropagação desenvolvidos para essas plantas (Martins *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Venkatachalam *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010). Apesar de não estarem ainda definidas as causas da variação somaclonal, embora se admita que seja resultado de mutações pontuais, alterações no número de cromossomas, rearranjos cromossómicos, amplificação ou metilação do DNA, entre outras, sabe-se que as culturas de tecidos são particularmente propensas ao fenómeno (Jain, 2001). Segundo Jain (2001), o sistema *in vitro* funciona como um agente mutagénico, uma vez que os tecidos são sujeitos a condições muito adversas, desde o isolamento dos explantes, passando pelo processo de desdiferenciação e diferenciação celular que pode culminar com a regeneração, que impõe que as células se reorganizem de uma forma diferente das condições naturais, o que posteriormente poderá traduzir-se em alterações a vários níveis, quer nas células, quer nas plantas regeneradas (Kaepler *et al.*, 2000). Adicionalmente, há ainda os fatores inerentes ao próprio processo *in vitro* que parecem favorecer a ocorrência da variação somaclonal, como é o caso do tempo de cultura e a opção pela auxina 2,4-D em detrimento de outras, embora o tipo de planta possa também influenciar a frequência do fenómeno (Bordallo *et al.*, 2004). Por exemplo, são frequentes as referências à ocorrência de variação somaclonal em solanáceas, destacando-se a batateira que parece ser muito propensa ao aparecimento de variações somaclonais (Fidalgo, 1995; Jain, 2001). Este facto poderá ter levado alguns autores a usarem os marcadores RAPD para a deteção de polimorfismos em batateiras regeneradas a partir de culturas de anteras ou em culturas de tecido caloso com vista à produção de sementes sintéticas, ou para analisar a estabilidade genética de diferentes cultivares mantidas em estufa e em condições *in vitro* (Veilleux *et al.*, 1995; Bordallo *et al.*, 2004; Chakrabarti *et al.*, 2006).

1.5.2. A batateira e a tolerância à salinidade

A batateira (*Solanum tuberosum* L.) é uma das cerca de mil espécies do género *Solanum*, que se destaca das restantes pelo elevado valor alimentar do tubérculo que produz e que a torna numa das principais culturas mundiais, a quinta mais produzida depois da cana-do-açúcar, milho, trigo e arroz. As plantas cultivadas de *Solanum tuberosum* L. pertencem à subespécie *tuberosum*, que se acredita que descende da subespécie *andigena* originária dos Andes que, após introduzida na Europa, ter-se-à adaptado às temperaturas e fotoperíodo deste continente (Rios *et al.*, 2007). O tubérculo é um alimento muito rico em amido, que contém proteínas de elevada qualidade nutricional, com um padrão de aminoácidos bem adequado às necessidades humanas, e quantidades substanciais de vitaminas, nomeadamente de vitamina C e de algumas vitaminas do grupo B, e dos minerais fósforo, magnésio e potássio (Fidalgo, 1995). A batata recém-colhida contém cerca de 80% de água, e os restantes 20% de matéria seca são constituídos por uma quantidade de amido variável entre os 60 e 80%. O teor de proteína em termos de peso seco é idêntico ao dos cereais e o mais alto em comparação com outras culturas tuberosas, o que poderá justificar que seja a cultura não cerealífera mais importante na alimentação humana. Além de que é um alimento muito versátil, que pode ser preparado e servido numa variedade de maneiras, o que faz com que a batata seja muito popular em todo o mundo (Horton & Anderson, 1992; Fernie & Willmitzer, 2001).

De facto, a batateira é cultivada e consumida em muitos países distribuídos pelos cinco continentes, ocupando uma área total que excedeu os 18 milhões de hectares em 2010, e que correspondeu a uma produção global próxima de 324 milhões de toneladas, de acordo com os dados estatísticos da FAO. Mas é um setor que tem vindo a passar por algumas mudanças curiosas; se até ao início da década de 90 a maioria da produção e do consumo concentrava-se nos países da Europa e América do Norte, desde então, tem-se assistido na Europa a um decréscimo progressivo da produção de batata, a par de um aumento significativo em países da Ásia, África e América Latina, onde a produção aumentou das cerca de 30 milhões de toneladas em 1960 para mais de 190 milhões em 2010. Dados da FAO mostram que em 2005, pela primeira vez, a produção de batata dos países em desenvolvimento superou a dos países ditos desenvolvidos, tendo a China e a Índia mais impulsionado esse crescimento. De tal modo que hoje, a Ásia e a Europa são as principais regiões produtoras de batata do mundo, tendo em 2007 contribuído em mais de 80% para a produção mundial, apesar de ser nos países da América do Norte que se registam as

maiores produtividades (FAO, 2008). Em termos de consumo verifica-se a mesma tendência, um aumento do consumo por parte dos países em desenvolvimento, nomeadamente entre a população asiática que consome quase metade da oferta mundial de batata, mas a elevada taxa populacional nessa região faz com que seja ainda na Europa que se registam os maiores valores de consumo *per capita* (96 kg/pessoa/ano) onde a batata processada tem vindo cada vez mais a ser consumida. Apesar da área ocupada com a cultura ter vindo a decair neste continente, a Europa foi líder mundial na produção de batata durante o século XX, e mantém grandes países produtores como os países da antiga União Soviética e os da União Europeia (UE) como a Polónia, Alemanha, Holanda, França e Reino Unido (FAO, 2008).

Em Portugal, a batata é um produto tradicionalmente consumido pelos portugueses, em certas regiões do País constitui a base da dieta alimentar, o que lhe confere uma grande importância social e económica. Segundo os dados da balança alimentar, Portugal surge entre os países da UE que mais batata consome, embora o consumo nacional tem vindo a diminuir ao longo dos anos. À semelhança de outros países da UE, a área cultivada tem decrescido, tendo-se registado um decréscimo de 65,8% no período 1980-2007, para se fixar num valor próximo dos 26 mil hectares em 2010 (INE, 2010). Paralelamente, a produção nacional de batata também diminuiu durante esse período (63,6%), registando-se valores de produção da ordem das 384 034 toneladas em 2010 (INE, 2010).

Durante muito tempo, a batateira foi considerada uma cultura moderadamente sensível ao excesso de sal (Maas & Hoffman, 1977), embora mais recentemente tenha sido classificada como tendo tolerância moderada à salinidade (Katerji *et al.*, 2000). À semelhança de outras glicófitas, o crescimento da maioria das cultivares de batata é negativamente afetado pela salinidade, bem como a produção de tubérculos (Levy, 1992; Levy *et al.*, 1988, 1993; Heuer & Nadler, 1995; Elkhatib *et al.*, 2004; Fidalgo *et al.*, 2004). No entanto, num estudo anterior foi observado que níveis moderados de NaCl reduzem a produção de tubérculos com calibres não comercializáveis e aumentam o teor de matéria seca nestes órgãos (Nadler & Heuer, 1995). Sendo a fotossíntese um dos principais processos afetados pela salinidade, o conteúdo de clorofilas e a condutância estomática surgem diminuídos nas plantas de batateira expostas ao sal, juntamente com o teor de proteínas, apesar dos níveis proteicos aumentarem nas raízes (Heuer & Nadler, 1998; Fidalgo *et al.*, 2004; Teixeira & Pereira, 2007). A maior sensibilidade da batateira à salinidade durante a fase de abrolhamento dos tubérculos leva a que o abrolhamento e a

emergência das plantas sejam prejudicados pelo excesso de sal (Shannon & Grieve, 1999), embora Levy (1992) considere que a tuberização é uma fase particularmente suscetível à salinidade, o que faz com que a produção seja reduzida.

É provável que as diferentes considerações acerca da tolerância salina da batateira resultem de diferenças entre as cultivares testadas, dada a tendência para as temporãs serem menos suscetíveis à salinidade do que as cultivares tardias, ou do tipo de ensaios realizados, pois na maioria dos estudos a tolerância salina foi avaliada em ensaios de campo e localizados em regiões áridas (Levy, 1992; Levy *et al.*, 1988, 1993; Heuer & Nadler 1995, 1998; Elkhatib *et al.*, 2004). É sabido que os fatores mais limitantes para a batateira são o calor e a falta de água e de cálcio, e caso estes não sejam devidamente controlados nos ensaios de tolerância certamente irão influenciar a resposta da planta ao sal (Shannon & Grieve, 1999). Backhausen *et al.* (2005) verificaram que as plantas da cv. Désirée resistiram ao tratamento prolongado com 300 mM de NaCl quando mantidas sob elevada humidade relativa, enquanto que as plantas sujeitas a baixa humidade atmosférica acabaram por ser danificadas de um modo irreversível pela salinidade. Nesta perspetiva, a utilização das culturas de tecidos de batateira como modelo experimental para os estudos de salinidade e, em particular, de tolerância salina poderá ser uma alternativa vantajosa aos ensaios de campo que, além de não assegurarem um ambiente controlado, envolvem elevados custos de manutenção (Naik & Widholm, 1993; Martinez *et al.*, 1996; Hawkins & Lips, 1997; Zhang & Donnelly, 1997; Rahman *et al.*, 2008).

As potencialidades das culturas de tecidos para induzir variação somaclonal podem ser aproveitadas para melhorar os genótipos de batateira existentes, já que são frequentes as alterações fenotípicas nas plantas regeneradas a partir de diversos tipos de culturas (Espinoza *et al.* 1986; Rietveld *et al.*, 1991; Fidalgo, 1995). Assim, há toda a vantagem em recorrer às culturas de tecidos de batateira para a obtenção de plantas mais resistentes ao stress salino por via da seleção *in vitro* de linhas tolerantes ao sal. Já em 1987, vários autores referiam a possibilidade das culturas de tecidos serem usadas no melhoramento da batateira, não só da tolerância salina, mas também de outras características, uma vez que as técnicas tradicionais têm-se revelado lentas e imprevisíveis na obtenção de novos genótipos (Bajaj, 1987; Rietveld *et al.*, 1987). Opinião partilhada por Mullins *et al.* (2006) que, tendo em conta que são necessários pelo menos quinze anos para se desenvolver uma nova cultivar de batata através das técnicas de melhoramento tradicionais, defenderam a importância da biotecnologia para se modificarem certos aspetos funcionais da cultura e

para se criarem novas oportunidades para a utilização da batata para outros fins que não alimentares.

A tecnologia *in vitro* sempre foi usada com sucesso em estudos relacionados com a batateira, sendo a primeira planta com interesse económico em que a biotecnologia foi aplicada com êxito (Espinoza *et al.*, 1986; Bajaj, 1987). Uma das aplicações mais difundidas terá sido a produção de microtubérculos em alternativa às plantas micropropagadas por estacas caulinares, apesar destas serem ainda bastante procuradas para se obterem tubérculos isentos de agentes patogénicos (FAO, 2008). As culturas de tecidos com o auxílio das técnicas de biologia molecular trouxeram também novos conhecimentos sobre o modo como a cultura interage com determinadas pragas e doenças e lida com os diferentes fatores de stress abiótico. Esses conhecimentos juntamente com a possibilidade de transformar geneticamente a batateira permitiram já produzir plantas com maior resistência a agentes patogénicos e a determinadas pragas, e espera-se que no futuro outras características venham a ser melhoradas, particularmente os aspetos qualitativos do tubérculo, uma vez conhecido o genoma da planta (Mullins *et al.*, 2006).

1.6. Objetivos

O reconhecimento da salinidade como um dos fatores que mais afeta a produtividade das culturas, e que se prevê que venha agravar-se nos próximos tempos em consequência da necessidade de se aumentar a produção de alimentos com base numa agricultura menos competitiva pelo uso da água, tem fomentado o estudo dos mecanismos de tolerância à salinidade, sobretudo aqueles que atuam a nível celular. O conhecimento dos mecanismos que conferem às plantas a capacidade para crescerem em meios salinos é fundamental para se desenvolver plantas com maior tolerância, na expectativa de se reaproveitar solos e águas salinas. A possibilidade das culturas *in vitro* serem usadas como sistema experimental para estudar os mecanismos celulares de tolerância à salinidade através da seleção de linhas celulares adaptadas a NaCl, levou-nos a desenvolver uma linha de tecido caloso de batateira capaz de crescer na presença de 150 mM NaCl. Sendo a batateira uma cultura de elevado interesse económico, moderadamente tolerante à salinidade, para a qual é escassa a informação acerca do comportamento de linhas tolerantes selecionadas *in vitro*, considerou-se que o estudo a nível bioquímico, proteómico e ultraestrutural na linha de tecido caloso adaptada a 150 mM NaCl seria de grande interesse, pois irá contribuir para o

conhecimento dos mecanismos envolvidos na tolerância à salinidade neste modelo biológico.

A noção de que a salinidade interfere com o desenvolvimento das plantas através dos efeitos osmótico e toxicidade iônica, que estão associados ao aumento da formação de EROs, levou numa primeira fase, a analisar-se o conteúdo hídrico e dos iões sódio, cloro, potássio e cálcio no tecido caloso adaptado a NaCl, e o grau de stress oxidativo através da determinação da peroxidação lipídica. Dada a importância do sistema de defesa antioxidante no controlo dos níveis de EROs e, conseqüentemente, na tolerância a situações adversas como a salinidade, fez-se um estudo detalhado dos mecanismos enzimático e não-enzimático. As abordagens efetuadas incluíram a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes – SOD, CAT, APX, GR e DHAR, quer por espectrofotometria, quer em gel nativo, e a quantificação dos níveis de compostos orgânicos com ação antioxidante – ascorbato, glutathiona, α -tocoferol e prolina. Neste estudo, o comportamento do tecido caloso adaptado a NaCl foi ainda comparado com o do tecido não adaptado (controlo) exposto a um tratamento de choque com 150 mM de NaCl, e com a situação em que o tecido adaptado foi transferido do meio salino para outro desprovido de sal, com o objetivo de esclarecer a importância de cada um dos componentes do sistema antioxidante na tolerância à salinidade e na resposta do tecido caloso de batateira perante uma situação de stress salino intenso.

Para melhor compreender algumas das respostas do tecido caloso crescido na presença de NaCl foi realizado um estudo ultraestrutural. A possibilidade de ocorrerem alterações ultraestruturais provocadas pela salinidade que possam estar associadas com a adaptação do tecido a esta situação adversa aumenta o interesse por este estudo.

Sendo a compartimentação vacuolar do Na^+ descrita como um mecanismo essencial na tolerância das plantas a ambientes salinos, foi objetivo deste trabalho analisar a atividade das bombas de prótons V-H^+ -ATPase e V-H^+ -PPase, bem como o envolvimento de um sistema de transporte do tipo antiporte Na^+/H^+ na membrana vacuolar do tecido caloso de batateira, tendo-se para o efeito usado vesículas de tonoplasto isoladas das linhas controlo e adaptada ao sal.

Tendo em conta as potencialidades da análise proteómica para avaliar as diferenças no nível de expressão de proteínas, recorreu-se à eletroforese bidimensional para se comparar os perfis proteicos da linha adaptada ao sal com os da linha controlo, na expectativa de se

identificarem algumas proteínas que possam estar de certo modo envolvidas no processo de adaptação do tecido caloso de batateira à salinidade.

O facto do tecido caloso mantido na presença de NaCl estar particularmente propenso à ocorrência de polimorfismos na molécula de DNA, entendeu-se ser relevante a análise RAPD para detetar possíveis variações genotípicas. Considera-se que esta informação será útil para se tentar posteriormente a regeneração de plantas.

2. Material e Métodos

2. Material e Métodos

2.1. Cultura de tecido caloso e condições de crescimento

2.1.1. Seleção e manutenção de linha celular adaptada a 150 mM NaCl

Linhas celulares de *S. tuberosum* tolerantes a concentrações crescentes de NaCl foram obtidas a partir de tecido caloso cultivado em meio nutritivo sem sal, tendo-se recorrido a dois métodos de seleção, a seleção directa e a gradual, para a obtenção dessas linhas (Queirós, 2001; Queirós *et al.*, 2007). A linha crescida na presença de 150 mM NaCl foi selecionada como sistema modelo para os estudos descritos nesta tese, por se tratar daquela que, estando exposta a um elevado nível de salinidade, manteve uma proliferação celular e crescimento regulares ao longo do tempo. No entanto, no início do presente trabalho procedeu-se à obtenção de novo do material biológico, de modo, a reduzir-se a possibilidade de ocorrência de variação somaclonal, um fenómeno favorecido pela longa permanência do tecido caloso em contacto com o sal através de um elevado número de repicagens (Rus *et al.*, 1999). Assim, a linha adaptada foi estabelecida por via da seleção gradual, uma vez que este método revelou-se mais eficaz na obtenção de tecido caloso capaz de crescer na presença de 150 mM NaCl sem se registarem perdas consideráveis de material por mortalidade (Queirós *et al.*, 2007). Para esse efeito, foi usada uma cultura estabelecida de tecido caloso, que havia sido induzida a partir de folhas jovens de plantas de *S. tuberosum* L. cv. Désirée (Queirós, 2001) e que foi mantida em frascos de cultura com 100 mL de meio de manutenção (Tabela 2.1) previamente esterilizados por autoclavagem (121°C, 24 min). Esta cultura foi designada por linha controlo (Figura 2.1A). No momento de se proceder à repicagem do tecido caloso para meio fresco, porções de tecido controlo (cerca de 2-4 g) foram inicialmente transferidas para meio de manutenção ao qual se adicionou 50 mM NaCl; ao fim de 28 dias, procedeu-se à transferência dos fragmentos não necrosados de tecido caloso crescido na presença de 50 mM para o mesmo meio mas com 100 mM NaCl, repetindo-se o procedimento após quatro semanas, em que o tecido foi subcultivado para meio de manutenção com 150 mM NaCl. A linha adaptada usada neste trabalho foi conseguida ao fim de quatro repicagens sucessivas no meio contendo 150 mM NaCl (Figura 2.1B).

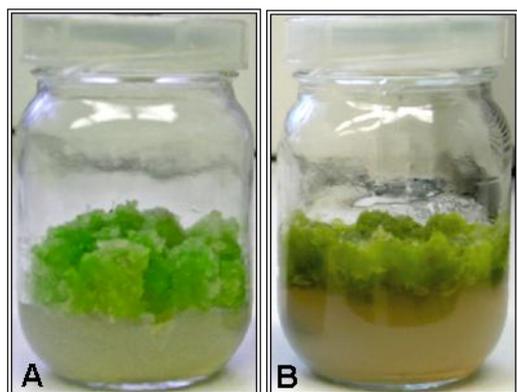


Figura 2.1 – Tecido caloso controlo mantido na ausência de NaCl (A) e tecido crescido na presença de 150 mM NaCl ao fim de 4 meses de cultura (B).

As culturas de tecido controlo e adaptado a 150 mM NaCl foram mantidas em estufa climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e sujeitas a um fotoperíodo de 16 h de luz fornecida por um conjunto de lâmpadas fluorescentes com uma intensidade luminosa de $40\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A renovação do meio nutritivo (Tabela 2.1) foi realizada após quatro semanas de cultura em condições assépticas.

Tabela 2.1 – Composição do meio de cultura utilizado na manutenção de tecido caloso de *S. tuberosum*. De notar que para a manutenção da linha adaptada foi adicionado ao meio 8766 mg L^{-1} NaCl. A ambos os meios controlo e suplementado com 150 mM foi adicionado 0,62% (p/v) de agar após o ajuste de pH para 5,7 com solução de KOH.

Compostos inorgânicos	mg L ⁻¹	Compostos orgânicos	mg L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	1650	Biotina	0,05
KNO ₃	1900	Ácido nicotínico	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	Piridoxina	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Tiamina	0,5
KH ₂ PO ₄	170	Mio-inositol	2
Fe-EDTA	40	Glicina	5
KI	0,83	Ácido fólico	0,5
H ₃ BO ₃	6,2	Sacarose	20 000
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9	Hidrolisado de caseína	1000
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	Reguladores crescimento	mg L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	Benzilaminopurina (BA)	0,5
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,025		

2.1.2. Exposição de tecido caloso a tratamento de choque com 150 mM NaCl

Para avaliar o efeito do tratamento de choque com NaCl no comportamento do tecido caloso, parte do tecido controlo crescido em meio de cultura sem sal (Figura 2.2A₁) foi transferido diretamente para meio contendo 150 mM NaCl, sem qualquer adaptação prévia à presença do sal (Figura 2.2A₂). Por sua vez, o tecido adaptado e cultivado em meio salino (Figura 2.2B₁) foi transferido para o mesmo meio mas sem NaCl (Figura 2.2B₂). Ao fim de quatro semanas de cultura em estufa climatizada e nas condições acima descritas efetuou-se a colheita do tecido caloso exposto a tratamento de choque salino (Figura 2.2A₃) e crescido na ausência de sal (Figura 2.2B₃).

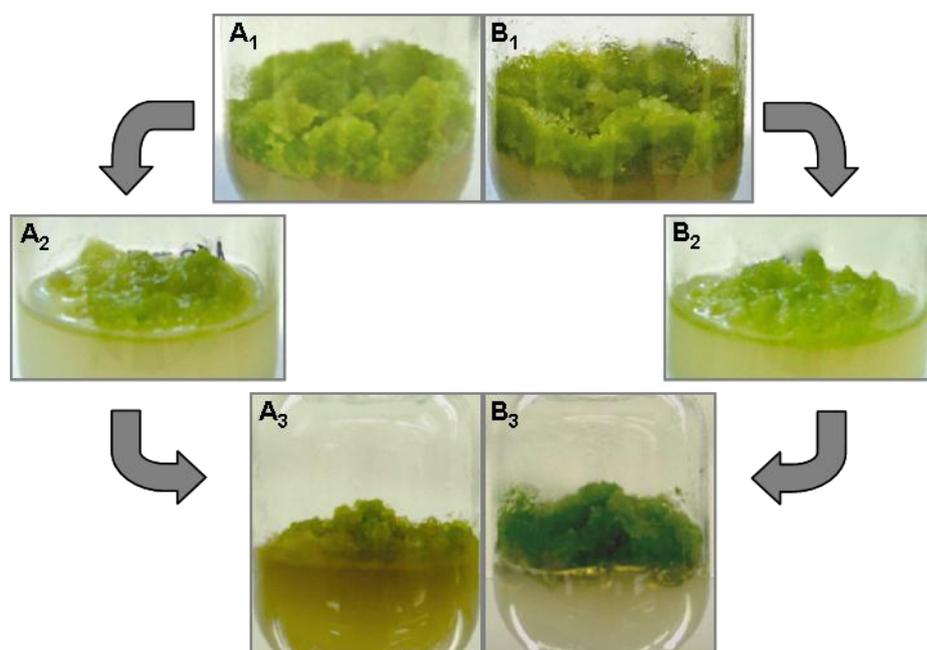


Figura 2.2 – Esquema do procedimento utilizado para analisar o comportamento do tecido caloso quando sujeito à alteração das condições de crescimento. O tecido caloso controlo (A₁) foi cultivado em meio contendo 150 mM NaCl (A₂), e ao fim de 28 dias de cultura foi colhido (A₃). O tecido adaptado crescido na presença de 150 mM NaCl (B₁) foi mantido durante 28 dias em meio nutritivo sem sal (B₂), sendo depois colhido (B₃).

2.1.3. Colheita de tecido caloso

A colheita do material controlo e adaptado foi realizada ao fim de 28 dias de cultura, coincidindo com o momento em que o tecido caloso controlo era subcultivado para meio fresco e tendo decorridos seis meses de permanência do tecido adaptado em meio salino, sendo que esteve exposto durante quatro meses a 150 mM NaCl. De salientar, que nas várias colheitas realizadas ao longo deste trabalho foi nosso objetivo assegurar que o

material adaptado apresentasse o mesmo tempo de exposição ao sal, de modo a minorar as diferenças entre réplicas biológicas.

O material biológico usado para a avaliação de determinados parâmetros bioquímicos e estudo do sistema de defesa antioxidante foi colhido em três datas diferentes, a partir de tecido caloso mantido em quatro frascos predefinidos para avaliar o crescimento. Em cada colheita procedeu-se à pesagem do tecido contido em cada frasco para quantificação do crescimento; posteriormente, o tecido caloso de cada condição experimental foi congelado e reduzido a pó em azoto líquido, dividido em alíquotas que foram pesadas e armazenadas a -80°C . Para os restantes estudos foi também usado material recolhido de pelo menos quatro frascos de cultura, em três datas diferentes, funcionando assim cada colheita como um ensaio independente. Material fresco foi processado de imediato para os estudos de ultraestrutura e de transporte em vesículas de tonoplasto, como indicado adiante. Por sua vez, o tecido caloso destinado à avaliação genotípica foi inicialmente sujeito a uma secagem rápida em papel de filtro, para ser depois congelado e reduzido a pó em azoto líquido e guardado a -80°C . Já para a análise proteómica por eletroforese bidimensional foram usadas amostras de material controlo e adaptado que fora submetido a um processo de liofilização, após congelamento e redução a pó em azoto líquido.

Relativamente à colheita do tecido que foi sujeito ao tratamento de choque com sal, esta foi realizada no final do tratamento, isto é, quatro semanas após a transferência do tecido caloso controlo para meio de cultura com sal. Paralelamente, procedeu-se à colheita do tecido adaptado que havia sido transferido para meio sem sal. De mencionar, que o material usado para os vários estudos foi recolhido de dez frascos de cultura, operação realizada em duas datas. O tecido caloso colhido foi pesado, congelado e reduzido a pó em azoto líquido e armazenado a -80°C .

2.2. Estudos em tecido caloso adaptado a 150 mM NaCl e sujeito a tratamento de choque

2.2.1. Avaliação do crescimento e conteúdo hídrico

No momento de se proceder à repicagem do tecido caloso para novo meio, em condições de assepsia, porções de tecido controlo e adaptado foram pesadas em frascos de cultura contendo meio (peso inicial, p_i), e ao fim de 28 dias, todo o tecido foi recolhido e pesado

(peso final, p_f). O crescimento foi expresso em termos de crescimento absoluto através da equação 1.

$$\text{Crescimento (\%)} = \frac{p_f - p_i}{p_i} \times 100 \quad [1]$$

O mesmo procedimento foi seguido para quantificar o crescimento do tecido sujeito a choque salino e do que alternou para meio sem sal.

O conteúdo hídrico foi estimado com base no peso seco (p_s), que foi determinado após a secagem em estufa a 80°C dos calos das várias condições experimentais até à estabilização do peso, utilizando a equação 2,

$$\text{Conteúdo hídrico (\%)} = \frac{p_{fr} - p_s}{p_{fr}} \times 100 \quad [2]$$

em que, p_{fr} (g) é o peso fresco do tecido e p_s (g) o peso seco.

2.2.2. Análise de elementos inorgânicos

A análise dos iões sódio (Na^+), potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}) e cloreto (Cl^-) foi efetuada em amostras de tecido caloso previamente seco (cerca de 1,0 g). Após digestão por solução de água régia ($\text{HCl} + \text{HNO}_3$) em micro-ondas, os elementos sódio e potássio foram determinados por fotometria de chama, e o cálcio por espectrofotometria de absorção atômica. O ião cloreto foi determinado no extrato aquoso das amostras secas depois de maceradas por titulação utilizando o método de Mohr.

2.2.3. Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada através da quantificação do malondialdeído (MDA), o produto final da reação ocorrida ao nível da estrutura membranar, seguindo o procedimento descrito por Heath & Packer (1968). Amostras de tecido caloso (cerca de 0,2 g) guardadas a -80°C foram homogeneizadas em 1 mL de TCA¹ 0,1% (p/v) usando um 'vortex'. Centrifugaram-se os homogeneizados a $10000 \times g$ durante 10 min, e a alíquotas de 0,250 mL de sobrenadante adicionou-se 1 mL de TBA² 0,5% (p/v) em TCA 20%. Paralelamente, preparou-se o branco através da junção de TCA 0,1% em substituição da amostra com 1 mL da mistura de TCA com TBA. Após 30 min de incubação a 95°C , o branco e as amostras foram arrefecidas em gelo durante 10 min e centrifugadas a $10000 \times$

¹TCA – Ácido tricloroacético

²TBA – Ácido tiobarbitúrico

g durante 15 min. A absorvância do sobrenadante foi lida a 532 nm e 600 nm, e o conteúdo de MDA (expresso em nmol de MDA por grama de peso fresco) calculado a partir da diferença entre os valores obtidos a 532 nm e 600 nm, usando o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.2.4. Doseamento da prolina

O conteúdo da prolina foi determinado de acordo com a técnica descrita por Bates *et al.* (1973). Num almofariz com um pouco de areia de quartzo, homogeneizou-se cerca de 0,5 g de tecido caloso mantido a -80°C em 10 mL de ácido sulfosalicílico 3% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a $500 \times g$ durante 10 min, a 10°C , e uma alíquota de 2 mL de sobrenadante foi usada para a reação colorimétrica com igual volume de ácido acético glacial e de ninidrina ácida. A mistura foi incubada 1 h a 100°C e, após arrefecimento em gelo, adicionou-se 4 mL de tolueno. Depois de agitar vigorosamente, deixou-se estabilizar para separação das fases; recolheu-se a fase superior de cor avermelhada e a absorvância foi lida a 520 nm, usando o tolueno como branco. Uma reta padrão obtida a partir de soluções de prolina de concentração conhecida foi usada para determinar a concentração de prolina em cada amostra.

2.2.5. Estudo bioquímico do sistema de defesa antioxidante

2.2.5.1. Análise da atividade de enzimas antioxidantes

2.2.5.1.1. Preparação dos extratos enzimáticos e quantificação de proteína

Amostras de tecido caloso (cerca de 1 g) foram homogeneizadas a $0-4^{\circ}\text{C}$ num almofariz com um pouco de areia de quartzo e no meio de extração com a seguinte composição: tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,3), $\text{Na}_2\text{-EDTA}^3$ 1 mM, glicerol 8% (v/v), ascorbato 5 mM, PMSF^4 1 mM, inibidor de proteases [1,4 pastilhas/10 mL CompleteTM, Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail (Roche)] e PVPP^5 insolúvel 2% (p/v). O extrato foi centrifugado a $35000 \times g$ durante 18 min, a 4°C , e o sobrenadante foi usado para a quantificação da proteína solúvel e para os ensaios de atividade das seguintes enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), glutaciona

³ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ – Ácido etilenodiaminotetraacético disódico

⁴PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

⁵PVPP – Polivinilpolipirrolidona

redutase (GR) e desidroascorbato redutase (DHAR). O sedimento obtido foi também aproveitado com a finalidade de estudar a atividade da APX associada às membranas. Assim, o sedimento foi ressuspensão no tampão de extração contendo CHAPS⁶ 2% (p/v) e a suspensão resultante foi incubada durante 30 min sob ligeira agitação a 4°C; após 18 min de centrifugação a 35000 × g e a 4°C, o sobrenadante recolhido foi definido como a fração insolúvel.

Dos extratos obtidos foram separadas alíquotas para a quantificação de proteínas e preparadas alíquotas para os estudos de atividade enzimática, tendo ainda uma parte do extrato sido transferido para tubos ‘Amicon Ultra’ (Millipore Corporation) e concentrado através de duas centrifugações consecutivas a 5000 × g durante 15 min a 4°C. Às amostras destinadas à avaliação da actividade da CAT, GR e DHAR adicionou-se DTT⁷ numa concentração final de 10 mM e glicerol para a concentração de 40%, enquanto para a avaliação da APX apenas foi adicionado ao extrato glicerol (40%). Para além deste último reagente, foi também incluída azida sódica (10 μM) na preparação das amostras para a análise da SOD. Por sua vez, o extrato concentrado foi combinado com glicerol (40%) para a visualização em gel nativo da atividade da APX, tendo-se acrescentado ainda azida sódica (10 μM) ou DTT (10 mM) para a visualização das atividades da SOD e da GR, respetivamente. As amostras preparadas para a quantificação espectrofotométrica da atividade foram utilizadas logo após a extração de proteínas, sendo mantidas à temperatura entre 0 e 4°C até à sua utilização, enquanto as amostras destinadas à aplicação em gel nativo foram guardadas a –80°C, com a excepção dos extratos enzimáticos da APX e GR cujas eletroforeses decorreram no dia de extração.

A quantificação de proteínas foi realizada segundo o método descrito por Bradford (1976). Fez-se reagir em ‘cuvette’ de espectrofotómetro 33 μL de extrato previamente diluído com 990 μL de solução de ‘Coomassie PlusTM Protein Assay Reagent’ (Pierce), usando água como branco e preparados triplicados para cada amostra. Ao fim de 10 min à temperatura ambiente e na obscuridade, foram feitas leituras de absorvância a 595 nm. Uma reta padrão obtida a partir de soluções de BSA⁸ de concentração conhecida foi usada para determinar a concentração de proteína em cada amostra.

⁶CHAPS – 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato

⁷DTT – Ditioneitol

⁸BSA – Albumina sérica bovina

2.2.5.1.2. Quantificação espectrofotométrica da atividade enzimática

Superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada por espectrofotometria com base na inibição da redução fotoquímica do NBT⁹, de acordo com o método descrito por Becana *et al.* (1986). A mistura de reação num volume final de 3 mL continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), Na₂-EDTA 0,1 mM, metionina 13 mM, NBT 75 µM, riboflavina 2 µM e o extrato enzimático correspondente a 40-60 µg de proteína. A reação enzimática foi iniciada pela adição da riboflavina, e os tubos contendo a mistura foram de imediato iluminados por um conjunto de seis lâmpadas fluorescentes de 11W, num suporte giratório, durante 10 min. A reação terminou quando a luz foi desligada.

Os brancos foram preparados com todos os reagentes da mistura substituindo a componente de iluminação por condições de obscuridade, enquanto os controlos receberam o meio usado na extração em vez do extrato enzimático. O produto da reação foi quantificado pela leitura de absorvância a 560 nm e uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a redução do NBT.

Catalase (CAT; EC 1.11.1.6)

O método espectrofotométrico descrito por Rao *et al.* (1996) foi usado para quantificar a atividade da CAT. A reação ocorreu a 25°C em 1 mL de volume final contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), extrato enzimático correspondente a cerca de 2-4 µg de proteína, e foi iniciada pela adição do H₂O₂ na concentração final de 0,12% (v/v). A taxa de degradação do H₂O₂ pela enzima foi monitorizada por leituras de absorvância a 240 nm em intervalos de 15 segundos, durante 1 min. Com base na Lei de Lambert-Beer e sabendo que o coeficiente de extinção molar para o H₂O₂ é 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹, a atividade da CAT foi determinada e expressa em nmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11)

A actividade da APX nas frações solúvel e insolúvel foi testada pelo método espectrofotométrico descrito por Amako *et al.* (1994). A mistura de reação continha tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,3), ascorbato 0,5 mM, extrato enzimático correspondente a cerca de 5-10 µg de proteína, H₂O₂ 0,1 mM, e água a perfazer o volume

⁹NBT – Nitroazul de tetrazólio

final de 1 mL. Paralelamente, foi preparado o branco com todos os componentes da reação, substituindo-se o extrato enzimático pelo meio usado na extração. A reação ocorreu a 25°C e foi iniciada pela adição do H₂O₂, sendo a taxa de oxidação do ascorbato monitorizada por leituras de absorvância a 300 nm em intervalos de 30 segundos, durante 1 min. A atividade da APX foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de 0,49 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em μmol AsA oxidado min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Glutationa redutase (GR; EC 1.6.4.2)

A quantificação da atividade da GR pelo método espectrofotométrico foi realizada de acordo com Rao *et al.* (1996). A mistura de reação continha tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), Na₂-EDTA 2 mM, GSSG 0,5 mM, NADPH 0,2 mM, extrato enzimático correspondente a cerca de 10-20 μg de proteína, e água a perfazer o volume final de 1 mL. O branco foi obtido pela substituição do extrato enzimático pelo meio usado na extração, para além de todos os outros reagentes da mistura. A reação ocorreu a 25°C, foi iniciada pela adição de NADPH e a taxa de oxidação deste composto foi monitorizada por leituras de absorvância a 340 nm em intervalos de 15 segundos, durante 1 min. A actividade da GR foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em μmol NADPH oxidado min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Desidroascorbato redutase (DHAR; EC 1.8.5.1)

A atividade da DHAR foi quantificada de acordo com a técnica descrita por Nakano & Asada (1981), com algumas alterações. A mistura de reação tinha a seguinte composição: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), Na₂-EDTA 0,1 mM, GSH 2,5 mM, DHA 0,4 mM, extrato enzimático correspondente a cerca de 2-4 μg de proteína, e água a perfazer o volume final de 1 mL. Para o branco adicionou-se à mistura o meio usado na extração em vez do extrato enzimático. A reação ocorreu a 25°C e foi iniciada pela adição de DHA, sendo a taxa de formação do ascorbato monitorizada por leituras de absorvância a 265 nm em intervalos de 15 segundos, durante 1 min. A atividade da enzima foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de 14,0 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em μmol AsA min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.2.5.1.3. Eletroforese e detecção da atividade de enzimas antioxidantes em gel nativo de poliacrilamida

A separação eletroforética das isoformas das enzimas antioxidantes foi feita em géis nativos de poliacrilamida com 1,5 mm de espessura, usando o sistema descontínuo de Laemmli (1970), no qual foram utilizados géis separadores de 7-10% (acrilamida:bisacrilamida, 29:1; Bio-RAD) e géis concentradores de 4%, ambos com glicerol 10%. Os vários extratos enzimáticos foram combinados com tampão de amostra¹⁰ na proporção de 10:1 imediatamente antes de serem aplicados no gel. A eletroforese foi realizada na unidade 'SE 260 Mighty Small II' (Amersham Biosciences), a 4°C, em tampão Tris-HCl¹¹ 25 mM e glicina 192 mM (pH 8,3).

SOD

Os três tipos de SOD foram separados em gel separador 10%, com uma intensidade de corrente de 15 mA, tendo sido aplicados 30 µg de proteína no gel. Após a eletroforese, a atividade da enzima foi visualizada através da técnica de revelação descrita por Donahue *et al.* (1997). Para a revelação, os géis foram cortados em três porções equivalentes, sendo duas delas destinadas à ação dos inibidores KCN¹² e H₂O₂. Estes dois inibidores permitem identificar os três tipos de SOD, sendo que o KCN inibe a atividade da Cu/Zn-SOD, enquanto o H₂O₂ inibe a Cu/Zn-SOD e Fe-SOD (Becana *et al.*, 1989). Cada uma das porções foi incubada com agitação em tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM (pH 7,8) com Na₂-EDTA 1 mM, durante 20 min, em condições de obscuridade, tendo-se acrescentado numa delas KCN na concentração final de 4 mM e na outra H₂O₂ 5 mM. A seguir, as porções dos géis foram novamente incubadas em tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM (pH 7,8) e Na₂-EDTA 1 mM, contendo NBT 0,24 mM, riboflavina 33,2 µM e TEMED¹³ 0,2% (v/v); às respectivas porções foi acrescentado KCN 4 mM e H₂O₂ 5 mM. Após 20 min na obscuridade e em agitação, os géis foram lavados em água destilada e mantidos sob uma lâmpada de 60W até se atingir o contraste desejado entre as bandas de atividade e o fundo.

¹⁰Tampão de amostra – Sacarose 50% (p/v) e azul de bromofenol 0,1% (v/v)

¹¹Tris-HCl – Tris(hidroximetil) aminometano, com pH ajustado com ácido clorídrico

¹²KCN – Cianeto de potássio

¹³TEMED – Tetrametiletilenodiamina

CAT

O padrão de isoformas da CAT foi analisado usando o gel de separação 7%. O extrato enzimático com 2 µg de proteína foi combinado com tampão de amostra contendo DTT 60 mM (Anderson *et al.*, 1995) e a eletroforese foi realizada com uma voltagem constante de 80 V, durante 6 h. Terminada a eletroforese, a atividade da enzima foi detetada com base no método descrito por Clare *et al.* (1984). Inicialmente, os géis foram incubados com agitação e na obscuridade em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) com HRP¹⁴ 0,05 mg mL⁻¹ (p/v). Ao fim de 45 min, foi adicionado à solução H₂O₂ (concentração final de 5 mM) e a incubação prolongou-se por mais 10 min. No final, os géis foram lavados em água destilada e mergulhados em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) com DAB¹⁵ 0,5 mg mL⁻¹ (p/v) até se visualizarem as bandas de actividade.

APX

Para a deteção da atividade da APX foi usado o gel separador a 10%. Ao tampão de eletroforese foi adicionado ascorbato 2 mM e, antes da aplicação das amostras, foi feita uma pré-corrída com intensidade de 35 mA, durante 30 min e a 4°C, para permitir que o ascorbato se incorporasse no gel. Cerca de 25 µg de proteína foram aplicados no gel e a eletroforese decorreu com uma amperagem fixa de 15 mA. A técnica de revelação de Mittler & Zilinskas (1993) foi usada para visualizar no gel a atividade da enzima. O procedimento usado foi o seguinte: os géis foram incubados com agitação e na obscuridade em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) com ascorbato 2 mM, durante 30 min, sendo a solução de incubação substituída ao fim de 15 min. Seguiu-se nova etapa de incubação em que os géis foram mergulhados em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) com ascorbato 4 mM e H₂O₂ 2 mM, durante 20 min que, após lavagem em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), os géis foram colocados em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8) contendo TEMED 28 mM e NBT 2,45 mM até se visualizarem as bandas claras num fundo escuro. A reação foi parada por lavagem em água destilada.

No sentido de averiguar se as bandas detetadas eram efetivamente peroxidases do ascorbato, recorreu-se à inibição específica da atividade desta enzima utilizando o inibidor p-HMB¹⁶. Para esse efeito, foi necessário aplicar as amostras em duplicado para que, após

¹⁴HRP – ‘Horseradish peroxidase’

¹⁵DAB – 3,3’-Diaminobenzidina

¹⁶p-HMB – p-Hidroximercuribenzoato

a eletroforese, o gel fosse cortado em duas partes, uma para visualizar o zimograma da APX e a outra para ser sujeita à ação do inibidor. Deste modo, o procedimento anterior foi realizado em paralelo, tendo na porção do gel sujeita ao inibidor estado presente em todas as etapas da revelação o p-HMB na concentração final de 600 μ M.

GR

Para a separação eletroforética das isoformas da GR foi usado o gel separador a 8%. De cada amostra aplicaram-se 40 μ g de proteína, que foram submetidos a uma voltagem fixa de 80 V. No final da eletroforese, a revelação foi feita com base no método descrito por Anderson *et al.* (1995). O gel foi incubado em tampão Tris-HCl 250 mM (pH 7,8), contendo MTT¹⁷ 0,25 mM, DCPIP¹⁸ 0,34 mM, GSSG 3,6 mM e NADPH 0,4 mM, com agitação e na obscuridade, durante 1 h, utilizando-se no final ácido acético 7,5% para parar a reação. Para confirmar a identidade das bandas como sendo isoformas da GR, um duplicado do gel foi incubado na mesma solução mas sem GSSG. Assim, e tal como referido para a APX, as amostras foram aplicadas em duplicado e, antes da revelação, o gel foi cortado em duas partes.

2.2.5.1.4. 'Western blotting' com anticorpos específicos anti-CAT1 e -CAT2, anti-cAPX e -pAPX

Após a separação eletroforética das isoformas da CAT e da APX, e antes da eletrotransferência, os géis foram incubados com agitação em tampão Tris-HCl 187,5 mM (pH 8,8) contendo mercaptoetanol 5% (v/v) e SDS¹⁹ 0,3% (p/v), durante 1 h à temperatura ambiente. As isoformas separadas em gel nativo foram transferidas para membranas de nitrocelulose com um poro de 0,45 μ m (Schleicher & Schuell, BioScience), utilizando-se para o efeito o equipamento 'TE Series Transphor Electrophoresis Unit' (Hoefer Scientific Instruments) e o tampão de transferência composto por metanol 20% (v/v) e SDS 0,1% em Tris-HCl 50 mM (pH 8,3) e glicina 380 mM. A transferência foi realizada a 14°C com uma intensidade de corrente de 20 mA, durante 16 h, seguida de uma corrente de 200 mA durante 1 h.

¹⁷MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio

¹⁸DCPIP – 2,6-diclorofenolindofenol

¹⁹SDS – Dodecil sulfato de sódio

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente em solução PBS-T²⁰ (pH 7,4) contendo 5% de leite magro em pó (p/v), a que se seguiu uma lavagem de 15 min, e três lavagens de 5 min, em PBS-T com 1% de leite magro em pó. Lavadas as membranas na solução de bloqueio, estas foram incubadas com agitação suave a 4°C e durante 16 h com os anticorpos primários anti-CAT1 e anti-CAT2 (Santos *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2005), diluídos 1:1250 em PBS-T contendo BSA 0,3%, e os anticorpos²¹ anti-cAPX (APX citosólica) (Nito *et al.*, 2001) e anti-pAPX (APX peroxissomal) (Corpas & Trelease, 1998), ambos diluídos 1:1200 na mesma solução. Após quatro lavagens (uma de 15 min e outras três de 5 min) em PBS-T com 1% de leite magro em pó, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 h com o anticorpo secundário²² diluído 1:2000 em PBS-T com BSA 0,3%. No final da incubação, as membranas foram várias vezes lavadas em PBS-T (uma lavagem de 15 min e quatro de 5 min) para se proceder, a seguir, à imunodeteção. Este processo foi efetuado com base no método quimio-fluorescente, tendo sido utilizados os reagentes do ‘kit’ ECL²³ (‘Lumi-Light Plus Western blotting substrate’, GE Healthcare) e seguidas as instruções descritas para a deteção do sinal nas membranas. A visualização foi feita em filme radiográfico (Ortho CP-G Plus, Agfa) recorrendo ao revelador ‘Fuji Medical Film Processor’.

2.2.5.1.5. Análise densitométrica

Os géis nativos e os filmes derivados de ‘western blotting’ foram digitalizados no densitómetro GS-800 (Bio-RAD) e as variações de atividade das enzimas nos géis e dos níveis de isoformas nos filmes foram analisados no programa de análise de imagem ‘Quantity One’ (Bio-RAD). Foi determinada a área relativa e a intensidade relativa de cada banda, sendo a quantificação de cada banda dada pela razão intensidade/área dessa banda. Os valores obtidos das leituras densitométricas para as bandas em análise foram normalizados em relação aos valores registados para as bandas controlo (definidas como 100%).

²⁰PBS-T – ‘Phosphate buffered saline-Tween 20’ [(NaCl 0,8%, KCl 0,02%, Na₂HPO₄ 0,144% e KH₂PO₄ 0,024% com monolaurato de polixilenosorbitano 0,1% (v/v)]

²¹Anti-cAPX gentilmente cedido pelo Prof. Mikio Nishimura (National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan) e anti-pAPX cedido pelo Prof. Francisco Javier Corpas (Estación Experimental del Zaidín, Granada, Spain)

²²Anticorpo secundário – anti-IgG (imunoglobulina tipo G) de coelho conjugado com a enzima peroxidase (‘Peroxidase-labelled anti-rabbit IgG’, Vector Laboratories)

²³ECL – ‘Enhanced chemoluminescence’

2.2.5.2. Extração e quantificação de compostos antioxidantes

Ascorbato

Amostras congeladas de tecido caloso (cerca de 0,6 g) foram homogeneizadas a 0-4°C, num almofariz com um pouco de areia de quartzo, em 3 mL de ácido metafosfórico a 5% (p/v) contendo Na₂-EDTA 1 mM e PVPP insolúvel 2% (p/v). O extrato foi centrifugado a 19000 × g, durante 15 min, a 4°C, e o sobrenadante foi usado para a quantificação do ascorbato.

Atendendo a que o ascorbato (AsA) e a sua forma oxidada, o desidroascorbato (DHA), constituem em conjunto a denominada vitamina C, embora somente o ascorbato possua atividade antioxidante (Conklin, 1998; Rodrigues, 1998), as duas formas foram analisadas por polarografia diferencial de impulsos de acordo com a metodologia desenvolvida por Rodrigues *et al.* (2010). A determinação seletiva do AsA e do DHA tem especial interesse pois a razão entre as concentrações destas duas formas permite acompanhar a evolução do estado oxidativo do tecido caloso. O processo polarográfico de análise dos dois compostos baseou-se na oxidação prévia do AsA a DHA, por intermédio da NBSI²⁴, e na derivatização do DHA, composto α -dicarbonílico, com a OFDA²⁵, uma o-diamina aromática, para formar um composto do tipo quinoxalina que foi analisado polarograficamente. Utilizando este procedimento determinou-se, simultaneamente, as quantidades de AsA e de DHA existentes na amostra. Suprimindo o passo de oxidação, determinou-se unicamente o DHA presente na amostra; usando a oxidação com NBSI determinava-se o teor total (AsA + DHA). A diferença entre os dois resultados permitiu calcular a concentração de AsA.

As determinações polarográficas foram realizadas num sistema de voltametria 'Metrohm' (VA Processor 646) que controlava um posto de polarografia 'Metrohm' (VA Stand 647) constituído por um eléctrodo multimodo de mercúrio (eléctrodo de trabalho), um eléctrodo de referência de Ag/AgCl, KCl 3M e por um eléctrodo auxiliar de platina. As condições operacionais que foram utilizadas nos ensaios polarográficos foram as seguintes: eléctrodo de mercúrio gotejante; amplitude de impulso de 50 mV (impulso catódico); velocidade de varrimento do potencial de 6 mV/s; intervalo de tempo entre impulsos

²⁴NBSI – N-bromossuccinimida

²⁵OFDA – o-fenilenodiamina

consecutivos de 1 segundo (tempo de vida da gota); intervalo de potencial definido entre -500 a -1000 mV.

Para a análise polarográfica do teor total de ascorbato (vitamina C) nas diferentes amostras de tecido caloso a quantificação foi feita recorrendo ao método de adição de padrão. Este método de quantificação é, comparativamente ao método da curva de calibração, menos sujeito às variações de sensibilidade provocadas pela matriz da amostra, tendo em conta que a polarografia é uma técnica bastante sensível à existência de compostos interferentes (Rodrigues, 1998). De acordo com a metodologia desenvolvida para esta análise, para a célula polarográfica mediram-se 20 mL de tampão acetato 200 mM (pH 4,5), adicionaram-se 200 µL de extrato e 62,5 µL de solução de NBSI 2 g/L. Após 5 min de passagem de azoto pela solução, adicionaram-se 5 mL de solução de OFDA 0,5%, deixou-se borbulhar azoto durante mais 5 min e registou-se o polarograma da solução branco. Este ensaio foi repetido mais cinco vezes, adicionando-se em cada uma delas, respectivamente, 10, 20, 30, 40 e 50 µL de solução padrão de AsA 100 mg/L à célula polarográfica contendo o tampão com a amostra e o agente oxidante, antes de adicionar a OFDA. Os respetivos polarogramas foram registados e anotados os valores de intensidade de corrente do pico polarográfico.

Como referido, o método polarográfico pode ser utilizado para a análise do DHA sem que o AsA presente seja medido, bastando, para tal, suprimir a adição de NBSI (Rodrigues, 1998). Assim, para a célula polarográfica mediram-se 20 mL de tampão acetato 200 mM (pH 4,5), juntaram-se 1 mL de extrato e 5 mL de solução de OFDA 0,5%. Deixou-se borbulhar azoto durante 10 min e registou-se o polarograma da solução. Registado o valor do sinal obtido, a quantificação deste composto foi feita recorrendo ao método da curva de calibração usando soluções padrão de AsA. Mediram-se para a célula polarográfica 20 mL de tampão acetato 200 mM (pH 4,5), juntaram-se 25 µL de solução de NBSI 2 g/L e um determinado volume de solução padrão de AsA. Após 5 min de passagem de azoto pela solução, adicionaram-se 5 mL de OFDA 0,5%; deixou-se borbulhar azoto durante mais 5 min e registou-se o polarograma da solução para uma dada concentração de AsA. Repetiu-se o procedimento para diferentes concentrações de AsA e, no final, a curva de calibração foi estabelecida para concentrações de AsA entre 0 (branco) e 200 ppm.

Glutathiona

Amostras de tecido caloso (cerca de 0,6 g) guardadas a -80°C foram homogeneizadas a $0-4^{\circ}\text{C}$, num almofariz com um pouco de areia de quartzo, em 3 mL de ácido metafosfórico a 3% (p/v) contendo $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 1 mM e PVPP insolúvel 2% (p/v). Após centrifugação a $19000 \times g$ durante 15 min, a 4°C , o sobrenadante foi filtrado através de filtro de ‘nylon’ com poro de $0,2 \mu\text{m}$ (Schleicher & Schuell, MicroScience) e usado para a quantificação da glutathiona.

A identificação e quantificação das formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa com uma interface de ionização por ‘electrospray’ (HPLC-ESI/MS). O processo foi iniciado pela injeção de uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ de amostra e a separação cromatográfica de fase reversa foi feita em coluna C_{18} ($125 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$, Varian), tendo-se usado para a eluição uma solução aquosa de ácido fórmico (0,1%) (solvente A) e acetonitrilo (solvente B), com o seguinte gradiente: 0-15 min, 0% de B; 15-20 min, 4% de B; 20-25 min, 10% de B; seguido de 100% de B durante 15 min, num fluxo de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. As análises foram realizadas num cromatógrafo ‘Finnigan LCQ DECA XP MAX’ acoplado a um espectrómetro de massa ‘Finnigan LCQ DECA XP Plus’ equipado com uma fonte de ionização por ‘electrospray’ (ESI) em modo negativo e o analisador de massa do tipo ‘Quadropolo/Ion Trap’. A aquisição e processamento dos dados foram efetuados pelo programa ‘Xcalibur’ versão 1.4 SR1 (Finnigan).

As espécies em análise foram identificadas por comparação dos seus tempos de retenção e espectros de massa com os tempos de referência obtidos para as soluções padrão de GSH e GSSG (em água com 0,1% de ácido fórmico) sob as mesmas condições cromatográficas e de espectrometria de massa. A quantificação foi realizada recorrendo a curvas de calibração estabelecidas a partir das soluções padrão, com base na área dos picos obtidos para as duas formas de glutathiona (GSH e GSSG) presentes nas amostras.

Na Figura 2.3 apresentam-se dois exemplos de cromatogramas de padrões analisados por HPLC-ESI/MS nas condições descritas.

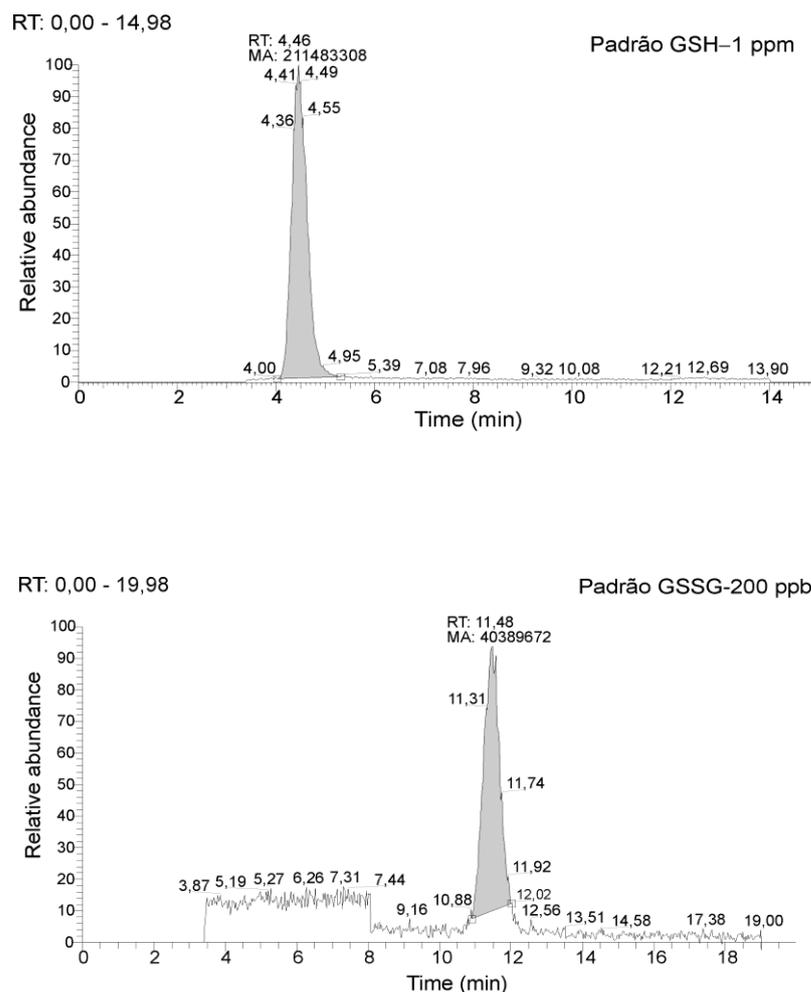


Figura 2.3 – Cromatogramas relativos à separação por HPLC com detecção por espectrometria de massa de soluções padrão de 1 ppm de GSH e de 200 ppb de GSSG.

α -Tocoferol

A extração e análise do α -tocoferol no tecido caloso foram realizadas segundo o método descrito por Lin *et al.* (2004) com algumas modificações. Homogeneizou-se cerca de 0,6 g de tecido em 6 mL de metanol num almofariz contendo areia de quartzo. De modo a melhorar a eficiência da extração, o homogeneizado foi levado ao banho de ultra-sons durante 5 min e, de seguida, foi centrifugado a $1500 \times g$ durante 15 min, a 4°C . O sobrenadante obtido foi recolhido para um balão de destilação e ao sedimento adicionou-se 5 mL de hexano, para nova extração em ultra-sons durante 5 min. Após centrifugação a $1500 \times g$ durante 15 min, a 4°C , o sobrenadante foi recolhido para o balão de destilação e o sedimento foi mais uma vez sujeito à extração com hexano como descrito acima. Os sobrenadantes recolhidos das três extrações consecutivas foram a evaporar no evaporador rotativo sob vácuo até à obtenção de um resíduo seco no balão de destilação. Este resíduo

foi ressuspenso em 500 µL de metanol e a suspensão resultante centrifugada a $1500 \times g$ durante 5 min, a 4°C. Filtrou-se o sobrenadante através de filtro de ‘nylon’ (0,2 µm; Schleicher & Schuell, MicroScience) e, de seguida, procedeu-se à análise do α -tocoferol por cromatografia líquida de alta eficiência com deteção espectralométrica (HPLC/UV).

Os extratos foram analisados num sistema de HPLC ‘Jasco Corporation’, equipado com um detetor de UV/VIS do tipo de fotodíodos (MD-1510UV/vis, Jasco). Para a separação do composto foi utilizada uma coluna C₁₈ em fase reversa (250 mm \times 4.6 mm, 5 µm, Varian), utilizando como fase móvel metanol (A) e acetonitrilo (B) (96:4, v/v) em modo isocrático, com um fluxo de 1,6 mL min⁻¹. Após injetados 20 µL de extrato na coluna cromatográfica, e uma corrida de 10 min, o pico correspondente ao α -tocoferol foi detetado no comprimento de onda de 285 nm. A identificação do composto foi feita por comparação com o tempo de retenção e espectro UV de uma solução padrão de α -tocoferol. A injeção de padrões com diferentes concentrações conhecidas de α -tocoferol permitiu estabelecer uma curva de calibração que foi, por sua vez, utilizada para quantificar o composto em cada amostra após a integração da área do pico correspondente ao α -tocoferol detetado no cromatograma. Os dados cromatográficos foram analisados utilizando o programa ‘Borwin-PDA’, versão 1.50 (JMBS Developments).

2.2.5.3. Análise estatística

Para a comparação das médias dos dados experimentais obtidos nas determinações realizadas foi usado o teste ‘t-Student’ com um nível de significância de $P < 0,05$.

2.3. Estudos em tecido caloso adaptado a 150 mM NaCl

2.3.1. Análise ultraestrutural

2.3.1.1. Preparação do material biológico para microscopia eletrónica de transmissão

Pequenas porções de tecido caloso controlo e adaptado a NaCl foram colhidas e mergulhadas de imediato numa solução fixadora composta por glutaraldeído 2,5% em tampão Na-PIPES²⁶ 1,25% (pH 7,0), durante 1 h à temperatura ambiente. Após duas

²⁶PIPES – 1,4-Piperazina-bis (ácido etanosulfónico)

lavagens no mesmo tampão a 2,5%, durante 10 min sob agitação, os fragmentos foram novamente embebidos numa solução fixadora contendo tetróxido de ósmio 2% em Na-PIPES 1,25% (pH 7,0), durante 1 h à temperatura ambiente. Durante a desidratação fez-se passar o material por concentrações crescentes de acetona, que se iniciaram a 50%, e seguiram-se a 70%, 90% e 100%, com incubações de 10 min; a última incubação no solvente foi repetida por mais quatro vezes antes da imersão em óxido de propileno. Este solvente foi progressivamente substituído pelo plástico de inclusão, começando-se a impregnação dos fragmentos de tecido com a mistura de óxido de propileno e Epon 812 na proporção de 3:1, durante 12 h com agitação, para a seguir, a concentração do plástico na mistura aumentar até à substituição completa do agente de desidratação. Após a infiltração, os pequenos fragmentos de tecido foram transferidos para os moldes para a inclusão definitiva em Epon 812, cuja polimerização decorreu a 60°C durante 24-48 h. Os blocos contendo as peças de material foram talhados e fizeram-se cortes ultrafinos com faca de diamante (Diatome Ultra 45° 1,5 mm) no ultramicrotomo 'Leica Reichert Supernova', sendo os cortes recolhidos em grelhas de cobre com malha de 200 'mesh'. As grelhas foram contrastadas com uma solução de acetato de uranilo a 2%, durante 15 min, e após lavagem em água destilada, com solução de citrato de chumbo (Reynolds, 1963), durante 10 min. As grelhas foram novamente lavadas em água destilada e, de seguida, observadas no microscópio electrónico de transmissão (Zeiss EM 902A), sendo o registo de imagens efetuado através do programa 'SC1000 ORIUSTM CCD' (Gatan).

2.3.1.2. Análise morfométrica ultraestrutural

A análise morfométrica ultraestrutural foi realizada de acordo com o método utilizado por Santos & Salema (1983). Para este estudo prepararam-se cinco blocos de cada situação, a partir dos quais fizeram-se cortes ultrafinos que foram observados no microscópio electrónico, tendo-se registado aleatoriamente 250 imagens, com ampliação final 12000 ×. Com base nessas imagens determinou-se o volume fracional do amido em relação aos plastídeos (V_v am/plast), medindo-se as áreas dos grãos de amido e dos plastídeos com recurso ao programa de análise de imagem 'ImageJ 1.41' (NIH Image). As mesmas imagens foram utilizadas para a quantificação do número de grãos de amido nos plastídeos e do número de peroxissomas com inclusão paracristalina.

Para a comparação das médias foi usado o teste 't-Student' com um nível de significância de $P < 0,05$.

2.3.2. Estudo do transporte transmembranar de Na⁺ em vesículas de tonoplasto

2.3.2.1. Isolamento de vesículas de membrana vacuolar e quantificação da proteína

As vesículas de membrana vacuolar foram isoladas a partir de tecido caloso controle e adaptado ao sal por centrifugações consecutivas e em gradiente de densidade de sacarose com base no método descrito por Façanha & de Meis (1998) para o isolamento de membranas vacuolares de raízes de milho. Todo o procedimento decorreu a baixa temperatura (4°C). Amostras de tecido caloso (cerca de 150 g) foram ressuspensas em 250 mL de tampão de extração [Tris-HCl 70 mM (pH 8,0), sacarose 250 mM, MgCl₂ 3 mM, KCl 100 mM, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, PMSF 1 mM, BSA 0,1% (p/v) e PVPP 0,2% (p/v)] e homogeneizadas no 'Ultra-Turrax' (Janke & Kunkel IKA) com pulsos de 20 segundos durante aproximadamente 5 min. O homogeneizado foi filtrado através de uma malha com poro de 0,5 mm e centrifugado a 10000 × g durante 10 min. O sobrenadante foi recuperado, filtrado através de uma camada de 'cheesecloth' e centrifugado a 100000 × g, durante 60 min. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o sedimento (fração microsomal) foi ressuspensão em 600 µL de tampão de ressuspensão [Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, glicerol 15% (v/v), PMSF 1 mM e DTT 1 mM]. A suspensão resultante foi diluída com o mesmo tampão até o volume final de 8 mL, homogeneizada em 'Potter' durante 5 min e, de seguida, cuidadosamente aplicada no topo de um gradiente descontínuo de sacarose e centrifugada a 80000 × g, durante 3 h. O gradiente de densidade de sacarose é composto por duas soluções de sacarose, uma a 32% e outra a 46%. Este gradiente foi preparado num tubo de centrífuga pela aplicação de 15 mL da solução de sacarose a 32%, em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) com EDTA 1 mM, PMSF 1 mM e DTT 1 mM, sobre 10 mL da solução de sacarose a 46% (p/v), preparada no mesmo tampão.

Desta centrifugação em gradiente de densidade resultaram duas frações, uma acima da solução de 32% (fração vacuolar) e outra entre as soluções de 32 e 46% (fração de membrana plasmática). Ambas foram cuidadosamente recolhidas para tubos de ultracentrífuga, diluídas em tampão de ressuspensão e as suspensões correspondentes foram sujeitas a uma centrifugação de 100000 × g durante 30 min. Depois dos sobrenadantes serem rejeitados, os sedimentos foram ressuspensos em 600 µL de tampão

de ressuspensão. Alíquotas de aproximadamente 100 μ L foram congeladas em azoto líquido e conservadas a -80°C .

A concentração de proteína das frações resultantes do fracionamento celular foi determinada segundo o método descrito por Lowry *et al.* (1951). Num tubo 'ependorf' misturou-se 200 μ L de amostra devidamente diluída com 1 mL da solução composta por Na_2CO_3 2% (p/v)/ NaOH 0,1M, K-Na-Tartarato 2% e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1%. Ao fim de 10 min à temperatura ambiente, adicionou-se 100 μ L do reagente de 'Folin-Ciocalteau' diluído em água destilada (1:1) e a absorvância foi lida a 750 nm decorridos 30 min. Paralelamente, foi preparada uma curva de calibração com concentrações conhecidas de BSA e a absorvância foi medida a 750 nm para determinar a concentração de proteína das amostras.

2.3.2.2. Avaliação da pureza da fração vacuolar

Para se determinar o grau de pureza da amostra em membranas vacuolares foram avaliadas as atividades hidrolítica e de bombeamento de H^+ da enzima marcadora, a ATPase vacuolar (V- H^+ -ATPase) sensível ao ião nitrato (ver secções 2.3.2.3. e 2.3.2.4.). Para se avaliar o grau de contaminação com outras membranas celulares, nas diferentes misturas de reação foram ainda testados os seguintes inibidores: vanadato (Na_3VO_4 , concentração final 0,1 mM), inibidor da ATPase da membrana plasmática (P- H^+ -ATPase) e azida (NaN_3 , 0,5 mM), inibidor da ATPase mitocondrial (F- H^+ -ATPase). As experiências controlo foram realizadas com 1 mM de ATP na ausência dos inibidores.

2.3.2.3. Determinação da atividade hidrolítica da ATPase vacuolar e da pirofosfatase

A atividade hidrolítica da ATPase²⁷ vacuolar (V- H^+ -ATPase) e da pirofosfatase (V- H^+ -PPase) foram medidas pela determinação da quantidade de Pi ²⁸ libertado, a 30°C , de acordo com o método descrito por Goffeau & Slayman (1981). As reações de hidrólise foram iniciadas pela adição de 20 μ g de proteína de membrana vacuolar à solução constituída por MOPS²⁹-Tris 50 mM (pH 7,2), MgSO_4 3 mM, KCl 100 mM, Triton X-100 0,02% (v/v) e pelo substrato (ATP ou PPI) na concentração desejada, num volume final de 1,5 mL. Dado existirem na célula outras ATPases transportadoras de prótons para além da ATPase vacuolar, sendo esta especificamente inibida pelo ião nitrato, na mistura de reação

²⁷ATPase – ATP sintetase

²⁸Pi – Fosfato inorgânico

²⁹MOPS – Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

foi também incluído KNO_3 50 mM, de modo a avaliar-se a atividade da V-H^+ -ATPase na presença deste inibidor. A atividade da V-H^+ -ATPase foi estimada a partir da diferença entre as atividades medidas na ausência e na presença de KNO_3 a 50 mM. As reações de hidrólise decorreram a 30°C e foram paradas nos tempos 0 e 5 min pela adição de 200 μL de TCA 3% (p/v), mantido a 4°C, a 500 μL da mistura de reação. A concentração de Pi libertado foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Adams (1989) que faz uso do reagente composto por molibdato de amónio 0,5%, SDS 0,5% e H_2SO_4 2%, e do ácido ascórbico a 10%. O produto da reação colorimétrica foi medido no espectrofotómetro a 880 nm e a quantidade de Pi ($\text{nmol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) determinada com base numa curva de calibração construída com diferentes concentrações de KH_2PO_4 .

2.3.2.4. Quantificação da atividade de bombeamento de prótons da ATPase vacuolar e da pirofosfatase

A atividade de bombeamento de H^+ foi quantificada pelo estudo da variação de fluorescência (ΔF) da sonda ACMA³⁰, cuja fluorescência depende do pH do meio. Os estudos foram efectuados num meio de reação, com agitação constante e a 25°C, contendo MOPS-Tris 10 mM (pH 7,0), KCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, ACMA 2 μM e 20 μg de proteína de tonoplasto, num volume final de 2 mL. A fluorescência foi medida num espectralfluorímetro (Perkin-Elmer LS-50) a um comprimento de onda de excitação de 415 nm e de emissão de 485 nm. Após a estabilização do sinal de fluorescência, a reação de bombeamento de H^+ foi iniciada pela adição de PPI nas concentrações finais de 2 μM –100 μM (para avaliar a atividade da V-H^+ -PPase) ou de ATP nas concentrações de 0,05–1 mM (para avaliar a atividade da V-H^+ -ATPase). Para se demonstrar que tinha sido gerado um gradiente de prótons pela atividade das bombas, foi adicionado ao meio de reação NH_4Cl 1,5 mM ou o protonóforo CCCP³¹ que promoveram uma imediata recuperação da fluorescência. A atividade de bombeamento de H^+ para cada concentração de substrato foi calculada a partir do declive da tangente à origem da curva de acidificação intravesicular e expressa em $\% \Delta F \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína. Os resultados obtidos foram analisados pelo programa de análise de regressão não-linear ‘GraphPad Prism 4.0’, que permitiu determinar os parâmetros cinéticos de ambas as bombas de prótons do vacúolo.

³⁰ ACMA – 9-Amino-6-cloro-2-metoxiacridina

³¹ CCCP – *m*-Clorocarbonilcianidafenil-hidrazona

2.3.2.5. Estudo da atividade do sistema antiporte Na^+/H^+ da membrana vacuolar

A atividade do sistema de antiporte Na^+/H^+ foi avaliada num espectralfluorímetro (Perkin-Elmer LS-50) pela medição da dissipação do gradiente de H^+ após a adição de concentrações crescentes de Na_2SO_4 (4–300 mM). As vesículas de membrana foram previamente energizadas pela ativação da V-H^+ -ATPase ou da V-H^+ -PPase. Mas uma vez que a V-H^+ -PPase mostrou ser mais eficiente do que a V-H^+ -ATPase na geração e manutenção do gradiente electroquímico de H^+ (Queirós *et al.*, 2009), nas experiências realizadas a energização da membrana vacuolar (20 μg de proteína) foi efetuada pela adição de 15 μM de PPi ao meio de reação com a mesma composição que a do meio usado nos estudos de atividade de bombeamento de H^+ .

Uma vez medidas as velocidades iniciais de recuperação da fluorescência do ACMA para cada concentração de Na^+ (expressas em $\% \Delta F \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína), a atividade do sistema de antiporte Na^+/H^+ foi representada num gráfico de ‘Michaelis-Menten’ e os parâmetros cinéticos foram estimados pelo programa ‘GraphPad Prism 4.0’.

Para avaliar a especificidade do sistema de antiporte foram testados diferentes sais (Na_2SO_4 , NaCl , gluconato de sódio, LiCl , cloreto de colina, KCl , K_2SO_4 , gluconato de potássio) na concentração final de 100 mM.

2.3.2.6. Eletroforese e ‘western blotting’ com anticorpos específicos anti-subunidade A da V-H^+ -ATPase e anti- V-H^+ -PPase

As proteínas da membrana vacuolar foram separadas em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo o sistema descontínuo de Laemmli (1970). Foram preparados dois tipos de géis com espessura de 1,5 mm, o gel separador com malha de 10% (acrilamida:bisacrilamida, 29:1; Bio-RAD) e o gel concentrador de 5%. As amostras proteicas foram solubilizadas em solução desnaturante [Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,006% (v/v)] na proporção de 3:1 e aquecidas, a 70°C, durante 10 min. No gel foram aplicados 10 μg , 20 μg ou 60 μg de amostra proteica por poço, e aplicaram-se também 5 μL de um marcador de proteínas de baixo peso molecular (10-250 kDa; Bio-RAD). A eletroforese decorreu na unidade ‘SE 260 Mighty Small II’ (Amersham Biosciences), em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,3) e glicina 192 mM com SDS 0,1% (p/v), com uma intensidade de corrente de 15 mA até as amostras atingirem o gel separador, passando depois para 20 mA, a uma temperatura de 15°C.

No final da corrida eletroforética, os polipéptidos separados nos géis onde foram aplicados 60 µg de extrato foram revelados pela técnica de coloração com azul de ‘Coomassie R-250’. Mergulharam-se os géis numa solução fixadora composta por metanol a 40% (v/v) e ácido acético glacial a 10% (v/v), durante 30 min. A seguir, os géis foram corados em solução com metanol a 50% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v) e o corante azul de ‘Coomassie R-250’ a 0,125% (p/v), durante 30 min. As bandas azuis num fundo transparente foram detetadas após os géis terem sido incubados numa solução descolorante [(5% metanol (v/v), 7,5% ácido acético glacial (v/v) e glicerol 2% (v/v)]. Paralelamente, os polipéptidos presentes nos géis com 10 µg e 20 µg de extrato foram transferidos para membranas de nitrocelulose (0,45 µm; Schleicher & Schuell, BioScience), utilizando-se para o efeito a unidade de transferência ‘TE Series Transphor Electrophoresis Unit’ (Hoefer Scientific Instruments). Imediatamente antes da transferência, os géis foram equilibrados, durante 5 min, em tampão de transferência constituído por metanol 20% (v/v) e SDS 0,02% (p/v) em Tris-HCl 50 mM (pH 8,3) e glicina 380 mM. A transferência foi feita com uma intensidade de corrente de 200 mA durante 1 h, a 14°C. No final, após uma breve lavagem de 5 min em solução TBS³²-T, as membranas foram incubadas durante 1 h em solução TBS-T contendo 5% de leite magro em pó (p/v) e 1% de BSA (p/v), em agitação e à temperatura ambiente. Seguidamente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários³³ contra a subunidade A da V-H⁺-ATPase (Maeshima, 2001) e contra a V-H⁺-PPase (Maeshima and Yoshida, 1989), ambos diluídos 1:2000 na solução de incubação anterior, durante 16 h sob ligeira agitação e a 4°C. Após sofrerem três lavagens sucessivas em TBS-T durante 20 min, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário diluído 1:2000 em TBS-T, com agitação suave durante 45 min, à temperatura ambiente. Seguiram-se três lavagens em TBS-T durante 20 min e uma última lavagem de 2 min em água desionizada. A revelação foi efetuada com base no método quimio-fluorescente, como descrito na secção 2.2.5.1.4., e os níveis relativos dos polipéptidos imunodetetados foram analisados por densitometria recorrendo ao programa de análise de imagem ‘Quantity One’ (Bio-RAD).

³²TBS-T – ‘Tris buffered saline-Tween 20’ [(Tris-HCl 20mM (pH 7,5) e NaCl 140 mM com monolaurato de polixilenosorbitano 0,1% (v/v)]

³³Anticorpos gentilmente cedidos pelo Prof. Masayoshi Maeshima (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya, Japan)

2.3.3. Eletroforese bidimensional

2.3.3.1. Preparação da amostra e quantificação de proteínas

Os extratos proteicos a analisar por eletroforese bidimensional foram preparados a partir de material liofilizado previamente congelado e reduzido a pó em azoto líquido. A extração das proteínas totais foi feita em duas etapas subsequentes que envolveram a extração em água seguida de extração com uma solução salina (Pinheiro *et al.*, 2005), obtendo-se no final duas frações proteicas, a solúvel em água e a salina. Na preparação da fração solúvel em água, amostras de tecido caloso liofilizado (cerca de 0,5 g) foram ressuspensas numa solução de inibidores de proteases (EDTA 1 mM, AEBSF³⁴ 0,5 mM, pepstatina 1 µM) em água desionizada (3 mL/g tecido fresco). Quando a extração foi feita a partir de material controlo foi adicionado 35 mM de NaCl à solução de inibidores de proteases, de modo a igualar a concentração salina à do tecido crescido na presença de sal. Após centrifugação a 10000 × g durante 15 min e a 4°C, o sedimento foi lavado por centrifugação com água e guardado a -20°C até à extração seguinte com solução salina. Por sua vez, o sobrenadante foi combinado com cinco volumes (v/v) de acetona fria e a precipitação proteica decorreu a -20°C durante 1 h. Depois de centrifugado (10000 × g, durante 15 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com acetona fria (metade do volume usado na precipitação anterior), deixando-se a repousar durante 1 h a -20°C. Seguiu-se nova centrifugação (10000 × g, 15 min, 4°C) e repetiu-se uma vez mais a lavagem do sedimento com acetona fria nas mesmas condições que a anterior. Após centrifugação, a fração proteica foi seca a 4°C e conservada a -20°C até ser utilizada.

Para preparar a fração salina, o sedimento derivado da extração com água foi ressuspenso em 12,5 mL de solução de NaCl 1,5 M contendo inibidores de proteases (EDTA 1 mM, AEBSF 0,5 mM, pepstatina 1 µM) e a suspensão foi centrifugada a 10000 × g durante 15 min, a 4°C. O sobrenadante recolhido foi dessalinizado em colunas de dessalinização 'ZebaTM Desalt Spin Columns' (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante, seguido da precipitação com cinco volumes de acetona fria, durante 1 h a -20°C. Após centrifugação a 10000 × g durante 15 min, a 4°C, descartou-se o sobrenadante e o sedimento obtido foi lavado duas vezes com acetona fria nas mesmas

³⁴AEBSF – Fluoreto de aminoetil benzenosulfonil

condições que as descritas para a fração solúvel. Por fim, o precipitado enriquecido em proteínas de ligação iônica foi seco a 4°C e guardado a -20°C até posterior utilização.

As frações proteicas mantidas a -20°C foram solubilizadas numa solução tampão composta por ureia 8 M, CHAPS 2% (p/v) e DTT 65 mM (1 h à temperatura ambiente). A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), modificado por Ramagli (1999). Esta modificação permite eliminar as interferências que os reagentes presentes em solução, como a ureia, podem provocar na ligação do corante ‘Coomassie G-250’ às proteínas. Para a quantificação propriamente dita, 10 µL de extrato previamente diluído foram combinados com 90 µL de HCl 0,1 N e misturados com 150 µL de reagente de Bradford (Bio-RAD) diluído na proporção 1:3. Decorridos 5 min, procedeu-se à leitura da absorvância a 595 nm. A concentração de proteína em cada amostra foi determinada a partir de uma reta padrão obtida a partir de soluções de BSA de concentração conhecida.

2.3.3.2. Primeira dimensão: focagem isoeletrica

A focagem isoeletrica (IEF)³⁵ consiste na migração das proteínas, num gradiente de pH, até que atingem o seu ponto isoeletrico (pI). Neste trabalho foram utilizadas tiras de gel de poliacrilamida desidratadas (IPG)³⁶ de 13 cm de comprimento, com um gradiente de pH não linear entre 3 e 10 (‘Immobiline™DryStrip pH 3-10 NL’, GE Healthcare). Para cada amostra, 25 µg de proteína foram diluídos num volume final de 250 µL composto de tampão de solubilização (ureia 8 M, CHAPS 2% e DTT 65 mM) e IPG a 0,5% (v/v). O tampão IPG é uma mistura comercial de anfólitos móveis (‘carrier ampholytes’) que têm como função aumentar a solubilidade da amostra e produzir uma maior condutividade ao longo do gradiente de pH durante a corrida da primeira dimensão. O tampão utilizado foi escolhido de acordo com a gama de pH em que a IEF foi efetuada, isto é, tampão IPG pH 3-10 NL (GE Healthcare). A focagem isoeletrica foi realizada no aparelho ‘Ettan™IPGphor Isoelectric Focusing System’ (Amersham Biosciences). Neste sistema, a entrada da amostra no gel ocorreu durante a re-hidratação das tiras, passo que foi seguido de imediato pela focagem isoeletrica. Assim, a programação do equipamento foi feita considerando o passo inicial de re-hidratação dos géis durante 12 h, seguindo-se a focagem que envolveu vários passos caracterizados pelo aumento gradual da voltagem até um valor

³⁵IEF – ‘IsoElectric Focusing’

³⁶IPG – ‘Immobilised pH Gradient’

elevado, de acordo com as condições apresentadas na Tabela 2.2. Durante a corrida, as amostras foram mantidas a 20°C e a corrente foi limitada a 50 µA por tira.

Tabela 2.2 – Programa usado na focagem isoeletrica de géis de 13 cm com gradiente de pH 3-10 NL em sistema IPGphor.

Etapas	Voltagem
Re-hidratação	30 V (360 V/h)
Passo 1	250 V (250 V/h)
Passo 2	500 V (750 V/h)
Passo 3	1000 V (1500 V/h)
Passo 4	2500 V (2500 V/h)
Passo 5	8000 V (3250 V/h)
Passo 6	8000 V (24000 V/h)

Terminado o programa de focagem, após a acumulação de 32610 V/h e decorridas cerca de 23 h, as tiras foram guardadas a -20°C até à segunda dimensão.

2.3.3.3. Segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

As tiras de IPG resultantes da focagem isoeletrica foram saturadas numa solução de equilíbrio constituída por Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), ureia 6 M, glicerol a 30% (v/v), SDS a 2% (p/v) e azul de bromofenol a 0,002% (v/v). A esta solução foi adicionado 50 mM de TCEP³⁷ e, numa primeira etapa, cada tira foi mergulhada em 5 mL da solução e mantida sob ligeira agitação, em tubos rolhados, durante 15 min à temperatura ambiente. Esta operação foi repetida numa segunda etapa, tendo-se juntado à solução de equilíbrio iodoacetamida (concentração final 135 mM).

A segunda dimensão, SDS-PAGE, foi realizada no sistema vertical da ‘Hoefer SE 600’ (Amersham Biosciences), usando-se para o efeito géis de poliacrilamida 12,5% de dimensões 140 × 160 × 1 mm, previamente preparados a partir de uma solução constituída por: acrilamida:bisacrilamida (29:1) 12,5%, Tris-HCl 375 mM (pH 8,8), SDS 0,1% (p/v), APS³⁸ 0,05% (p/v) e TEMED 0,05% (v/v). As tiras de gel IPG devidamente equilibradas foram mergulhadas em tampão de eletroforese a fim de remover o excesso de solução de equilíbrio e colocadas sobre os géis de SDS. Numa das extremidades dos géis foram

³⁷TCEP – Tris(2-carboxietil) fosfina

³⁸APS – Persulfato de amónio

aplicados 3 μ L de um marcador de pesos moleculares (10-250 kDa; Bio-RAD). Para fixar a tira IPG e monitorizar a eletroforese adicionou-se uma solução aquecida de agarose 0,5% (p/v) com azul de bromofenol 0,002% (v/v) preparada em tampão de elétrodo [Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), glicina 192 mM e SDS 0,1% (p/v)]. Este tampão foi utilizado no reservatório de cima da unidade eletroforética, tendo-se usado uma solução tampão de Tris-HCl 25 mM (pH 8,8) no reservatório inferior. Os géis foram submetidos a uma intensidade de corrente de 7,5 mA/gel até à entrada do azul de bromofenol no gel, passando depois para 30 mA/gel, a uma temperatura de 15°C.

2.3.3.4. Visualização e análise de imagem dos géis

Após a separação por SDS-PAGE, os polipéptidos nos géis das duas frações isoladas a partir de material controlo e adaptado ao sal foram visualizados por fluorescência, recorrendo ao corante 'LavaPurple' (Fluorotechnics). Os géis foram imersos numa solução fixadora [ácido cítrico 1% (p/v) e etanol 15% (v/v)] durante 1 h, à temperatura ambiente e com agitação constante, a que se seguiu a incubação em solução de coloração [tetraborato de sódio 100 mM (pH 10,5) e 'LavaPurple' concentrado 0,5% (v/v)] também durante 1 h. Após lavagem em solução de etanol 15% (v/v) e descoloração na solução fixadora (30 min), os géis foram digitalizados num analisador de imagens fluorescente (FLA-5100, FujiFilm), usando os filtros de excitação de 532 nm e de emissão de 610 nm através do programa 'Image Reader FLA-5000 Series' (FujiFilm). As imagens dos géis 2-D foram analisadas com o programa 'Progenesis SameSpots' (Nonlinear Dynamics) com o objetivo de determinar as cadeias polipeptídicas ('spots') presentes em cada gel e a sua abundância com base na quantificação do volume relativo (normalizado). Esta informação é útil para se comparar os níveis de expressão de proteínas entre as duas amostras em cada fração.

As imagens obtidas correspondentes a géis de amostras preparadas em quatro extrações independentes a partir de material colhido em alturas diferentes foram introduzidas no programa de análise, tendo-se seguido várias etapas até à deteção e seleção dos 'spots' a incluir na análise. Começou-se por definir em cada fração a imagem de referência, ou seja, escolheu-se o gel representativo do padrão proteico e com menor distorção, excluindo-se dessa imagem as áreas externas à zona dos 'spots' que poderiam interferir na análise. A partir do gel de referência, os restantes géis foram automaticamente alinhados, excluídos os 'spots' cujo volume normalizado era inferior a 150 dpi, bem como artefactos assinalados como 'spots'. Os 'spots' dos dois grupos de géis (controlo e adaptado a 150 mM NaCl)

foram comparados entre si quanto ao seu nível de expressão, ao perfil a três dimensões e à sua distribuição nos géis. Com base nesta informação, procedeu-se à seleção manual dos ‘spots’ proteicos, tendo em conta que apenas os ‘spots’ presentes nos géis de três replicados e com um volume igual ou superior a 150 dpi foram considerados para a análise estatística. A análise foi feita com recurso à ANOVA do programa ‘Progenesis SameSpots’ e ao teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov, tendo-se considerado para os dois testes o nível de significância $P < 0,05$. Apenas os ‘spots’ que apresentaram um poder de análise superior a 80% com um valor- $p < 0,05$ foram considerados como diferencialmente expressos, caso contrário os ‘spots’ eram considerados constitutivos. Por fim, o programa elaborou os mapas bidimensionais para as duas frações proteicas representativos dos ‘spots’ selecionados com a respetiva numeração. A estimativa dos valores de pI e das massas moleculares desses ‘spots’ foi determinada pelo ‘Progenesis SameSpots’.

2.3.3.5. Recolha de ‘spots’ e identificação de proteínas

Para recolher os ‘spots’ de interesse foi necessário recorrer à coloração dos géis bidimensionais com azul de ‘Coomassie G-250’. Contudo, dada a menor sensibilidade de coloração deste corante (limite de deteção 0,05-0,1 μg proteína/spot) comparativamente ao fluorescente (limite de deteção 1-2 ng/spot) (Lopez *et al.*, 2000), para a eletroforese bidimensional usaram-se 400 μg de cada fração proteica, que foram sujeitos à focagem isoeletrica e SDS-PAGE conforme descrito, respetivamente, em 2.3.3.2. e 2.3.3.3. No final, os polipéptidos foram corados numa solução composta por ‘Coomassie G-250’ a 1,1% (p/v) em metanol 34% (v/v), ácido fosfórico 2% (v/v) e sulfato de amónio 17% (p/v), após a fixação dos géis em metanol 50% (v/v) e ácido fosfórico 2% (v/v). A lavagem dos géis em água destilada permitiu visualizar os ‘spots’ azuis correspondentes aos polipéptidos. Os ‘spots’ assinalados como diferencialmente expressos foram cortados dos géis e guardados em tubos de 1,5 mL a -80°C até posterior análise.

Os ‘spots’ recolhidos foram analisados por espetrometria de massa³⁹ e, de acordo com a informação fornecida, numa primeira fase, os ‘spots’ foram descorados e lavados em bicarbonato de amónio 50 mM e acetonitrilo 100% (v/v), seguindo-se a digestão dos polipéptidos com tripsina, que resultou na produção de fragmentos peptídicos com diferentes massas moleculares. Os digestos tripticos foram extraídos do gel com

³⁹A identificação dos ‘spots’ proteicos foi realizada pelo Serviço de Proteómica do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP)

acetonitrilo 60% (v/v) e TFA⁴⁰ 0,1% (v/v) e a solução recolhida foi dessalinizada e concentrada em microcolunas ‘ZipTips’ (Millipore). Após secagem no ‘speed vac’, os péptidos foram solubilizados em acetonitrilo 60% (v/v) e TFA 0,1% (v/v) e misturados com a matriz constituída por ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico 1% (p/v) em acetonitrilo 60% (v/v) e TFA 0,1% (v/v). Aplicou-se a mistura sobre a placa de MALDI e os péptidos foram analisados no espetrómetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF⁴¹ (Applied Biosystems). O espectro de massas peptídico (‘Peptide mass fingerprint’, PMF) foi obtido em modo positivo e refletor com variações de massa entre 700-4000 m/z e cada espectro foi calibrado internamente usando os péptidos resultantes da autólise da tripsina. Selecionaram-se os picos peptídicos com maior relação sinal/ruído para serem fragmentados e sequenciados por espectrometria de massa (MS/MS). Os espectros resultantes das análises combinadas (PMF+MS/MS) foram processados pelo programa ‘GPS Explorer’ (Applied Biosystems) e os dados de massa de cada péptido e da sequência de aminoácidos foram utilizados para a identificação das proteínas, através da pesquisa nas bases de dados de proteínas ‘SwissProt’⁴² e ‘NCBI*nr*’⁴³ para as seleções taxonómicas ‘Other green plants’ e ‘All entries’, por intermédio do programa ‘MASCOT’ (Matrix Science). Para os ‘spots’ em que não se identificaram proteínas com significado estatístico pelas bases dados de proteínas acima referidas, procedeu-se à identificação pela base de dados de ESTs⁴⁴, Plants_EST, do ‘EMBL Nucleotide Sequence Database’⁴⁵. Os resultados foram avaliados tendo em consideração os valores de ‘protein score’ (superior a 60) e a correspondência entre a massa molecular e o ponto isoelétrico dos ‘spots’ e das proteínas identificadas na base de dados.

2.3.4. Avaliação genotípica através de marcadores RAPD

2.3.4.1. Extração e quantificação de DNA

Para a extração de DNA genómico de tecido caloso optou-se por utilizar o ‘kit’ disponível no mercado ‘AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit’ (Axygen Biosciences), com o objetivo de se obter um DNA de elevada pureza, não degradado e em

⁴⁰TFA – Ácido trifluoroacético

⁴¹MALDI-TOF/TOF – ‘Matrix-assisted laser desorption ionization - Time-of-flight/time-of-flight’

⁴²<http://www.uniprot.org/>

⁴³NCBI*nr* – National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

⁴⁴ESTs – ‘Expressed sequence tags’

⁴⁵<http://www.ebi.ac.uk/embl/>

quantidade suficiente para as reações de amplificação subsequentes. A partir de tecido caloso (100 mg) conservado a -80°C , procedeu-se à extração do DNA seguindo as instruções fornecidos pelo fabricante. A concentração e o grau de pureza do DNA extraído foram analisados no biofotómetro, enquanto que a possível degradação do DNA foi avaliada através de eletroforese horizontal realizada em gel de agarose 0,8% (p/v) corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A solução de DNA foi combinada com tampão de amostra⁴⁶ na proporção de 10:1, para de seguida, e juntamente com o marcador de DNA com fragmentos entre 100 e 10000 pares de bases (bp) ('GeneRuler™ DNA Ladder Mix' 1Kb, Fermentas), ser aplicada no gel. A eletroforese decorreu à temperatura ambiente, com uma voltagem de 60 V, em tampão TAE⁴⁷ composto por trizma-base 40 mM, ácido acético glacial 0,115% e $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 1 mM e, no final, a banda de DNA foi visualizada no gel exposto à radiação ultravioleta. O DNA extraído foi conservado a -80°C até à sua utilização.

2.3.4.2. Amplificação do DNA

Devido à sensibilidade da técnica RAPD às variáveis experimentais, a amplificação de sequências genómicas arbitrárias (RAPDs) de forma reprodutível só foi possível após as condições de PCR⁴⁸ estarem rigorosamente otimizadas. Para o efeito, foram testadas diferentes concentrações de DNA genómico e de Mg^{2+} , bem como do iniciador ('primer') arbitrário, para conhecer os valores adequados ao modelo em estudo, uma vez que estes fatores condicionam a reprodutibilidade dos resultados. No final, as condições de reação de PCR estabelecidas para um volume de 25 μL foram as seguintes: 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Mbi Fermentas) e respetivo tampão de reação [Tris-HCl 10 mM (pH 8,4), 50 mM KCl], 3 mM de MgCl_2 (Mbi Fermentas), 0,2 mM de cada um dos dNTP's⁴⁹ (Bioron), 7,5 pmoles do 'primer' e 30 ng de DNA genómico. Utilizaram-se 'primers' com uma sequência arbitrária de dez nucleótidos, designadamente os 'primers' dos 'kits' OPB 1-20 e OPE 1-20 (Operon Technologies, Inc.). Para cada situação em estudo, a reação de PCR foi sempre realizada em quadruplicado como forma de verificar a reprodutibilidade das condições de amplificação. Paralelamente, preparou-se o branco com todos os componentes da reação de PCR, substituindo-se o extrato de DNA por água desionizada e

⁴⁶Tampão de amostra – Ficoll 400 15% (p/v) e azul de bromofenol 0,25% (v/v)

⁴⁷TAE – Tris-acetato-EDTA

⁴⁸PCR – 'Polymerase Chain Reaction'

⁴⁹dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

esterilizada. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador 'MyCycler' (Bio-RAD) com a seguinte programação: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C durante 1 min, seguido de 45 ciclos a 92°C durante 1 min, 35°C durante 1 min, 72°C durante 2 min e, finalmente, um último ciclo a 72°C durante 10 min.

2.3.4.3. Eletroforese e detecção dos produtos de PCR

A separação dos produtos amplificados após as reações de PCR foi feita com recurso a eletroforese horizontal em géis de agarose 1,8% (p/v), preparados em tampão TAE e corados com brometo de etídio (1 µg/mL). 15 µL da mistura de reação foram combinados com 2,5 µL de tampão de amostra, para serem aplicados 15 µL em cada poço do gel. Marcadores de tamanho molecular conhecido ('GeneRulerTMDNA Ladder Mix' 1Kb, Fermentas) foram adicionados nas extremidades do gel para se determinar o tamanho dos fragmentos gerados pela técnica RAPD. A eletroforese foi realizada em tampão TAE sob uma diferença de potencial constante de 80 V. A visualização dos produtos de PCR foi possível após a exposição dos géis à radiação ultravioleta.

As imagens dos géis foram utilizadas para a análise dos padrões eletroforéticos dos produtos amplificados, pelo que se procedeu ao seu registo recorrendo ao equipamento 'Typhoon'. Os polimorfismos foram detetados através da presença/ausência do produto amplificado, com base na análise visual e recorrendo ao programa de análise de imagem 'Quantity One' (Bio-RAD). De entre os 'primers' testados, aqueles que geraram bandas polimórficas foram selecionados e as reações de amplificação foram repetidas, pelo menos três vezes, com DNA extraído em alturas diferentes. Só foram consideradas como sendo bandas polimórficas, isto é, marcadores RAPD, as bandas que se mostraram reproduzíveis nos diferentes ensaios realizados. O tamanho molecular de cada banda polimórfica foi estimado por comparação com as bandas dos marcadores moleculares através do programa 'Quantity One'.

3. Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1. Estudos em tecido caloso adaptado a 150 mM NaCl e sujeito a choque salino

3.1.1. Efeitos da salinidade no crescimento e nos teores hídrico e iônico

Pela análise da Tabela 3.1 infere-se que o crescimento do tecido caloso foi afetado negativamente pela salinidade. Apesar do tecido adaptado ser capaz de crescer na presença de 150 mM de NaCl e de mostrar um aspeto morfológico idêntico ao do controlo (Figura 3.1), a taxa de crescimento surgiu reduzida em 64% relativamente à do tecido controlo. Contudo, a redução foi mais acentuada (77%) quando o tecido controlo foi transferido diretamente para meio de cultura contendo 150 mM de NaCl.

Condições de cultura	Crescimento (%)	Teor hídrico (%)
Controlo	232,22 ± 8,17 ^a	97,82 ± 0,05 ^a
150 mM	82,71 ± 4,48 ^b	96,15 ± 0,14 ^b
Choque salino	53,84 ± 8,04 ^c	95,40 ± 0,03 ^c
150 → 0 mM	254,33 ± 11,39 ^a	97,87 ± 0,06 ^a

Tabela 3.1 – Crescimento e teor de água do tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e do tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150 → 0 mM). Valores expressos como médias ± E.P. (n=10). Em cada coluna os valores assinalados com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

O tratamento de choque com NaCl revelou-se mais prejudicial na medida em que o crescimento do tecido caloso foi inferior (cerca de 35%) ao do tecido adaptado, além de desenvolver áreas cloróticas onde eram visíveis pequenos aglomerados celulares necrosados, acompanhadas pelo escurecimento do meio de cultura em torno do tecido e pelo aumento da friabilidade deste, que contrastava com o aspecto mais compacto e granuloso do tecido adaptado, que mantinha cor verde (Figura 3.1). Estas observações permitiram concluir que a linha celular estabelecida para o estudo presente é tolerante à concentração salina de 150 mM, embora o crescimento fosse diminuído, mas que recuperou para o valor médio do da situação controlo após ter sido subcultivada em meio sem sal durante 28 dias (Tabela 3.1 e Figura 3.2).

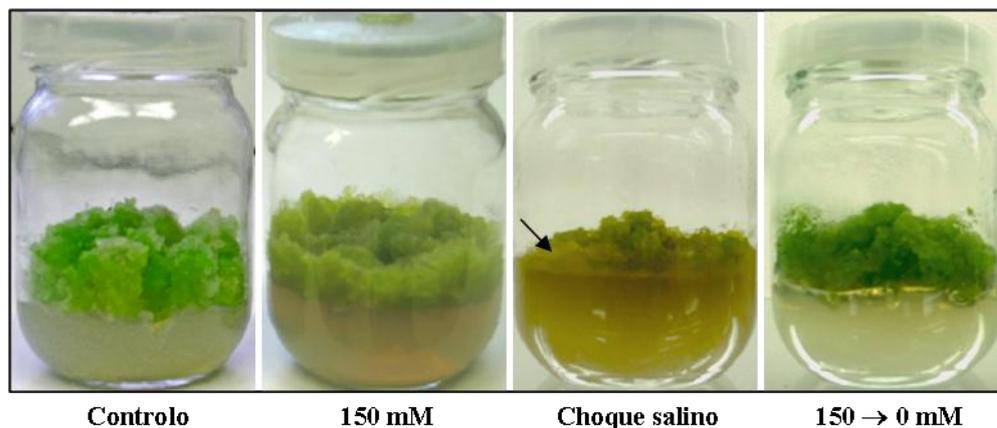


Figura 3.1 – Imagens das culturas de tecido caloso utilizadas neste estudo: tecido controlo crescido na ausência de NaCl; adaptado à presença de 150 mM de NaCl no meio de cultura (150 mM); tecido controlo sujeito a tratamento de choque com 150 mM de NaCl ao fim de 28 dias (choque salino), onde está assinalada uma área clorótica característica deste tecido; linha adaptada a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150 → 0 mM).

Na Tabela 3.1 e Figura 3.2 encontram-se também assinalados os valores médios do teor de água acumulado no tecido caloso relativo às situações em estudo. As linhas celulares expostas ao sal apresentavam uma menor quantidade de água do que as mantidas na ausência de NaCl, embora tenha sido nas células sujeitas a choque salino que se registou o menor conteúdo hídrico. Comparando com a situação controlo, registaram-se perdas da ordem de 2 e 3% para os calos adaptado e exposto a tratamento de choque com NaCl, respetivamente. Dada a consistência friável e o elevado teor hídrico do tecido caloso, verifica-se que a salinidade induziu perdas de água que se revelaram significativas, e os resultados indicam que a forma como o stress é imposto parece também condicionar essa resposta, na medida em que a diferença registada no teor de água de apenas 1% entre o tecido adaptado e o subitamente exposto a 150 mM veio a revelar-se como sendo significativa.

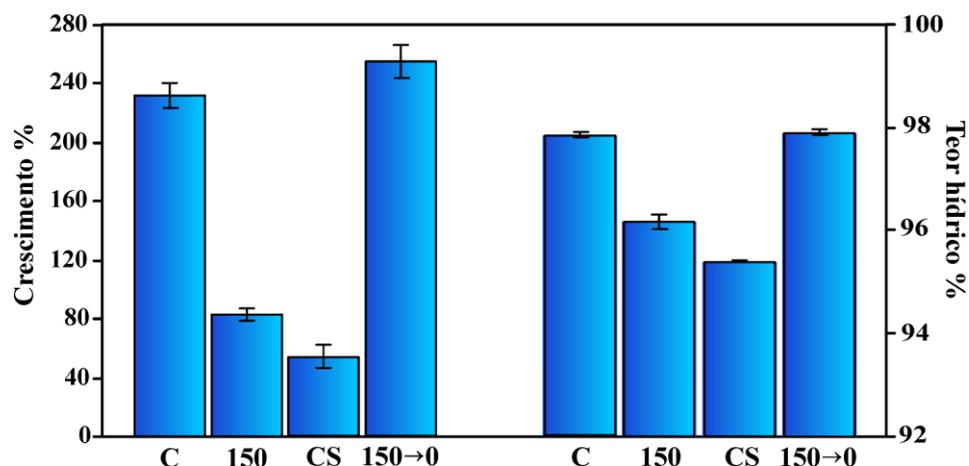


Figura 3.2 – Variação do crescimento e teor de água do tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e do tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0). Valores expressos como médias \pm E.P.

A quantificação dos iões inorgânicos acumulados no tecido caloso mostrou que os níveis de sódio e de cloreto aumentaram nos calos expostos a NaCl, decrescendo os de potássio e cálcio. Na Tabela 3.2 e Figura 3.3 é possível constatar que os conteúdos de Na^+ e Cl^- foram consideravelmente superiores no tecido caloso adaptado, que acumulou 16 vezes mais sódio e 9 vezes mais cloreto do que o controlo. O tratamento com 150 mM de NaCl levou também a aumentos significativos no teor dos dois iões, como seria de esperar, mas os níveis quantificados mantiveram-se inferiores aos do tecido adaptado (cerca de 18% para Na^+ e 34% para Cl^-). Em contrapartida, houve um decréscimo considerável no conteúdo dos iões quando o tecido adaptado foi transferido para meio de cultura sem sal, apesar dos níveis detetados serem muito superiores aos do controlo (Tabela 3.2).

De forma contrária, as concentrações de K^+ e Ca^{2+} decresceram significativamente com a salinidade e mesmo na situação em que o tecido adaptado passou para meio com 0 mM de NaCl (Figura 3.3). Nesta situação, os níveis de K^+ não sofreram variação com a mudança do tecido em relação aos observados quando o tecido permaneceu na presença de NaCl, surgindo o cálcio aumentado em cerca de 75%. Apesar da diferença na quantidade dos dois catiões entre o tecido caloso adaptado e controlo, em que o K^+ diminuiu no primeiro cerca de 28% e o Ca^{2+} 122%, a diferença em relação ao controlo tornou-se ainda maior após o tratamento do tecido não adaptado com 150 mM de NaCl, uma vez que os decréscimos foram de quase 100% para o K^+ e de 158% para o Ca^{2+} (Tabela 3.2). Na sequência da variação dos níveis de sódio e potássio pela salinidade, a razão K^+/Na^+ mais baixa foi encontrada no tecido exposto a choque salino (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Conteúdo dos íons sódio, potássio, cálcio e cloreto acumulados no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.

Condições de cultura	Teor iónico (mg/g p.s.)				K ⁺ /Na ⁺
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	
Controlo	6,87 ± 0,24 ^a	60,25 ± 2,14 ^a	4,12 ± 0,18 ^a	18,69 ± 0,10 ^a	8,81 ^a
150 mM	111,25 ± 2,16 ^b	47,02 ± 1,32 ^b	1,85 ± 0,06 ^b	169,53 ± 6,47 ^b	0,43 ^b
Choque salino	90,83 ± 2,20 ^c	30,25 ± 0,48 ^c	1,60 ± 0,06 ^c	112,40 ± 12,34 ^c	0,33 ^c
150 → 0 mM	31,67 ± 0,44 ^d	48,17 ± 1,17 ^b	3,23 ± 0,13 ^d	55,23 ± 1,93 ^d	1,52 ^d

Valores expressos como médias ± E.P. (n=3). Em cada coluna os valores assinalados com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

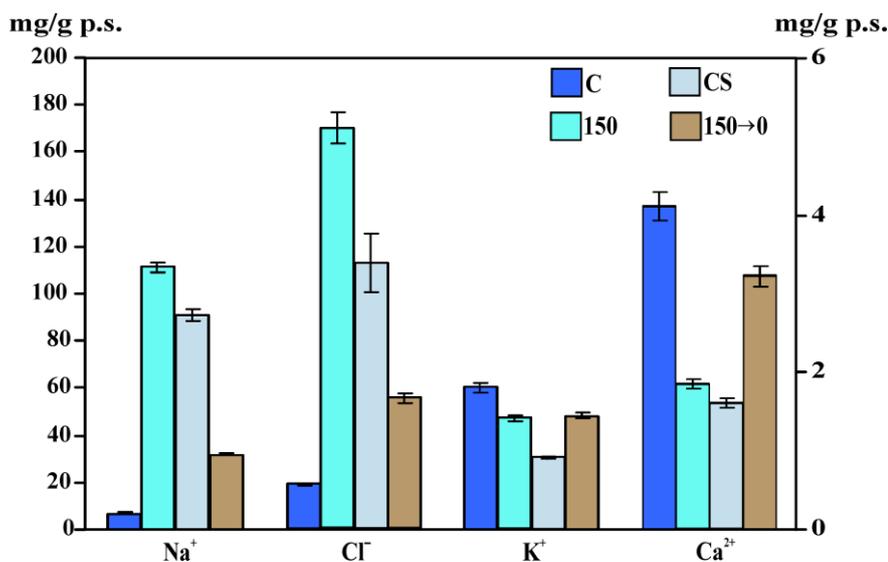


Figura 3.3 – Variação dos níveis de sódio, potássio, cálcio e cloreto acumulados no tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0). Valores expressos como médias ± E.P.

Nas culturas de tecido caloso expostas a condições salinas assistiu-se a uma redução significativa do crescimento, confirmando-se que é um dos principais processos a ser afetado pela salinidade (Parida & Das, 2005). Com efeito, a resposta mais comum nas plantas em condições salinas consiste na diminuição do crescimento e são muitas as referências na literatura que descrevem esse facto (Gossett *et al.*, 1994a; Santos &

Caldeira, 1999; Munns, 2002; Fidalgo *et al.*, 2004; Boughanmi *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2006; Noreen & Ashraf, 2009; Panda & Khan, 2009; Mhadhbi *et al.*, 2011). Para Zhu (2001) o crescimento lento é uma característica importante para a sobrevivência das plantas em stress salino, e ao que parece o grau de tolerância salina está inversamente relacionado com a taxa de crescimento. De tal modo, que este tem sido um critério largamente adotado na comparação da resistência à salinidade entre plantas. Inclusive foi com base no crescimento que Greenway & Munns (1980) avaliaram o comportamento de diferentes espécies em ambientes salinos e as classificaram em halófitas ou glicófitas. Este último grupo que engloba a maioria das plantas com interesse agrícola caracteriza-se pelo crescimento das plantas ser claramente reduzido pela salinidade, mesmo a baixas concentrações de sal (Munns & Tester, 2008). No entanto, verifica-se uma variabilidade na tolerância à salinidade entre genótipos de diversas culturas evidenciada por diferentes taxas de crescimento (Shannon & Grieve, 1999). Este facto levou vários autores a correlacionarem o aumento da tolerância à salinidade com a menor redução no crescimento dos órgãos aéreos (Rashid *et al.*, 1999; Karrenberg *et al.*, 2006; De Costa *et al.*, 2007; Goreta *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007).

Do mesmo modo que no sistema *in vivo*, o crescimento surge diminuído nas culturas de tecido caloso e de células em suspensão expostas a meios salinos, verificando-se em alguns modelos experimentais que o crescimento está correlacionado negativamente com o aumento de NaCl no meio. Assim sucedeu no tecido caloso de girassol e nas culturas de tecido caloso derivadas de duas espécies de tomateiro (*L. esculentum* e *L. pennellii*) e de *Acanthophyllum* (*A. glandulosum* e *A. sordidum*) diretamente expostas a concentrações crescentes de NaCl (Perez-Alfocea *et al.*, 1994; Cano *et al.*, 1996; Santos & Caldeira, 1999; Rus *et al.*, 1999; Niknam *et al.*, 2011). Baseados na redução da taxa de crescimento do tecido caloso pela salinidade, Rus *et al.* (1999) estabeleceram o grau de tolerância das espécies de tomateiro testadas. Similarmente, o crescimento do tecido caloso da cultivar de algodoeiro mais tolerante surgiu menos afetado pela elevada salinidade do meio de cultura do que o tecido da cultivar classificada como sensível (Gossett *et al.*, 1994b). Na linha celular tolerante de batateira usada neste estudo foi também visível o efeito negativo da salinidade no crescimento, que foi cerca de 2,8 vezes inferior ao do controlo, à semelhança do ocorrido em culturas de tecido caloso de outras espécies (*P. sativum*, *C. limon* e *L. pennellii*) adaptadas à salinidade (Olmos & Hellín, 1996; Cano *et al.*, 1996; Piqueras *et al.*, 1996; Rus *et al.*, 1999). Por exemplo, a linha celular selecionada de *C. limon* era capaz de

crescer na presença de 170 mM de NaCl, embora o crescimento fosse cinco vezes menor ao das células controle, enquanto que na linha de *P. sativum* o crescimento era diminuído em 2,9 vezes pela concentração de 85,5 mM de NaCl (Olmos & Hellín, 1996; Piqueras *et al.*, 1996). Em contraste, nas linhas tolerantes de algodoeiro e de girassol a taxa de crescimento não foi afetada pelos elevados níveis de sal (150 e 175 mM) no meio de cultura (Gossett *et al.*, 1996; Davenport *et al.*, 2003). Santos *et al.* (2000) verificaram que as culturas de tecido caloso de girassol adaptadas a 200 e 300 mM de NaCl atingiam as maiores taxas de crescimento na presença de 50 e 100 mM de NaCl, respetivamente, do que na ausência do sal. Os resultados contraditórios poderão ser consequência do facto do algodoeiro e do girassol serem das plantas agrícolas mais tolerantes à salinidade (Katerji *et al.*, 2000); já a batateira é suscetível à elevada salinidade, verificando-se que o crescimento é diminuído em cerca de 50% por concentrações salinas da ordem dos 50 mM e para concentrações mais elevadas a área foliar surge diminuída, acompanhada da senescência e abscisão precoce das folhas, bem como a produção de tubérculos é reduzida (Levy *et al.*, 1988; Levy, 1992; Heuer & Nadler, 1995; Fidalgo *et al.*, 2004; Teixeira & Pereira, 2007). Segundo Hmida-Sayari *et al.* (2005), uma concentração de 150 mM de NaCl é responsável pela completa inibição do crescimento da batateira, além de impedir o enraizamento das plantas e de promover o desenvolvimento de necroses nas folhas e a morte celular. Essa concentração salina mostrou não ser letal para o tecido caloso de batateira, nem inibidora do crescimento. No entanto, há que salientar que o comportamento das culturas *in vitro* nem sempre reflete com exatidão o grau de tolerância das plantas intactas, como parece suceder em algumas espécies como é o caso do girassol em que as culturas de tecido caloso apresentam uma tolerância salina superior à das plantas (Santos *et al.*, 2000). Apesar da linha celular adaptada a 150 mM de NaCl apresentar um ritmo de crescimento claramente inferior ao do tecido cultivado na ausência de sal, foi possível manter a sua cultura por um longo período de tempo com um aspecto compacto e de cor verde (Figura 3.1). Estas observações indiciam que a linha de tecido caloso selecionada adquiriu um fenótipo de tolerância ao sal.

Ainda que o tecido caloso de batateira e de outras espécies como o algodoeiro e girassol sejam capazes de crescer em meios de elevada salinidade, verifica-se que o crescimento foi drasticamente reduzido quando as culturas não adaptadas a NaCl (controle) foram expostas diretamente às concentrações salinas para as quais os calos foram selecionados (Gossett *et al.*, 1996; Davenport *et al.*, 2003). De um modo geral, tem-se verificado que os calos

adaptados a NaCl quando são obtidos através da exposição gradual a concentrações crescentes de sal adquirem uma grande capacidade para crescer em concentrações extremas de NaCl, que são muitas vezes inibidoras do crescimento ou mesmo letais se o tecido caloso for exposto de forma direta a essas concentrações (Watad *et al.*, 1983; Olmos & Hellín, 1996; Piqueras *et al.*, 1996; Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2000; Kerkeb *et al.*, 2001; Miki *et al.*, 2001). A exposição gradual ao fator de stress cada vez mais intenso permite às células os ajustamentos estruturais e bioquímicos que são determinantes para o equilíbrio compatível com a ‘nova’ condição de stress, tal como Leone *et al.* (1994a,b) demonstraram ao compararem o comportamento de células em suspensão de batateira adaptadas a um baixo potencial hídrico com o das células abruptamente expostas à mesma intensidade de stress.

A redução drástica do crescimento observada no tecido caloso sujeito a choque salino é frequente na batateira e na generalidade das plantas que são de repente confrontadas com o excesso de sal no seu meio (Bartels & Sunkar, 2005; Teixeira & Pereira, 2007). No modelo bifásico proposto por Munns & Tester (2008) este tipo de resposta caracteriza o efeito osmótico da salinidade que reduz a disponibilidade de água e é responsável pela rápida inibição do crescimento dos órgãos aéreos, embora as raízes possam continuar a alongar-se (Munns, 2002). A paragem do crescimento pode ser encarada como uma condição necessária para a planta alcançar a tolerância ao sal, pois constitui a forma de salvaguardar o fornecimento de energia para o restabelecimento do equilíbrio osmótico e regulação do equilíbrio iónico e para a prevenção dos danos que resultam dos efeitos da salinidade, acrescida da vantagem de contribuir para a retenção de água nos tecidos (Zhu, 2002, 2003; Bartels & Sunkar, 2005). Chaves *et al.* (2002, 2003) admitiram que a inibição do crescimento caulinar em situações de défice hídrico possibilita que os fotoassimilados sejam canalizados para a biossíntese de solutos com funções protetoras e, eventualmente, para o ajustamento osmótico, beneficiando também o crescimento da raiz. Recorrendo ao modelo de células em suspensão de *Populus euphratica*, Silva *et al.* (2010) detetaram que o crescimento era inibido a elevada salinidade, mas a viabilidade das células não era alterada pelo facto da fonte de energia disponibilizada ser redirecionada para a manutenção da homeostasia iónica através da ativação das bombas de protões e do sistema antiporte das membranas plasmática e vacuolar, em vez do crescimento e proliferação celular. No final, a capacidade para retomar o crescimento na presença do fator de stress, embora a um ritmo reduzido, é indicativa da recuperação da atividade celular normal, um fenómeno descrito

nas plantas e culturas de células tolerantes ao sal e que pode ser também estendido à nossa linha adaptada de batateira (Gossett *et al.*, 1996; Munns, 2002; Xiong & Zhu, 2002; Davenport *et al.*, 2003; Yazici *et al.*, 2007; Roychoudhury *et al.*, 2008).

Uma das causas vulgarmente referidas para a diminuição do crescimento nas plantas salinizadas consiste na reduzida turgescência das células resultante da perda de água que inibe a expansão e divisão celulares (Yeo *et al.*, 1991; Passioura & Munns, 2000; Manchanda & Garg, 2008). A perda de água é uma das primeiras respostas das plantas cultivadas em meios salinos (Fidalgo *et al.*, 2004; Boughanmi *et al.*, 2005; Sengupta & Majumder, 2010), que é também observada a nível celular. Assim aconteceu nos calos de batateira expostos a NaCl que tiveram perdas na ordem dos 2-3%. Estes valores podem ser considerados baixos comparativamente às perdas registadas nas plantas, mas tendo em conta o elevado teor hídrico do tecido caloso essas perdas vieram a revelar-se significativas. Além de que o tecido caloso adaptado pareceu estar mais apto para reter água durante o tempo de cultura do que o tecido sujeito ao tratamento de choque com NaCl. Ao nível da planta, a tolerância ao sal tem sido relacionada com a capacidade para manter a suculência e o teor hídrico em resposta à salinidade (Karrenberg *et al.*, 2006; De Costa *et al.*, 2007; Ellouzi *et al.*, 2011). Deve, contudo, ter-se em conta que a perda de água observada a nível celular pode ser devido à pressão osmótica mais elevada do meio de cultura relativamente à do meio envolvente da planta, dada a grande abundância de solutos no primeiro (Dracup, 1991). Embora a evidência do teor hídrico variar menos nas linhas de tecido caloso mais tolerantes ao stress salino do que nas sensíveis, leva a supor que a tolerância salina está relacionada com a capacidade do tecido para resistir à desidratação (Rus *et al.*, 1999; Niknam *et al.*, 2011). De facto, a diminuição no teor de água registada nas linhas celulares de *N. tabacum* adaptadas a NaCl ou na linha tolerante de tomateiro não comprometeu a turgescência das células, dada a capacidade destas para se ajustarem osmoticamente (Binzel *et al.*, 1985, 1987). Inclusive, as células adaptadas de tabaco eram suficientemente túrgidas para manterem a expansão celular tal como as não adaptadas (Binzel *et al.*, 1985). As alterações no teor de água podem levar às dimensões reduzidas que caracterizam as células crescidas em ambientes salinos, embora se saiba que fatores ligados à parede celular podem também regular o crescimento celular (Binzel *et al.*, 1985, 1988; Neumann *et al.*, 1988; Cosgrove, 1997; Gu *et al.*, 2004; Bartels & Sunkar, 2005; Silva *et al.*, 2010). Apesar do efeito do stress salino na regulação da expansão celular não estar ainda devidamente esclarecido, é possível que a salinidade por interferir na

concentração das fitohormonas que estão envolvidas na regulação do alongamento celular venha a inibir o processo (Zhu, 2001; Bartels & Sunkar, 2005). Pelo menos a relação do stress salino com a divisão celular assenta na possibilidade do ABA acumulado induzir a expressão do inibidor ICK1 que pode bloquear a divisão celular ao reduzir a atividade das CDKs, conhecidas por participarem no ciclo celular (Xiong & Zhu, 2002).

Neste estudo confirmou-se o efeito da salinidade na acumulação dos iões Na^+ e Cl^- e na redução dos níveis de K^+ e Ca^{2+} no tecido caloso. Respostas similares têm sido descritas em plantas expostas a diferentes concentrações salinas como a oliveira, *P. euphratica*, *M. sativa*, *A. thaliana*, girassol e batateira (Chen *et al.*, 2001; Boughanmi *et al.*, 2005; Ottow *et al.*, 2005; Attia *et al.*, 2008; Goreta *et al.*, 2007; Aghaei *et al.*, 2009; David *et al.*, 2010), e também no sistema de cultura *in vitro* onde se regista uma correlação positiva entre o aumento de salinidade no meio e a quantidade de Na^+ e Cl^- acumulada nas células (Ben-Hayyim *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2004; Longstreth *et al.*, 2004; Elkahoui *et al.*, 2005). Se em algumas espécies eram visíveis os efeitos da absorção excessiva de Na^+ através da senescência prematura das folhas e aparecimento de cloroses, e nos casos mais graves de necroses, que se refletiam na redução severa do crescimento, noutras, como acontecia em algumas halófitas, o aumento do sódio nos órgãos aéreos parecia beneficiar o crescimento (Chen *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Munns & James, 2003; Boughanmi *et al.*, 2005; Panda & Khan, 2009; Ellouzi *et al.*, 2011).

Independentemente da diferente tolerância salina entre glicófitas e halófitas, a toxicidade provocada pela acumulação excessiva do Na^+ e Cl^- no citosol é causa frequente de sérias alterações no metabolismo celular que afetam o crescimento e a própria sobrevivência da célula (Mahajan *et al.*, 2008). O Na^+ quando acumulado em níveis elevados (estima-se que acima de 100 mM) danifica a integridade da membrana celular e incrementa a formação das EROs, interfere com a atividade de muitas enzimas essenciais e com a síntese proteica (Hasegawa *et al.*, 2000). Ao que parece as elevadas concentrações intracelulares de Na^+ alteram o equilíbrio hidrofóbico e eletrostático entre as forças que mantêm a estrutura proteica, inibindo assim a atividade da maioria das enzimas (Bartels & Sunkar, 2005). Compreende-se que as enzimas citosólicas das halófitas sejam tão sensíveis ao Na^+ quanto as das glicófitas (Blumwald *et al.*, 2000), em contraste com as enzimas localizadas no apoplasto cuja atividade *in vitro* é indiferente às elevadas concentrações de NaCl, quer sejam de espécies halófitas ou glicófitas (Thiyagarajah *et al.*, 1996). Nesta perspetiva, é frequente associar o conceito de tolerância salina à capacidade de evitar a acumulação do

Na⁺ no citosol (Munns & Tester, 2008). A exclusão do Na⁺ e Cl⁻ é o mecanismo que tem sido frequentemente referido por ser usado em muitas glicófitas para tolerarem o excesso de NaCl. A variabilidade genética intrínseca a cada espécie levou a considerar as plantas tolerantes como sendo capazes de excluírem o Na⁺ e Cl⁻ dos seus órgãos aéreos, mantendo assim elevada a relação K⁺/Na⁺ nos tecidos, contrariamente às sensíveis que acumulam os iões (Munns *et al.*, 2003; Munns & James, 2003; Teakle *et al.*, 2007; Teakle & Tyerman, 2010). Contudo, esta relação entre a tolerância e a baixa acumulação de Na⁺ e Cl⁻ não se aplica às espécies halófitas, que utilizam preferencialmente os iões como osmólitos, e mesmo a certas glicófitas que mantêm a turgescência celular através da acumulação de Na⁺ e Cl⁻ nos vacúolos das células (Tester & Davenport, 2003). Por exemplo, as linhas celulares isoladas da planta do tabaco adaptaram-se à salinidade de forma idêntica à das halófitas, utilizando o Na⁺ e Cl⁻ como principais solutos no ajustamento osmótico (Binzel *et al.*, 1987, 1988). Em resposta a elevadas concentrações de NaCl, o Na⁺ e o Cl⁻ foram os iões que tiveram maior incremento nas culturas de tecido caloso de girassol adaptadas a elevada salinidade, contribuindo para o ajustamento osmótico (Santos *et al.*, 2000). De modo análogo, a salinidade aumentou as concentrações de Na⁺ e Cl⁻ nas linhas celulares tolerantes obtidas de plantas como a ervilheira, arroz ou tomateiro, ocorrendo o mesmo nas culturas de tecido caloso de *L. pennellii* e *A. halimus*, duas espécies adaptadas ao sal (Olmos & Hellín, 1996; Bajji *et al.*, 1998; Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999; Rus *et al.*, 1999; Basu *et al.*, 2002). Resultado idêntico foi observado por nós na linha de tecido caloso adaptada que acumulou mais Na⁺ e Cl⁻ do que a linha sujeita a choque salino. Parece assim existir uma relação positiva entre a tolerância e a acumulação de Na⁺ e Cl⁻, possivelmente explicada pela contribuição destes iões para o ajustamento osmótico. De facto, Ottow *et al.* (2005) verificaram que o ajustamento osmótico em *P. euphratica* foi conseguido sobretudo pela acumulação do sódio, sendo menor o contributo dado pelos solutos orgânicos. A nível celular foi demonstrado que a tolerância salina de *P. euphratica* esteve relacionada com a capacidade para se adaptar ao stress osmótico através da acumulação e compartimentação dos iões Na⁺ e Cl⁻ no vacúolo (Gu *et al.*, 2004). No entanto, convém salientar que o grau de acumulação dos iões pode ser também condicionado pelo tempo de exposição do tecido ao sal, que foi necessariamente superior na linha adaptada, e que terá levado a que esta linha tivesse mais Na⁺ e Cl⁻ quando foi subcultivada em meio sem sal do que o controlo. Sobre este assunto, Basu *et al.* (2002) referiram que a acumulação de Na⁺ no tecido caloso é um processo lento e contínuo no tempo, para justificar o facto do tecido adaptado

derivado da planta do arroz mantido na presença de 128 mM NaCl durante tempo prolongado acumular mais sódio do que quando foi sujeito a um tratamento de choque de curta duração com elevadas concentrações de NaCl. Mesmo assim, os autores consideraram que o Na⁺ acumulado contribuiu para o ajustamento osmótico das células. Deste modo, associar a exclusão do Na⁺ e Cl⁻ à tolerância salina deve ser encarada com alguma precaução. Por outro lado, há trabalhos que vieram mostrar que a sensibilidade ao sal de determinadas plantas não depende do teor de sódio acumulado, mas da incapacidade para absorverem e reterem o potássio em meios salinos e manterem uma elevada relação K⁺/Na⁺ (Liu & Zhu, 1997; Zhu *et al.*, 1998; Borsani *et al.*, 2001; Widodo *et al.*, 2009; Shabala *et al.*, 2010).

Uma das consequências da salinidade é causada pelo impacto negativo do excesso de Na⁺ na aquisição e disponibilidade de vários nutrientes essenciais (Niu *et al.*, 1995). Muitos dos desequilíbrios nutricionais induzidos em meios salinos estão associados sobretudo com a deficiência do K⁺ e do Ca²⁺ (Kinraide, 1999; Maathuis, 2006). Tendo em conta o papel do potássio na célula em processos como a fotossíntese, expansão celular, síntese proteica e de ATP, na ativação de múltiplas enzimas e estabilização de proteínas, e no transporte de açúcares, compreende-se que a toxicidade do Na⁺ resulte em grande parte da redução do conteúdo de K⁺ (Zhu *et al.*, 1998; Britto & Kronzucker, 2008). Por este motivo é frequente recorrer-se à adição suplementar de potássio com vista a minimizar os efeitos deletérios do excesso de NaCl, pois acredita-se que o estado nutricional das plantas em potássio é determinante para a sua sobrevivência em ambientes salinos (Maathuis & Amtmann, 1999; Kaya *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005, 2007; Kronzucker *et al.*, 2006). Vários exemplos foram apresentados por Cakmak (2005) que demonstram a importância do potássio na redução do impacto causado por diversos fatores de stress abiótico na produção agrícola, incluindo a salinidade.

As semelhanças físico-químicas entre os dois catiões leva a que o Na⁺ em excesso concorra pelos locais de ligação do K⁺, nomeadamente das proteínas envolvidas na aquisição deste macronutriente, fazendo com que a relação K⁺/Na⁺ citosólica diminua (Shabala & Cuin, 2008). Embora as células vegetais disponham de transportadores de elevada seletividade para o K⁺ (HKTs), estes podem mediar o influxo do Na⁺ quando este elemento está presente em elevadas concentrações (Rodríguez-Navarro & Rubio, 2006). Provavelmente foi o que sucedeu nos calos expostos a 150 mM de NaCl, atendendo aos elevados níveis de Na⁺ e à baixa relação K⁺/Na⁺ encontrada neste material

comparativamente ao tecido na ausência de sal. Contudo, esta relação foi superior no tecido caloso adaptado do que no sujeito ao tratamento de choque, apesar do primeiro ter acumulado mais Na^+ e Cl^- . De facto, o conteúdo de K^+ foi superior no tecido adaptado do que no exposto diretamente a NaCl e, curiosamente, não foi alterado pela transferência do tecido para meio sem sal, o que sugere que as células adaptadas foram capazes de reter o potássio, importante na adaptação ao stress, nomeadamente na osmoregulação e na ativação dos mecanismos de compartimentação do Na^+ no vacúolo (Lebaudy *et al.*, 2007; Mahajan *et al.*, 2008).

A capacidade das células vegetais para preservarem o K^+ citosólico num ambiente salino tem sido apontada como uma das características determinantes da tolerância à salinidade (Ben-Hayyim *et al.*, 1985; Carden *et al.*, 2003; Smethurst *et al.*, 2008; Shabala *et al.*, 2005a, 2010). Com efeito, em situações de stress salino o conteúdo de K^+ é diminuído não só pela redução do influxo do nutriente para a célula, como também pelo efluxo induzido pelo excesso de sódio, contribuindo assim para baixar ainda mais a relação K^+/Na^+ nos tecidos (Britto *et al.*, 2010). É provável que o tratamento de choque com NaCl tenha levado as células de batateira a perderem mais K^+ do que aquelas que estavam adaptadas ao sal, podendo explicar o menor valor K^+/Na^+ registado. O mecanismo subjacente a esta perda não está ainda perfeitamente definido, embora os trabalhos de Shabala (Shabala *et al.*, 2005a, 2006, 2007) proponham que o fenómeno baseia-se na atividade de vários canais iónicos em resposta a alterações do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática. Sobre este assunto alguns estudos apontam existir uma relação inversa entre a quantidade de K^+ perdida das células e a tolerância das plantas ao sal, o que faz com que o teor de K^+ retido possa ser um critério válido a usar no rastreio da tolerância salina (Shabala, 2003; Chen *et al.*, 2005; Cuin *et al.*, 2010). Mas dado que a capacidade das plantas tolerantes para reterem o macronutriente é determinada por vários fatores, e os estudos realizados são unânimes em mostrar que a retenção de K^+ é tão importante para a tolerância como é a exclusão ou a compartimentação intracelular do Na^+ , vários autores defendem que a relação K^+/Na^+ citosólica é mais importante para a tolerância do que a quantidade de sódio por si só (Maathuis & Amtmann, 1999; Tester & Davenport, 2003; Chen *et al.*, 2007a; Shabala & Cuin, 2008; Shabala *et al.*, 2010). No entanto, há uma certa tendência na literatura para usar a razão entre os teores de K^+ e de Na^+ quantificados nos tecidos expostos ao sal em substituição da relação citosólica. À semelhança de outros estudos (Rus *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Basu *et al.*, 2002; Goreta *et al.*, 2007; Widodo

et al., 2009; David *et al.*, 2010), neste trabalho é apresentada na Tabela 3.2 uma estimativa da relação entre o conteúdo dos dois íons no tecido caloso e não a relação K^+/Na^+ citosólica. A exclusão do Na^+ e a compartimentação vacuolar do Na^+ e Cl^- são estratégias usadas pela célula para evitar a citotoxicidade destes íons, logo é possível que grande parte do Na^+ quantificado no tecido caloso em condições salinas possa estar distribuído pelo apoplasto e vacúolo. Do mesmo modo, as alterações na concentração de K^+ provavelmente refletem o comportamento do catião no vacúolo. Enquanto que a concentração de K^+ no citosol é relativamente constante (próxima de 100 mM), no vacúolo os níveis são variáveis em função da sua disponibilidade no meio; situações limitantes como a salinidade levam a que a concentração vacuolar diminua, embora o K^+ possa ser substituído na sua função como osmólito pelo sódio (Walker *et al.*, 1996; Gierth & Mäser, 2007). No final, a homeostasia iónica no citosol e não no vacúolo é que condiciona a atividade metabólica da célula (Walker *et al.*, 1996; Zhu, 2003). A técnica que utilizamos não nos permite fazer este tipo de análise, ou seja, considerar a compartimentação intracelular dos dois catiões, o que é possível recorrendo, por exemplo, à microanálise por raios-X. De facto, nos vários trabalhos em que foi utilizada esta técnica ou outras que permitem a localização intracelular dos íons, os resultados confirmam que a maioria do Na^+ e do Cl^- acumulados pelas células crescidas na presença de NaCl estavam isolados no vacúolo, de tal modo que as concentrações no citosol ficavam abaixo de 100 mM (Storey *et al.*, 1983; Binzel *et al.*, 1988; Gu *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2010; Teakle & Tyerman, 2010). Uma estratégia diferente parece ser usada nas folhas de *P. euphratica* que asseguram a homeostasia iónica através da acumulação do Na^+ no apoplasto em vez do vacúolo (Ottow *et al.*, 2005).

O cálcio, tal como sucede com o potássio, é um dos elementos inorgânicos que é afetado negativamente pela salinidade, facto por nós confirmado, sendo a interação Na^+-Ca^{2+} provavelmente das mais conhecidas pela influência que tem em vários processos fisiológicos como o crescimento, a fotossíntese, o transporte de K^+ e, também, a tolerância ao stress salino (Bressan *et al.*, 1998; Cramer, 2002). A interação do Ca^{2+} com as pectinas da parede celular e os fosfolipídios da membrana confere-lhe uma importante função na manutenção da integridade destas estruturas celulares, mas que é fragilizada pelo excesso de Na^+ (Maathuis, 2006). O Ca^{2+} é deslocado dos seus locais de ligação levando ao aumento da permeabilidade da membrana, que resulta no influxo do Na^+ e na incapacidade das células para manterem o K^+ intracelular (Cramer *et al.*, 1985; Watad *et al.*, 1991). A maior redução dos níveis de Ca^{2+} ocorrida no tecido caloso submetido a choque salino

poderá dever-se a alterações na permeabilidade das membranas que afetaram a aquisição do nutriente e, eventualmente justificam que as perdas de K^+ tenham sido superiores às do tecido adaptado, atendendo aos baixos valores de K^+ registrados (Tabela 3.2).

A aplicação suplementar de cálcio permite contornar a toxicidade do Na^+ e aumentar a tolerância salina (Liu & Zhu, 1997, 1998; Bressan *et al.*, 1998; Kinraide, 1999; Shabala *et al.*, 2003). Estudos realizados demonstraram que em condições salinas o Ca^{2+} aumenta a seletividade dos sistemas transportadores para o K^+ em detrimento do Na^+ , bloqueando também a principal via de entrada do Na^+ na célula (NSCCs) (Shabala *et al.*, 2005a). Paralelamente, o efluxo de K^+ induzido pelo NaCl através dos KORCs e NSCCs pode ser impedido pelo Ca^{2+} ao bloquear estes canais (Shabala *et al.*, 2005b, 2006). O contributo adicional do Ca^{2+} para a homeostasia K^+/Na^+ é evidenciado pelo seu envolvimento como mensageiro secundário na via de sinalização SOS que culmina com a ativação do antiporte Na^+/H^+ responsável pela exclusão do Na^+ (Zhu, 2002, 2003). Os mutantes *sos3* de *A. thaliana* demonstram a importância do Ca^{2+} na sinalização do stress salino ao acumularem mais Na^+ e reterem menos K^+ do que as plantas do tipo selvagem, resultado da incapacidade para regular o antiportador SOS1 (Liu & Zhu, 1998; Zhu, 2003). Porém, a função de molécula sinal surge associada a um aumento transitório dos níveis de Ca^{2+} no citosol, necessário à ativação de uma série de componentes proteicos da via de transdução do sinal que regula a expressão de muitos genes relacionados com a tolerância ao stress (Mahajan *et al.*, 2008). Efetivamente, determinados estudos mostraram o aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} com a salinidade (Knight *et al.*, 1997; Liu & Zhu, 1998; Henriksson & Henriksson, 2005; Kader *et al.*, 2007), enquanto que noutros assistiu-se ao decréscimo do teor do ião (Cramer & Jones, 1996; Santos *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Ottow *et al.*, 2005; Attia *et al.*, 2008; Ellouzi *et al.*, 2011), o que está em concordância com os nossos resultados, mas que contrasta com a noção geral de que o stress salino e outros provocam o aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} (Knight & Knight, 2001). À partida, os resultados sugerem que as alterações no Ca^{2+} não são uniformes e variam com o modelo experimental e os órgãos analisados (Cramer & Jones, 1996). Rentel & Knight (2004) analisaram as alterações na concentração de Ca^{2+} ao longo do tempo em plântulas de *Arabidopsis* sujeitas a stress oxidativo e registaram a ocorrência de dois aumentos transitórios em momentos e órgãos diferentes, sendo o maior aumento detetado logo após o tratamento com H_2O_2 . Resultado idêntico foi obtido por Kader *et al.* (2007) que observaram em protoplastos o aumento do Ca^{2+} citosólico em duas fases, a primeira

caracterizada por um aumento logo a seguir à adição do NaCl, surgindo posteriormente o segundo aumento. Estes trabalhos mostram que o aumento do Ca^{2+} associado ao stress salino é rápido e temporário, bastando pequenas alterações na concentração do ião para a sinalização. Apesar da diminuição observada no tecido adaptado, é possível que durante o processo de seleção da linha celular tenha havido alterações na concentração de cálcio importantes na mediação do processo adaptativo, à semelhança do ocorrido em *P. euphratica*. De facto, em *P. euphratica* aclimatado a 400 mM de NaCl, Ottow *et al.* (2005) detetaram um aumento do Ca^{2+} após a primeira exposição a 25 mM, que veio a diminuir progressivamente com as exposições subsequentes a níveis crescentes de sal; os autores justificaram o decréscimo observado como a forma necessária para equilibrar a pressão osmótica causada pela excessiva acumulação de Na^+ nas células, o que demonstra a capacidade da planta para regular o equilíbrio osmótico.

Em termos gerais, os resultados apresentados evidenciam a influência da salinidade na redução do crescimento do tecido caloso, associada ao aumento do conteúdo de Na^+ e Cl^- e redução dos níveis de K^+ e Ca^{2+} . O facto do crescimento do tecido adaptado ter sido completamente restabelecido para o valor médio próximo ao do tecido controlo quando foi transferido para meio de cultura sem NaCl, sugere que a redução do crescimento em condições salinas não esteve ligada com a toxicidade pelo Na^+ e Cl^- ou à deficiência de K^+ e Ca^{2+} , embora o tecido tivesse mantido os níveis de Na^+ e Cl^- superiores aos do controlo e os de K^+ e Ca^{2+} inferiores, mas provavelmente com as alterações osmóticas induzidas pela salinidade. Com efeito, Backhausen *et al.* (2005) quando compararam o comportamento de batateiras na sequência de um tratamento salino e com PEG concluíram que as alterações osmóticas eram mais nocivas para as plantas do que os elementos Na^+ e Cl^- acumulados.

3.1.2. Efeitos da salinidade na peroxidação lipídica e teor de prolina

A peroxidação lipídica envolve um conjunto de reações em cadeia resultante da ação das EROs (O_2^- , OH^-), ou de outros radicais livres, sobre os lípidos insaturados das membranas celulares, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído, que podem ser detetados em amostras biológicas e utilizados para avaliar o grau de stress oxidativo (Halliwell & Chirico, 1993). Assim foi o nosso caso, em que se procedeu à análise da peroxidação lipídica no tecido caloso das várias situações em estudo através da quantificação do teor de malondialdeído (MDA).

O efeito da salinidade na formação de MDA no tecido caloso é mostrado na tabela Tabela 3.3 e representado na Figura 3.4. Os resultados referentes ao MDA e à prolina são apresentados numa base de peso seco, atendendo ao elevado teor hídrico que o tecido caloso apresenta e que diminui com a salinidade conforme foi visto atrás. No entanto, houve o cuidado de verificar se surgiam alterações no padrão de variação quando os resultados eram expressos em peso fresco. Conforme se pode ver, o nível mais elevado de MDA foi registado no tecido sujeito a tratamento de choque com 150 mM de NaCl, que teve um aumento de cerca de 7% relativamente ao valor quantificado na situação controlo. Já no tecido adaptado, a peroxidação lipídica não sofreu variação significativa com a salinidade, nem mesmo quando este foi temporariamente subcultivado na ausência de sal, embora tenha diminuído 12% em relação ao tecido na situação de choque.

Condições de cultura	MDA (nmol/g p.s.)	Prolina (mg/g p.s.)
Controlo	171,19 ± 10,36 ^a	4,19 ± 0,30 ^a
150 mM	162,60 ± 10,30 ^a	39,54 ± 1,35 ^b
Choque salino	182,88 ± 7,91 ^b	41,97 ± 0,47 ^b
150 → 0 mM	164,79 ± 3,83 ^a	8,63 ± 0,24 ^c

Tabela 3.3 – Teores de malondialdeído (MDA) e de prolina no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias. Valores expressos como médias ± E.P. (n=4). Em cada coluna os valores assinalados com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

A quantificação de prolina mostrou que o teor deste aminoácido aumentou em todas as situações em análise comparativamente ao controlo, surgindo os níveis mais elevados nos calos expostos ao sal, quer no tecido adaptado, quer no sujeito a choque salino (Tabela 3.3). Na Figura 3.4 é bem visível o efeito do NaCl neste parâmetro bioquímico que levou a que aumentasse em cerca de 10 vezes mais o valor médio registado no controlo. Apesar da transferência do tecido adaptado para meio sem sal ter promovido um decréscimo no teor de prolina, este foi duas vezes superior ao do controlo.

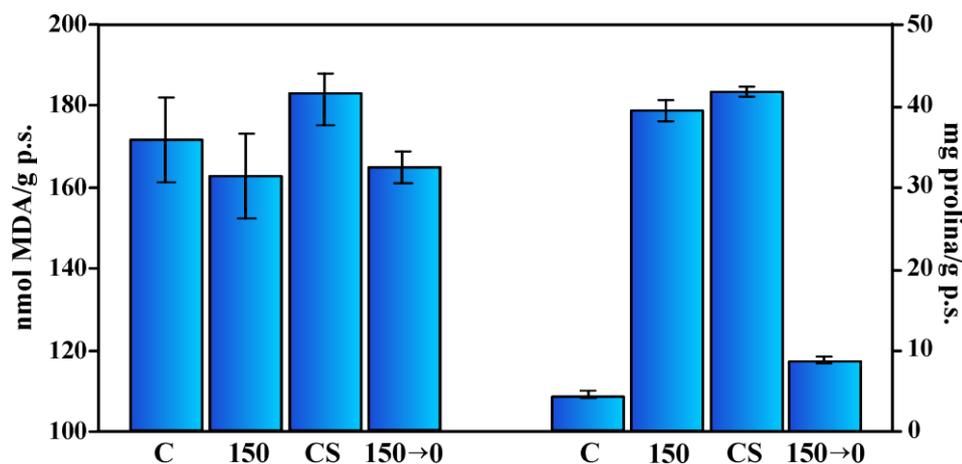


Figura 3.4 – Variação dos teores de malondialdeído (MDA) e de prolina no tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0). Valores expressos como médias \pm E.P.

Quando se procurou averiguar se o padrão de variação era alterado uma vez expressos os resultados por grama de peso fresco, verificou-se que no caso da peroxidação lipídica o padrão observado mantinha-se inalterado, no entanto, em relação aos resultados da prolina verificou-se que havia diferença entre o tecido caloso adaptado e o submetido a choque salino, caracterizada pelo aumento significativo do teor de prolina no tecido sujeito a choque (27%). Contrariamente aos resultados apresentados com base no peso seco (Tabela 3.3), este tecido passava a acumular 21 vezes mais prolina do que o controlo, enquanto que o adaptado acumulava 17 vezes mais (Tabela 3.3.1). Já a variação encontrada entre o tecido caloso controlo e o adaptado após subcultura em condições em meio sem sal permaneceu inalterada.

Tabela 3.3.1 – Teor de prolina acumulada no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.

Prolina ($\mu\text{g/g p.f.}$)			
Controlo	150 mM	Choque salino	150 \rightarrow 0 mM
91,43 \pm 6,43 ^a	1522,48 \pm 51,92 ^b	1930,76 \pm 21,73 ^c	183,73 \pm 5,21 ^d

Valores expressos como médias \pm E.P. (n=4). Os valores assinalados na linha com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

A peroxidação lipídica e a prolina são dois componentes vulgarmente analisados na resposta das plantas à salinidade. Se o primeiro é um indicador do stress oxidativo, o segundo tem vindo cada vez mais a assumir um papel ativo como molécula antioxidante, a juntar a outras tantas funções na célula que o tornam determinante na tolerância salina (Gill & Tuteja, 2010). Na secção 1.2 falou-se da salinidade como uma das causas de stress oxidativo, que em consequência do défice hídrico e desequilíbrio iónico gerados promove o aumento da formação de EROs. Estas espécies são conhecidas por desequilibrar os sistemas redox da célula em favor das formas oxidadas e por reagir com a maioria das moléculas biológicas, causando danos nos componentes celulares que podem conduzir a disfunções metabólicas irreparáveis e mesmo à morte celular (Smirnoff, 1993; Dat *et al.*, 2000; Ahmad *et al.*, 2009). Os lípidos insaturados das membranas celulares são particularmente susceptíveis à ação do $^1\text{O}_2$ e do radical OH^- , de tal modo que a peroxidação desses lípidos diminui a fluidez da membrana, aumentando a sua permeabilidade à passagem de pequenas moléculas e iões, e pode lesar as proteínas membranares com consequente inativação das mesmas (Halliwell, 2006). No caso de ocorrer na membrana plasmática, a peroxidação lipídica pode levar à perda de conteúdos celulares, à rápida desidratação e morte celular (Scandalios, 2005). Daí ser considerada o processo mais nocivo para qualquer organismo vivo em situação de stress (Gill & Tuteja, 2010).

Numa situação de stress oxidativo, as EROs estão presentes nas células em quantidades demasiado baixas para poderem ser analisadas diretamente pelos métodos analíticos disponíveis. Por conseguinte, tem sido através das reações das EROs que se tem procurado estimar o grau de stress oxidativo em amostras biológicas (Halliwell, 2006). A peroxidação lipídica é uma dessas reações, que tem sido testada como indicador efetivo dos danos celulares causados pelas EROs pois, se por um lado, ocorre quando os níveis destas espécies são suficientemente altos para iniciar o processo oxidativo, por outro, é sabido que durante este processo são gerados vários produtos que contribuem para agravar o stress oxidativo (Halliwell, 2000; Montillet *et al.*, 2005). As metodologias disponíveis para a avaliação da peroxidação lipídica medem a formação dos produtos gerados durante o processo, sendo a quantificação dos aldeídos, por reação com o ácido tiobarbitúrico, um dos métodos mais utilizados (Shulaev & Oliver, 2006).

Nesta perspetiva, foi nosso objetivo determinar o nível de peroxidação lipídica como meio de avaliar o grau de stress nas culturas de tecido caloso das duas condições salinas.

Os resultados mostraram que a exposição direta do tecido caloso controle a 150 mM de NaCl levou a que a formação de MDA fosse superior à ocorrida no tecido caloso adaptado ao sal, cujos níveis de MDA não sofreram variação em relação aos detetados quer no material controle, quer no adaptado quando crescido na ausência de NaCl. Estas observações confirmam que o tratamento de choque com sal aumentou a peroxidação lipídica, o que indica a ocorrência de stress oxidativo, uma situação que parece não suceder no tecido adaptado já que este indicador bioquímico de stress não foi alterado pela presença de NaCl no meio de cultura. A nosso ver, o facto da peroxidação lipídica não ter aumentado no tecido adaptado não significa que este não possa estar de certo modo em stress. Segundo Halliwell & Chirico (1993), as proteínas e a molécula de DNA são mais propensas a lesões oxidativas do que os lípidos, o que faz com que a peroxidação lipídica surja num estado mais avançado do processo oxidativo. Por outro lado, há que assinalar que a taxa de crescimento do tecido adaptado foi afetada pela salinidade, paralelamente à perda de água e ao desequilíbrio entre os elementos inorgânicos, respostas que são características das plantas em stress salino (Singh *et al.*, 2007; Attia *et al.*, 2008; Panda & Khan, 2009). No entanto, é possível que no tecido adaptado o sistema de defesa antioxidante se encontre ativo, protegendo-o dos efeitos das EROs, nomeadamente da oxidação dos lípidos. Assim aconteceu nas cultivares de algodoeiro tolerantes ao sal e respetivas culturas de tecido caloso que tiveram menores níveis de peroxidação lipídica do que as plantas e culturas sensíveis devido à maior atividade antioxidante das primeiras (Gossett *et al.*, 1994a,b). Já a maior atividade da APX na linha celular de *Citrus* adaptada ao sal não foi suficiente para que a acumulação de MDA fosse inferior à da linha não adaptada exposta ao sal (Gueta-Dahan *et al.*, 1997).

O aumento da peroxidação lipídica no tecido caloso em consequência do choque salino permite-nos inferir um aumento dos níveis de EROs nas células, pelo facto de estarem envolvidos na iniciação do processo de oxidação, além do H₂O₂ ser uma das moléculas responsáveis pela ativação das lipoxigenases associadas à membrana plasmática (Kulkarni *et al.*, 1990; Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999; Bor *et al.*, 2003). Com efeito, assistiu-se ao aumento da peroxidação lipídica associado à acumulação de H₂O₂ após a exposição de diversas plantas a elevadas concentrações salinas, verificando-se em geral que esse aumento é superior nos genótipos sensíveis à salinidade (Hernández *et al.*, 1995; Sairam & Srivastava, 2002; Sairam *et al.*, 2005; Ben Amor *et al.*, 2006; Sekmen *et al.*, 2006; Ghosh

et al., 2011), em contraste com a halófito *S. salsa* onde os dois parâmetros surgiam diminuídos (Cai-Hong *et al.*, 2005).

A acumulação de prolina é um fenômeno bem documentado nas plantas expostas a condições salinas e de secura, sendo frequentemente atribuído a este aminoácido a função de soluto compatível, o que faz com que esteja envolvido na tolerância a situações de stress osmótico (Ashraf & Foolad, 2007). Estudos comparativos da resposta de diferentes cultivares sujeitas a tratamentos salinos ou de secura são unânimes em relacionarem a acumulação do osmólito com a tolerância a esses fatores de stress (Türkan *et al.*, 2005; Demiral & Türkan, 2005; Koca *et al.*, 2007; Yazici *et al.*, 2007; Aghaei *et al.*, 2008; Roychoudhury *et al.*, 2008). O aumento generalizado da concentração de prolina nas plantas mais resistentes ao sal levou Ashraf & Harris (2004) a proporem que a prolina fosse usada como um indicador bioquímico de tolerância à salinidade.

Também a nível celular tem havido referências a incrementos nos níveis de prolina em linhas celulares crescidas na presença de NaCl. Células de *N. tabacum* tolerantes a 100 mM de NaCl acumularam oito vezes mais prolina do que as células controlo e o mesmo registo foi observado nas culturas de células de *Alternanthera philoxeroides* expostas a 200 mM (Watad *et al.*, 1983; Longstreth *et al.*, 2004). A adaptação do tecido caloso de *C. limon* a meio salino esteve também associada à acumulação do aminoácido (Piqueras *et al.*, 1996). Apesar dos iões Na^+ e Cl^- terem sido os principais componentes do ajustamento osmótico nas células adaptadas a 428 mM de NaCl de *N. tabacum*, foi evidente a acumulação de solutos orgânicos, em particular da prolina, cuja concentração foi da ordem dos 129 mM, o que representou 80% do nível total de aminoácidos livres quantificado nessas células (Binzel *et al.*, 1987). A concentração detetada nas células não adaptadas mantidas sem NaCl (0,29 mM) demonstra bem o impacto da salinidade sobre este parâmetro. E os resultados obtidos no presente estudo vieram confirmar o aumento de prolina nas linhas de tecido caloso em contacto com o sal, que atingiu níveis 10 vezes superiores ao do controlo. Com base no trabalho de Aubert *et al.* (1999), que mostraram pela primeira vez a compartimentação citosólica da prolina, admitimos que a maior parte da prolina quantificada nessas linhas esteja acumulada no citosol, o que está em concordância com a sua função mediadora do ajustamento osmótico. Pode-se constatar neste trabalho que a transferência das células adaptadas para a ausência de sal levou a prolina para um nível quase cinco vezes mais baixo, o que é revelador da reversibilidade da resposta e da influência do NaCl no metabolismo do aminoácido. Este ponto de vista é

reforçado se atender-se a que existe uma relação direta entre o aumento da salinidade no meio e a acumulação do soluto nos tecidos, tal como foi demonstrado na batateira, em particular na cv. Désirée irrigada com 100 e 200 mM de NaCl, ou em plântulas e culturas de tecido caloso provenientes de outras cultivares de batateira expostas a níveis crescentes de NaCl (Fidalgo *et al.*, 2004; Rahnama & Ebrahimzadeh, 2004).

É muito provável que o aumento assinalável de prolina nas culturas de tecido caloso expostas ao sal tenha resultado do incremento da sua síntese a partir do glutamato. Pelo menos assim aconteceu nas células de batateira adaptadas à presença do PEG e tolerantes a 200 mM de NaCl, cujo teor elevado de prolina esteve relacionado com o decréscimo significativo do nível de glutamato nessas células (Leone *et al.*, 1994a). Embora vias alternativas à síntese de novo possam contribuir para o aumento celular da prolina, nomeadamente a diminuição na sua degradação e utilização, por exemplo, na síntese proteica, ou estar ainda associado à degradação de proteínas frequente em condições de stress, conforme alguns autores sugeriram (LaRosa *et al.*, 1991; Kishor *et al.*, 1995, 2005; Hien *et al.*, 2003). Foi com base no aumento da atividade da enzima P5CS e no decréscimo da atividade da prolina desidrogenase envolvida na conversão do metabolito em glutamato que Rahnama & Ebrahimzadeh (2004) justificaram os elevados níveis de prolina detetados nas plântulas e culturas de tecido caloso de batateira em condições salinas. As linhas de jovens plantas de *B. juncea* selecionadas pela tolerância ao sal também acumulavam mais prolina em resultado do aumento da atividade das enzimas de síntese (P5CR e aminotransferase da ornitina), enquanto que a atividade da oxidase da prolina diminuía (Madan *et al.*, 1995). O facto da expressão das enzimas de síntese (P5CS e P5CR) aumentar em resposta ao tratamento com H₂O₂ indica que a biossíntese da prolina é regulada pelo stress oxidativo (Krishnan *et al.*, 2008).

A possibilidade de aumentar a tolerância das plantas ao stress salino por via da acumulação da prolina levou a que se recorresse à manipulação genética de algumas das enzimas envolvidas na biossíntese deste aminoácido (Chen & Murata, 2002). Um exemplo são as plantas de batata transgénica desenvolvidas por Hmida-Sayari *et al.* (2005) a partir da sobre-expressão da P5CS, que se mostraram mais resistentes à salinidade através da maior produção de tubérculos do que as plantas não transformadas. Em alternativa à transformação genética, a aplicação exógena de prolina parece ter um efeito benéfico no comportamento das plantas em ambientes salinos. De acordo com alguns trabalhos revistos por Ashraf & Foolad (2007), a prolina exógena atenua os efeitos adversos do NaCl,

promovendo o crescimento das plantas em situações salinas. Também em condições *in vitro* foi evidente o efeito positivo da prolina adicionada a meio salino no crescimento de células de *N. tabacum* não adaptadas ao sal e que mantinham uma baixa relação K^+/Na^+ , o que é revelador da importância do aminoácido na proteção de enzimas e estruturas membranares do excesso de Na^+ , para além da sua função como osmólito (Okuma *et al.*, 2000; Hoque *et al.*, 2007a). Subjacente a este efeito osmoprotetor, está a ação antioxidante da prolina ao participar na remoção das EROs e de outros radicais livres (Miller *et al.*, 2010). Okuma *et al.* (2004) confirmaram a atividade antioxidante da prolina após terem detetado que a quantidade de MDA produzido era menor nas células de *N. tabacum* em stress salino incubadas com prolina. Hong *et al.* (2000) já havia sugerido que a função antioxidante da prolina seria mais importante na tolerância ao stress salino do que enquanto osmólito, ao verificarem que as plantas de tabaco transformadas e crescidas na presença de 200 mM de NaCl acumulavam prolina e apresentavam níveis baixos de MDA. Uma ideia que foi mais tarde partilhada por Molinari *et al.* (2007) quando concluíram que a prolina acumulada nas plantas transgênicas da cana-de-açúcar em stress hídrico atuava como um componente do sistema de defesa antioxidante, ao reduzir a peroxidação lipídica e proteger o PSII, em vez de atuar como molécula mediadora do ajustamento osmótico. Sendo assim, podemos supor o envolvimento da prolina na adaptação do tecido caloso de batateira a 150 mM de NaCl; o aumento ocorrido neste material poderá ter contribuído para prevenir os danos oxidativos induzidos pelo sal, com base nos baixos níveis de MDA quantificados no tecido. Já no tecido sujeito a choque salino o aumento registado não terá sido suficiente para impedir a peroxidação lipídica.

Atendendo à capacidade da prolina para eliminar o OH^- e de ligar-se aos iões metálicos, evitando assim a formação de um dos radicais livres mais reativo e para o qual as células não dispõem de nenhum mecanismo enzimático para o neutralizar, é possível que a prolina acumulada tenha tido um papel ativo na proteção dos lípidos das membranas das células adaptadas e na estabilização destas estruturas. Recorrendo a células de tabaco sujeitas a choque salino com 200 mM de NaCl mas protegidas pela prolina adicionada ao meio, Banu *et al.* (2009) corroboraram o efeito protetor deste soluto ao minimizar as lesões oxidativas ao nível das membranas, nomeadamente a peroxidação lipídica e o aumento da permeabilidade, o que se refletiu na reduzida morte celular. A este efeito esteve associada a proteção antioxidante conferida pela prolina ao reduzir os níveis de EROs através do aumento da atividade da CAT e das enzimas do ciclo AsA-GSH (Hoque *et al.*, 2007a,b).

Acrescente-se ainda a proteção exercida sobre o estado redox da glutathiona, de acordo com o estudo desenvolvido por Krishnan *et al.* (2008) em células animais sob stress oxidativo. Sobre o aumento dos níveis de GSH ocorrido nestas células, os autores indicaram a possibilidade da prolina acumulada ativar a síntese deste composto antioxidante, considerando que a proteção contra o stress oxidativo poderia estar ainda relacionada com a sua capacidade para despoletar as vias de sinalização que regulam as respostas de defesa. A este propósito, Khedr *et al.* (2003) sugeriram que a prolina atua como um componente das vias de transdução de sinal que regulam os genes envolvidos nas respostas ao stress, após terem verificado que a prolina exógena induzia a expressão de proteínas relacionadas com a tolerância ao stress salino.

Apesar dos nossos resultados sugerirem que a acumulação de prolina é uma resposta adaptativa que intervém na tolerância ao stress salino, verificou-se que os resultados quando expressos em peso fresco mostravam que a quantidade de prolina era mais elevada no tecido caloso submetido à condição de choque salino do que no tecido adaptado, ou seja, passava a existir uma diferença significativa entre as duas situações que não era revelada com base nos dados expressos em peso seco. O facto de se ter registado o menor conteúdo hídrico no tecido da situação de choque é a razão provável para a mais elevada concentração de prolina. No entanto, não é de estranhar que o tecido sujeito ao tratamento de choque possa ter mais prolina se atender-se a que a sua concentração no tecido reflete a intensidade do factor de stress de acordo com a sugestão avançada por Claussen (2005), que estabeleceu uma correlação positiva entre a pressão do stress e a acumulação de prolina. Nesta perspetiva, a pressão exercida pela salinidade sobre o tecido controlo subcultivado diretamente em meio com 150 mM NaCl foi maior do que a observada na linha adaptada, em que a exposição prévia a concentrações crescentes de NaCl permitiu os ajustamentos metabólicos conducentes à adaptação a essa condição salina. E os resultados obtidos por Fidalgo *et al.* (2004) validam essa noção, na medida em que demonstraram existir uma relação positiva entre a intensidade do stress salino e a acumulação de prolina em folhas de batateira. Mas, por outro lado, a maior acumulação de prolina no tecido sujeito a choque salino pode ser interpretada como um sintoma de lesões na célula causadas pelo tratamento, tendo em conta as opiniões que defendem que a acumulação do soluto não está relacionada com a tolerância ao sal, sendo antes visto como um indicador de suscetibilidade ao sal (Lutts *et al.*, 1996b; Chen *et al.*, 2007b; Ghars *et al.*, 2008).

3.1.3. Efeitos da salinidade no sistema de defesa antioxidante

3.1.3.1. Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade total das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX), bem como da desidroascorbato redutase (DHAR) e glutathione redutase (GR), que participam na regeneração das formas ativas do ascorbato e da glutathione através do ciclo AsA-GSH, foi avaliada por espectrofotometria e, com a exceção da DHAR, foi também analisado o padrão isoenzimático de cada uma das enzimas em géis nativos.

Os valores relativos à atividade total da SOD e da CAT para as quatro situações em estudo estão reunidos na Tabela 3.4. Como se pode ver, a salinidade afetou negativamente a atividade da SOD, mas foi na situação de choque salino que se registou o menor valor. Relativamente ao controlo, a atividade diminuiu em cerca de 21% no tecido caloso adaptado e 35% no tecido da situação de choque. A passagem do tecido adaptado por meio isento de sal provocou o aumento da atividade enzimática (13%), que se manteve inferior à do controlo em 11% (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.

Condições de cultura	SOD (U/mg proteína)	CAT (nmol H ₂ O ₂ /min/mg proteína)
Controlo	46,83 ± 0,22 ^a	496,29 ± 12,12 ^a
150 mM	36,88 ± 0,38 ^b	476,79 ± 7,24 ^{a,b}
Choque salino	30,36 ± 0,63 ^c	364,26 ± 8,04 ^c
150 → 0 mM	41,66 ± 0,97 ^d	451,32 ± 4,12 ^b

Valores expressos como médias ± E.P. (n=3). Em cada coluna os valores assinalados com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

A análise dos zimogramas obtidos em gel nativo mostra que a salinidade não alterou o padrão de bandas de atividade da SOD. Com efeito, foram detetadas quatro bandas na situação controlo, numeradas do cátodo para o ânodo, que estiveram presentes com a

mesma mobilidade eletroforética nas outras condições experimentais (Figura 3.5A). Embora o padrão isoenzimático não surgisse alterado, a análise densitométrica dos géis confirmou os dados da quantificação espectralométrica, ou seja, que a menor atividade de SOD correspondia ao material em condições salinas (Figura 3.5A). A diferente sensibilidade aos inibidores KCN e H₂O₂ foi usada para distinguir os três tipos de SODs; sendo assim, a primeira banda (SOD-1), que aparecia como a menos intensa nas quatro situações (Figura 3.5A), foi identificada como co-migração de Cu/ZnSOD com a FeSOD, o mesmo ocorrendo com as bandas 3 e 4, uma vez que estas não desapareciam por completo na presença do KCN (Figura 3.5B), surgindo mais ténues relativamente ao gel da Figura 3.5A, mas que acabavam por desaparecer no gel que estivera em contacto com o H₂O₂ (Figura 3.5C). A sensibilidade da Cu/ZnSOD aos dois inibidores e a resistência da FeSOD apenas ao KCN esteve na base da nossa dedução (Becana *et al.*, 1989). Já a banda 2 (SOD-2), aparentemente a proeminente entre as quatro, consistia na co-migração de Cu/ZnSOD com MnSOD, dada a resistência desta última ao H₂O₂. A comparação dos zimogramas sugere que a atividade das três isoenzimas foi igualmente reduzida pela salinidade, na medida em que assistiu ao decréscimo da intensidade das bandas correspondentes às SOD-2, SOD-3 e SOD-4 após a análise densitométrica (Figura 3.5A). No entanto, as formas férrica e de manganês da SOD parecem ser mais suscetíveis ao choque salino, com base na análise das bandas na presença dos inibidores (Figura 3.5B, C). Inclusive, é possível que o decréscimo de atividade da MnSOD tenha sido responsável pela menor atividade total da SOD quantificada no tecido adaptado que fora subcultivado em meio sem sal durante 28 dias (150→0), dado verificar-se que a SOD-2 na presença do H₂O₂ diminuía comparativamente ao controlo (Figura 3.5C).

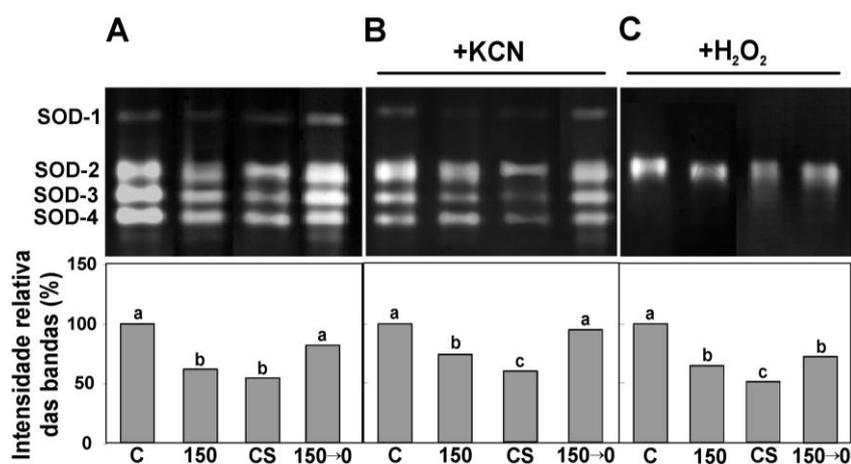


Figura 3.5 – Detecção da atividade da SOD em gel nativo no qual foram aplicados 30 µg de proteína do tecido caloso controle (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e do tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0). A) Padrão isoenzimático caracterizado por quatro bandas numeradas do cátodo para o ânodo. Para distinguir os três tipos de SOD usaram-se os inibidores KCN (B) e H₂O₂ (C): SOD-1=FeSOD + Cu/ZnSOD; SOD-2=MnSOD + Cu/ZnSOD; SOD-3,4=FeSOD + Cu/ZnSOD. A intensidade relativa das bandas de atividade nas várias situações foi quantificada por análise densitométrica e comparada com a intensidade das bandas controle definida como 100%. As barras representam valores médios (n=3) e as diferentes letras assinalam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Os resultados apresentados na Tabela 3.4 mostram que a atividade total da CAT não surgiu alterada no tecido adaptado à salinidade em relação à do tecido controle, tendo diminuído quando este foi colocado diretamente em meio de cultura suplementando com 150 mM de NaCl. Nesta situação, a atividade foi reduzida em cerca de 27% comparativamente ao valor quantificado no controle, uma diferença que foi da ordem dos 24% quando comparada com a atividade no tecido adaptado. Este, por sua vez, manteve a mesma atividade quer fosse mantido na presença de NaCl, quer transferido para a ausência de sal, embora o valor registado quando cultivado em meio sem sal fosse inferior ao do controle em 9% (Tabela 3.4). Comportamento idêntico foi observado após a análise em gel nativo da atividade da enzima. A Figura 3.6A ilustra o padrão obtido no final da eletroforese, caracterizado pela ocorrência de apenas uma banda nas quatro situações testadas. De acordo com a análise densitométrica, apenas no tecido sujeito a choque salino houve um decréscimo significativo na atividade da CAT, não só em relação ao controle, mas também ao tecido adaptado, o que está em concordância com os registos obtidos por espectrofotometria. Com recurso a anticorpos específicos contra a CAT1 e CAT2 de batateira foi possível identificar a isoforma observada nos géis e avaliar a influência do NaCl na quantidade de proteína. Os resultados de ‘western blotting’ revelaram a presença

de CAT2, já que o anticorpo para a CAT1 não reconheceu a banda presente, e a análise densitométrica mostrou que o tecido caloso adaptado apresentava menor quantidade de CAT2 (cerca de 77%) do que o controlo (Figura 3.6B). Este resultado não está em conformidade com os dados de atividade determinados por espectrofotometria e por detecção em gel nativo.

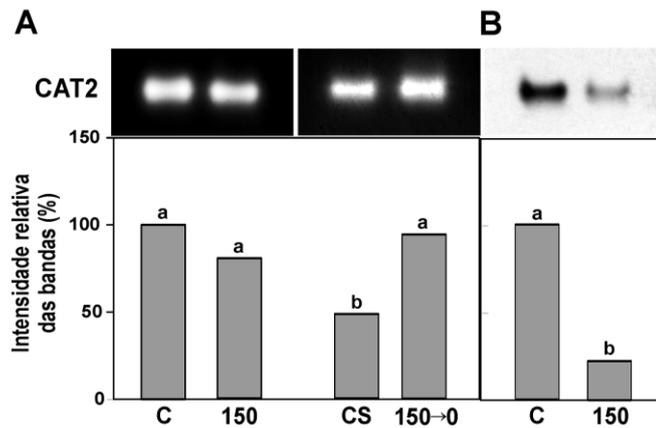


Figura 3.6 – Detecção da atividade da CAT em gel nativo no qual foram aplicados 2 μ g de proteína do tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e do tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0). A) Padrão isoenzimático caracterizado por uma banda identificada como sendo a CAT2 após a análise por 'western blotting' com o anticorpo contra a CAT2 de batateira (B).

A quantificação relativa da atividade da CAT2 no gel nativo (A) e da proteína imunodetetada (B) foi determinada por análise densitométrica e comparada com o controlo (100%). As barras representam valores médios ($n=3$) e as diferentes letras assinalam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

A APX é uma das enzimas que está presente em praticamente todos os compartimentos da célula, encontrando-se ligada ao sistema membranar de peroxissomas, mitocôndrias e plastídeos, onde está também presente no estroma do organelo e no citosol (Shigeoka *et al.*, 2002). Perante esta distribuição intracelular, a atividade da APX foi determinada não só na fração solúvel dos extratos de tecido caloso, mas também na fração insolúvel previamente tratada com CHAPS (secção 2.2.5.1.). Os resultados obtidos da quantificação ao espectrofotómetro apontam para uma diminuição da atividade da enzima, quer na fração solúvel, quer na insolúvel dos calos crescidos em condições salinas (Tabela 3.5). A influência do sal é evidente no comportamento da enzima ao causar um decréscimo na atividade total da ordem dos 19% e 13% para as culturas de tecido adaptado e sujeito a tratamento de choque, respetivamente. Comparando ainda com o valor quantificado no controlo, verifica-se não ocorrer variação significativa quando o tecido adaptado foi subcultivado na ausência de sal, embora se tenha notado que a atividade medida na fração insolúvel deste material tenha sido superior. Este resultado associado ao facto da atividade ter aumentado em cerca de 20% na fração solúvel e 39% na insolúvel em consequência da

mudança do tecido adaptado para meio sem sal reforça o efeito negativo do sal na atividade enzimática (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) determinada nas frações solúvel e insolúvel do tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.

Condições de cultura	APX ($\mu\text{mol AsA oxid./min/mg proteína}$)		
	Solúvel	Insolúvel	Total
Controlo	$7,78 \pm 0,11^a$	$5,15 \pm 0,20^a$	$12,89 \pm 0,24^a$
150 mM	$6,14 \pm 0,16^b$	$4,28 \pm 0,12^b$	$10,42 \pm 0,27^b$
Choque salino	$6,62 \pm 0,43^b$	$4,58 \pm 0,14^b$	$11,23 \pm 0,46^b$
150 \rightarrow 0 mM	$7,36 \pm 0,47^a$	$5,94 \pm 0,17^c$	$13,29 \pm 0,50^a$

Valores expressos como médias \pm E.P. (n=3). Em cada coluna os valores assinalados com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Se a análise espectrofotométrica mostrava não existirem diferenças entre os tecido caloso adaptado e o exposto diretamente a 150 mM de NaCl, os resultados obtidos em gel nativo a partir das duas frações demonstram que o tratamento de choque foi mais pernicioso para a atividade da APX, uma vez que a intensidade de coloração das bandas presentes no gel deste material era menor do que a das bandas correspondentes no tecido adaptado (Figura 3.7A). Contudo, a comparação dos zimogramas é reveladora da diminuição da atividade da enzima em condições de salinidade, sendo no material adaptado crescido na ausência de sal (150 \rightarrow 0) que apareciam as bandas com uma intensidade de coloração próxima às do controlo, embora no gel da fração insolúvel a banda fosse mais corada do que a do controlo (Figura 3.7A). Apesar do sal influenciar a atividade da APX, não alterou o padrão isoenzimático; as duas bandas detetadas no gel controlo da fração solúvel estiveram também presentes com a mesma mobilidade nas restantes condições experimentais, e a tendência manteve-se quando foi usada a fração insolúvel, se bem que neste caso tenha surgido apenas uma banda. Atendendo a que o ascorbato pode ser também oxidado pela peroxidase do guaiacol, ou por outras peroxidases não específicas do ascorbato (Amako *et al.*, 1994), os géis de ambas as frações foram postos em contacto com o inibidor da atividade da APX (p-HMB) e verificou-se que as bandas de atividade observadas

correspondiam efetivamente às peroxidases do ascorbato, dada a sua ausência na presença do inibidor.

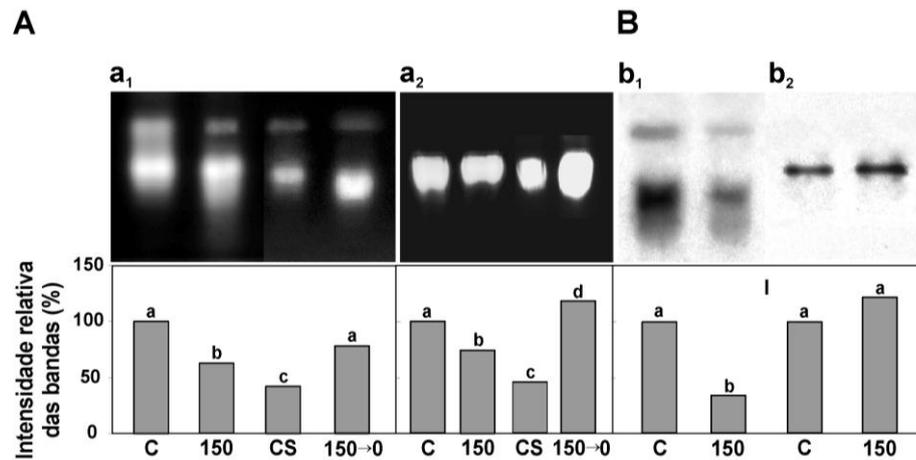


Figura 3.7 – A) Detecção da atividade da APX em gel nativo no qual foram aplicados 25 µg de proteína das frações solúvel (a₁) e insolúvel (a₂) extraídas do tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e do tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0). a₁) Padrão isoenzimático da fração solúvel caracterizado por duas bandas identificadas como a APX citosólica (cAPX) após a análise por ‘western blotting’ (B) com o anticorpo específico contra esta isoenzima (b₁) nos calos controlo (C) e adaptado ao sal (150). a₂) Padrão isoenzimático da fração insolúvel caracterizado por uma banda identificada como a APX peroxissomal (pAPX) após a análise por ‘western blotting’ (B) com o anticorpo específico contra esta isoenzima (b₂) nos calos controlo (C) e adaptado ao sal (150). A intensidade relativa das bandas de atividade nas várias situações foi quantificada por análise densitométrica e comparada com a intensidade das bandas controlo definida como 100%. As barras representam valores médios (n=3) e as diferentes letras assinalam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

O ‘western blotting’ realizado com os anticorpos contra a cAPX e a pAPX permitiu a identificação das duas bandas detetadas nos géis da fração solúvel como sendo a APX citosólica, enquanto que a única banda revelada na fração insolúvel correspondia à APX localizada nos peroxissomas (Figura 3.7B). Com base na análise densitométrica (Figura 3.7B, I), verificou-se a diminuição significativa da quantidade de cAPX no tecido caloso adaptado a 150 mM de NaCl (Figura 3.7B, b₁), já a quantidade de pAPX não foi afetada pela salinidade (Figura 3.7B, b₂), contrariamente aos resultados de atividade em gel nativo.

A atividade da GR apresentava um padrão de variação semelhante ao da APX, em que os valores mais baixos pertenciam às culturas expostas a 150 mM de NaCl, sendo restabelecida para níveis controlo após a subcultura do tecido adaptado em meio sem sal (Tabela 3.6). Nas duas condições salinas testadas registou-se uma diminuição da atividade total na ordem dos 23% relativamente ao nível quantificado no tecido controlo, um

resultado que foi confirmado através da detecção em gel nativo. Os zimogramas obtidos não só comprovaram essa redução, como revelaram que o padrão isoenzimático era alterado pelo sal (Figura 3.8). Das três bandas reveladas no controlo (GR-1, GR-2 e GR-3), apenas duas (GR-1 e GR-2) apareciam nos géis do material crescido na presença de NaCl, verificando-se que a banda de maior mobilidade estava ausente (GR-3). Esta banda era visualizada quando o tecido adaptado era transferido para meio isento de sal, o faz pressupor a sua sensibilidade à salinidade (Figura 3.8). De facto, a diminuição da atividade total da GR em resposta ao sal parece resultar da perda de atividade da GR-3, dado que a intensidade de coloração das outras duas bandas não divergiu das do controlo.

Tabela 3.6 – Atividade da glutiona redutase (GR) e da desidroascorbato redutase (DHAR) no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.

Condições de cultura	GR ($\mu\text{mol NADPH}$ oxid./min/mg proteína)	DHAR ($\mu\text{mol AsA/min/mg}$ proteína)
Controlo	$0,35 \pm 0,03^a$	$22,74 \pm 0,25^a$
150 mM	$0,27 \pm 0,02^b$	$12,52 \pm 0,23^b$
Choque salino	$0,27 \pm 0,03^b$	$11,79 \pm 0,12^c$
150 \rightarrow 0 mM	$0,32 \pm 0,06^a$	$21,57 \pm 0,38^d$

Valores expressos como médias \pm E.P. (n=3). Em cada coluna os valores assinalados com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

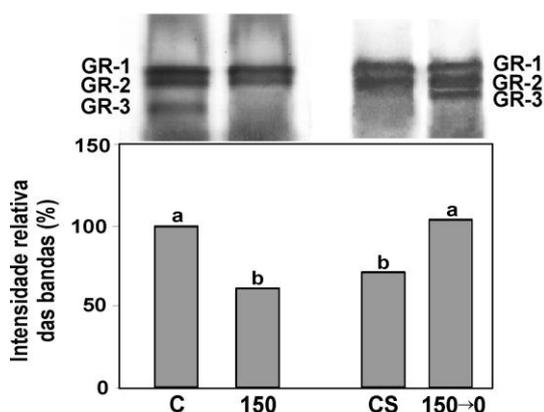


Figura 3.8 – Detecção da atividade da GR em gel nativo no qual foram aplicados 40 μg de proteína do tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e do tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150 \rightarrow 0). O padrão isoenzimático é caracterizado por três bandas numeradas do cátodo para o ânodo; de notar a ausência da banda GR-3 nos calos adaptado e sujeito a choque salino.

A intensidade relativa das bandas de atividade nas várias situações foi quantificada por análise densitométrica e comparada com a intensidade das bandas controlo definida como 100%. As barras representam valores médios (n=3) e as diferentes letras assinalam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$).

A DHAR teve um comportamento idêntico ao das outras enzimas do ciclo AsA-GSH ao verificar-se que a sua atividade diminuiu em consequência da exposição do tecido caloso a meio salino, se bem que o tratamento de choque tenha provocado o valor mais baixo de atividade (Tabela 3.6). Comparando a atividade enzimática do tecido exposto diretamente a 150 mM de NaCl com a do tecido adaptado verifica-se a ocorrência de uma diferença de apenas 6%, mas que foi significativa. Porém, a variação foi bastante superior relativamente ao nível médio registado no controlo, que se traduziu em decréscimos de 81% e 92% no tecido caloso adaptado e sujeito a choque salino, respetivamente (Tabela 3.6). A mudança do tecido adaptado para a ausência de NaCl provocou o aumento da atividade da DHAR (72%), mas para um nível inferior ao do controlo.

3.1.3.2. Metabolitos antioxidantes

Os níveis dos metabolitos antioxidantes foram também avaliados nas culturas de tecido caloso das quatro situações em estudo. Os resultados obtidos encontram-se reunidos na Tabela 3.7 e da sua análise destaca-se o aumento dos níveis de ascorbato (AsA), glutatona (GSH) e α -tocoferol em condições salinas.

Tabela 3.7 – Níveis dos compostos antioxidantes, ascorbato (AsA), desidroascorbato (DHA), glutatona reduzida (GSH) e α -tocoferol no tecido caloso controlo, adaptado e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl, e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias.

Condições de cultura	Ascorbato (mg/g p.s.)			AsA/DHA	GSH (mg/g p.s.)	α -Tocoferol (mg/g p.s.)
	AsA	DHA	tAsA			
Controlo	1,13 \pm 0,09 ^a	0,73 \pm 0,10 ^a	1,86 \pm 0,07 ^a	1,54 ^a	0,31 \pm 0,01 ^a	0,17 \pm 0,01 ^a
150 mM	1,59 \pm 0,12 ^b	0,78 \pm 0,06 ^a	2,37 \pm 0,12 ^b	2,04 ^b	0,46 \pm 0,01 ^b	0,29 \pm 0,04 ^b
Choque salino	1,47 \pm 0,09 ^b	0,79 \pm 0,06 ^a	2,26 \pm 0,03 ^b	1,86 ^b	0,47 \pm 0,03 ^b	0,20 \pm 0,01 ^c
150 \rightarrow 0 mM	0,72 \pm 0,07 ^c	0,45 \pm 0,08 ^b	1,17 \pm 0,05 ^c	1,61 ^a	0,37 \pm 0,03 ^a	0,14 \pm 0,03 ^a

Valores expressos como médias \pm E.P. (n=3). Em cada coluna os valores assinalados com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

As culturas de tecido caloso expostas a meio salino foram as que apresentaram maior aumento do conteúdo de AsA (41% no tecido adaptado e 30% no exposto a choque com NaCl), como é evidente na Figura 3.9. Curiosamente, o produto da sua oxidação (DHA)

não sofreu variação relativamente ao controlo, levando a que a razão AsA/DHA mais elevada fosse encontrada nas linhas celulares crescidas na presença de NaCl (Tabela 3.7). Por conseguinte, foi nestas linhas que se registaram os maiores teores totais de ascorbato (tAsA), tendo a forma reduzida contribuído em mais de 50% para o valor total. Apesar da quantidade de tAsA na linha adaptada ter decrescido para um nível médio inferior ao do controlo quando foi subcultivada em meio sem sal, a razão AsA/DHA foi idêntica à do tecido controlo.

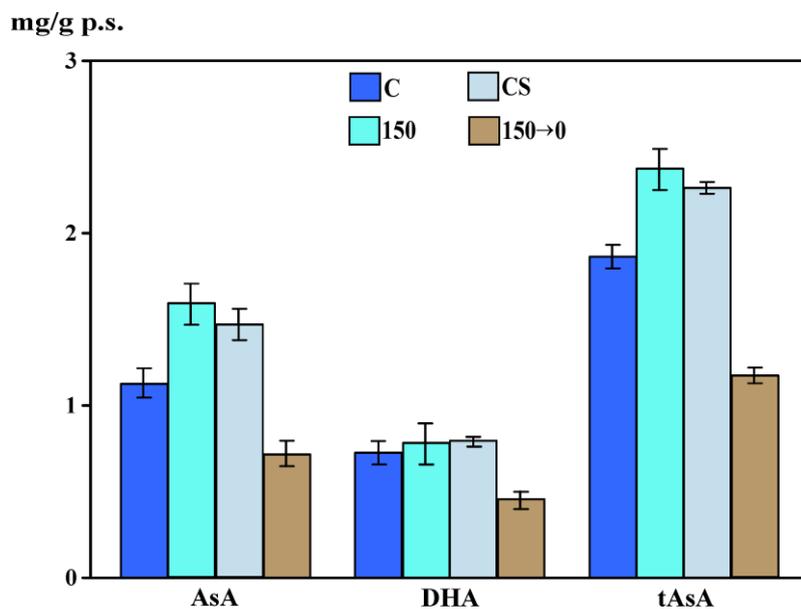


Figura 3.9 – Variação dos níveis de ascorbato (AsA), desidroascorbato (DHA) e ascorbato total (tAsA) no tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0). Valores expressos como médias \pm E.P.

À semelhança do ascorbato, os níveis de GSH aumentaram significativamente nas culturas de tecido caloso crescidas na presença de sal, verificando-se em ambas as situações um aumento próximo dos 50% em relação à testemunha (Tabela 3.7 e Figura 3.10). Por sua vez, a transferência do tecido adaptado do meio salino para o mesmo meio isento de NaCl provocou o decréscimo do metabolito para níveis que não divergiram dos do tecido controlo.

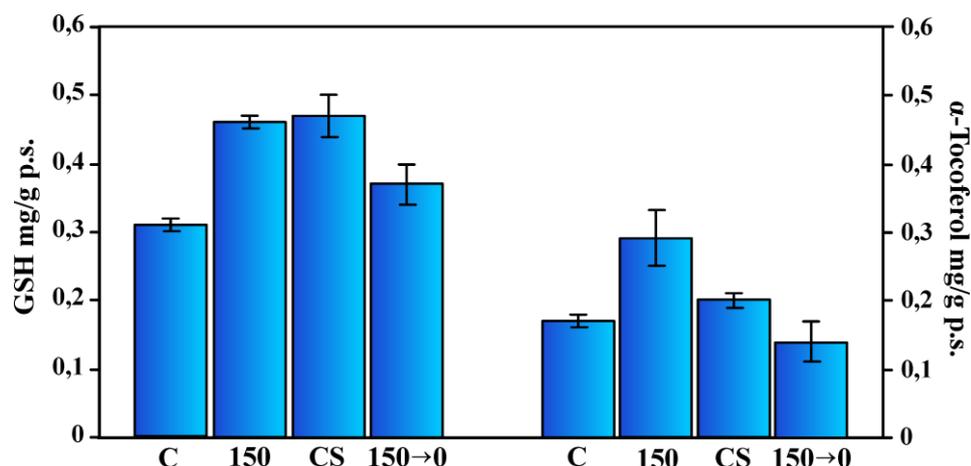


Figura 3.10 – Variação dos níveis de glutatona reduzida (GSH) e de α -tocoferol no tecido caloso controlo (C), adaptado (150) e sujeito a choque salino com 150 mM de NaCl (CS), e no tecido adaptado a 150 mM de NaCl após a subcultura em meio sem sal durante 28 dias (150→0). Valores expressos como médias \pm E.P.

Neste estudo, não foi registada a acumulação da forma oxidada (GSSG), pelo facto do sinal obtido correspondente a este composto estar muito próximo do limite de deteção do método, impossibilitando a sua quantificação (Figura 3.11). Por este motivo, os dados da GSH são representativos dos níveis de glutatona encontrados nas células.

Os resultados obtidos da quantificação do α -tocoferol e representados na Figura 3.10 mostram o aumento deste elemento nas linhas celulares expostas a 150 mM de NaCl, com os maiores teores a serem registados na linha adaptada ao sal. A quantidade detetada nesta linha foi superior à do controlo em cerca de 70%, e comparativamente à sujeita a choque salino o acréscimo era de 31%. A cultura do tecido adaptado durante 28 dias na ausência de sal fez baixar os níveis do antioxidante em cerca de 52%, que no final não variaram dos observados no controlo (Tabela 3.7).

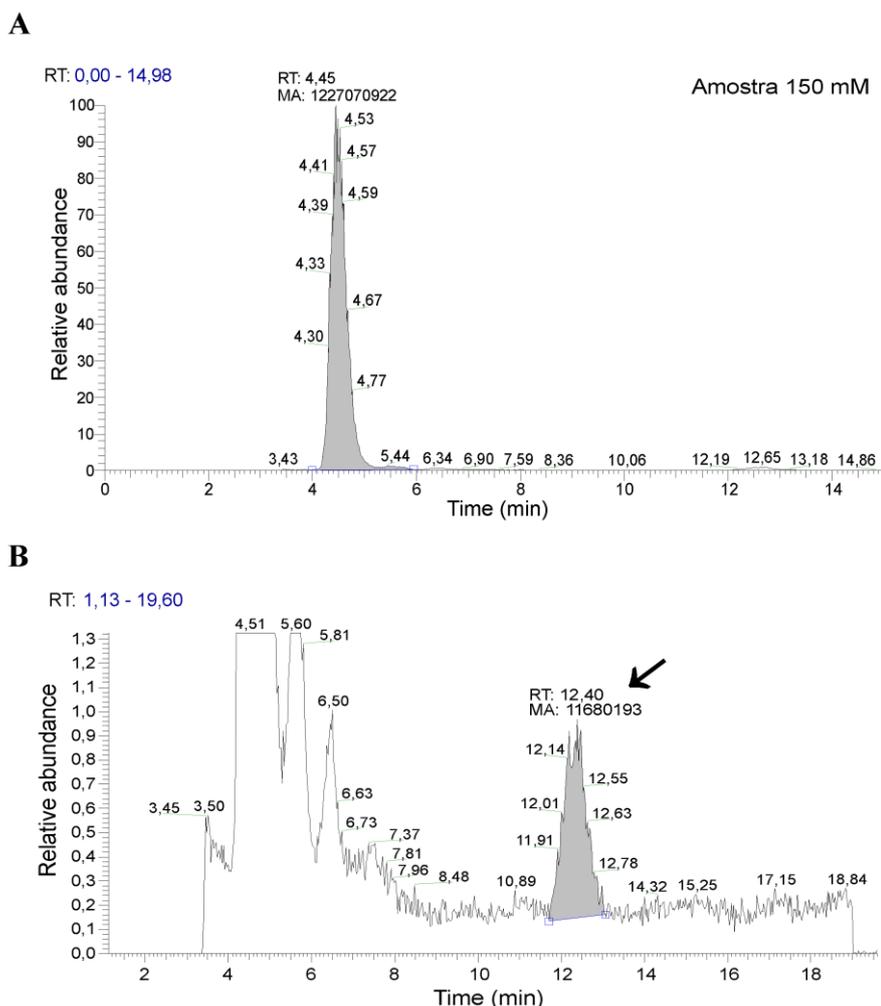


Figura 3.11 – Cromatogramas resultantes da análise por HPLC-ESI/MS de um extrato de tecido caloso adaptado a 150 mM de NaCl. A) Sinal cromatográfico correspondente à GSH cuja área foi usada para a determinação da quantidade do metabolito. B) Sinal cromatográfico correspondente à GSSG; de notar que a abundância relativa de GSSG é muito baixa, o que faz com que o sinal do composto (assinalado com seta) se confunda com as interferências de outros componentes da matriz.

O facto dos níveis de MDA quantificados na linha de tecido caloso adaptada não terem sido alterados pela presença de NaCl no meio de cultura, e serem idênticos aos encontrados na situação em que o tecido esteve a crescer na ausência de sal, levou-nos a antecipar a possibilidade do sistema de defesa antioxidante ser eficaz na remoção das EROs, evitando os efeitos nocivos destes elementos nas células, entre os quais a peroxidação lipídica. Tanto mais que está perfeitamente estabelecida a relação da salinidade com o stress oxidativo, sabendo-se que as células vegetais desenvolveram um eficiente sistema que as protege da produção aumentada de EROs em condições ambientais adversas (Gill &

Tuteja, 2010). Um conjunto de enzimas e de compostos de baixo peso molecular constituem o sistema antioxidante que intervém no restabelecimento do equilíbrio entre a formação e a remoção das EROs durante essas situações. A SOD impede a acumulação do O_2^- convertendo-o em H_2O_2 que, por sua vez, pode ser transformado em água e oxigênio pela atividade da CAT, ou em alternativa ser reduzido a água pela ação da APX por via do ciclo AsA-GSH. Contrariamente à CAT que não consome poder redutor, a APX catalisa a redução do H_2O_2 usando o ascorbato como substrato. As atividades das enzimas GR e DHAR são também fundamentais no ciclo AsA-GSH, a primeira por assegurar a disponibilidade de GSH necessária à DHAR para regenerar o AsA a partir da sua forma oxidada (DHA) (Miller *et al.*, 2010).

A atividade coordenada das várias enzimas que se encontram distribuídas pelos diferentes compartimentos celulares assegura a eliminação efetiva das EROs dos seus locais de formação na célula, evitando que o H_2O_2 se difunda através das membranas para outros locais e induza alterações oxidativas em diversas moléculas biológicas (del Río *et al.*, 2002; Jaspers & Kangasjärvi, 2010). Assim, é de esperar que em resposta a situações de stress ocorra o aumento da atividade das enzimas antioxidantes (Munns & Tester, 2008). Com efeito, vários estudos têm demonstrado em espécies diversas o envolvimento dessas enzimas na aquisição da tolerância a fatores de stress abiótico, nomeadamente à salinidade. A maioria dos resultados aponta para uma relação direta entre a atividade antioxidante e a tolerância ao stress salino (Hernández *et al.*, 2000; Sreenivasulu *et al.*, 2000; Parida *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2006; Koca *et al.*, 2007; Yazici *et al.*, 2007; Ashraf & Ali, 2008; Pérez-López *et al.*, 2009). Em contraste, neste trabalho verificou-se a diminuição da atividade da SOD, APX, GR e DHAR nas linhas de tecido caloso expostas a NaCl, muito embora as atividades totais da SOD, CAT e da DHAR tenham sido superiores na linha adaptada do que na sujeita a choque salino. Aparentemente, estas enzimas mostraram-se mais afetadas pelo tratamento de choque do que as restantes, sobretudo a CAT, uma vez que a atividade desta não era alterada no tecido adaptado em relação à do controlo, nem quando o tecido passava da condição salina para a ausência de sal (150→0 mM) (Tabela 3.4). Destes resultados infere-se que o sistema antioxidante enzimático não contribuiu para a tolerância salina do tecido caloso de batateira ao contrário do que é descrito nos estudos feitos nesta planta e documentado em outros trabalhos experimentais (Benavídes *et al.*, 2000; Fidalgo *et al.*, 2004; Aghaei *et al.*, 2009). Por exemplo, a tolerância salina exibida por certas espécies do género *Beta* e *Plantago* resultava da

capacidade dessas plantas para lidarem com o stress oxidativo através da ativação do sistema antioxidante enzimático (Bor *et al.*, 2003; Sekmen *et al.*, 2007). O mesmo sucedia no tomateiro selvagem (*L. pennellii*), em que a maior atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e DHAR) foi em parte responsável pela sua maior tolerância ao stress salino do que a espécie cultivada (*L. esculentum*) (Shalata & Tal, 1998; Shalata *et al.*, 2001). A diferença entre as duas espécies era evidente também ao nível dos cloroplastos, onde essas enzimas foram mais eficientes na redução dos níveis de H₂O₂ e da peroxidação lipídica nos cloroplastos do tomateiro selvagem, daí que este esteja melhor protegido do stress oxidativo (Mittova *et al.*, 2002). Os trabalhos realizados no algodoeiro vieram mostrar que, sendo uma planta tolerante à salinidade, existem cultivares que são mais tolerantes do que outras em resultado da maior atividade antioxidante que apresentam, assim se justificando que a taxa fotossintética surgisse menos afetada pela salinidade e a peroxidação lipídica reduzida nessas cultivares (Gossett *et al.*, 1994a; Meloni *et al.*, 2003). O mesmo argumento era apresentado por Sairam e colaboradores (Sairam & Srivastava, 2002; Sairam *et al.*, 2005) após terem comparado a atividade das enzimas SOD, APX e GR em genótipos de trigo com diferente grau de sensibilidade à salinidade. Também na planta de milho, a tolerância ao sal estava relacionada com a resistência ao stress oxidativo conferida pelo aumento da capacidade antioxidante (Neto *et al.*, 2006). E mesmo nas halófitas, os dados disponíveis são sugestivos de que a indução do sistema antioxidante enzimático é um componente na adaptação à salinidade (Cai-Hong *et al.*, 2005; Ben Amor *et al.*, 2006; Ellouzi *et al.*, 2011).

A utilização das culturas *in vitro* no estudo dos mecanismos de tolerância salina corrobora a importância das enzimas antioxidantes na proteção das células contra os danos oxidativos induzidos pela salinidade (Gossett *et al.*, 1994a, 1996; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Bueno *et al.*, 1998; Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999; Davenport *et al.*, 2003; Niknam *et al.*, 2011). Elkahoui *et al.* (2005) concluíram que o aumento da atividade da SOD e APX ocorrido nas células adaptadas e não adaptadas ao NaCl de *Catharanthus roseus* quando expostas a 50 e 100 mM de NaCl seria uma resposta ao aumento da formação de EROs que, de certo modo, aliviou o impacto negativo da presença do sal e foi determinante para o crescimento das células nessas condições. Esta resposta mostra que a produção de EROs não é necessariamente um sintoma de disfunção celular como foi muitas vezes referido, podendo ser um sinal necessário para que ocorram na célula os ajustamentos metabólicos compatíveis com a nova condição ambiental (Jaspers & Kangasjärvi, 2010).

Refira-se ainda os esforços conseguidos com a obtenção de plantas com tolerância acrescida ao stress salino através da sobre-expressão de vários genes da SOD, APX ou da CAT, o que reforça a noção de que estas enzimas são importantes para a tolerância ao stress oxidativo (Badawi *et al.*, 2004a,b; Wang *et al.*, 2004; Nagamiya *et al.* 2007; Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010a).

Para além do impacto da salinidade sobre a atividade das enzimas antioxidantes, sobressai ainda de alguns estudos realizados as alterações induzidas na expressão dos genes que codificam algumas dessas enzimas, que se refletem no aumento dos níveis de transcritos e de proteína acumulada (Savouré *et al.*, 1999; Sreenivasulu *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2004a; Attia *et al.*, 2008). Ao esclarecerem o comportamento tolerante exibido pelos genótipos de *M. truncatula* após sujeitos a concentrações crescentes de NaCl, Mhadhbi *et al.* (2011) verificaram que a maior atividade da SOD, CAT e APX estava correlacionada com o aumento da expressão dos genes dessas enzimas (*Cat*, *cApx*, *CuSod* e *FeSod*). Deste, e de outros estudos verifica-se que o grau de tolerância ao stress salino parece envolver a indução de determinadas isoformas das enzimas antioxidantes; o aumento da atividade antioxidante nas plantas tolerantes de *Setaria italica* esteve associada com a indução das isoenzimas Cu/ZnSOD, MnSOD e cAPX, já nas ervilheiras em condições de elevada salinidade assistiu-se à indução das SODs férrica e de manganês acompanhadas da APX plastidial (Hernández *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 1999, 2004a; Sreenivasulu *et al.*, 2000). Segundo Tsang *et al.* (1991) é possível relacionar o aumento de atividade/transcritos de um determinado tipo de SOD com os locais da célula mais afetados pela produção de EROs.

Apesar da generalidade dos estudos apontar para o aumento da atividade da SOD em condições salinas, verifica-se que foi reduzida nas raízes de espécies do género *Vigna* na sequência do tratamento salino dessas plantas, não tendo sofrido alterações nos órgãos aéreos (Cavalcanti *et al.*, 2004; Panda & Khan, 2009). Em outras plantas sujeitas a stress salino, como por exemplo na batateira, embora a atividade da SOD tenha aumentado, esta resposta não foi acompanhada pelo aumento da capacidade enzimática da CAT e APX necessária para evitar a acumulação de H₂O₂ (Fidalgo *et al.*, 2004).

Através dos géis nativos observou-se o padrão de atividade da SOD e das restantes enzimas antioxidantes nas várias situações em estudo. No caso da SOD registou-se a ocorrência de quatro bandas de atividade, identificadas como co-migração da Cu/ZnSOD com a MnSOD (SOD-2) e com a FeSOD (SOD-1, SOD-3 e SOD-4), que não foram

alteradas pela presença do NaCl, embora a intensidade de coloração fosse inferior à das bandas correspondentes no material controle. De certo modo, a diminuição da atividade dos três tipos de SOD contribuiu para o decréscimo da atividade total, se bem que as alterações na Cu/ZnSOD tenham tido maior impacto por ser a SOD mais representativa no tecido caloso de batateira. Num outro estudo em que se avaliou o efeito do NaCl na atividade antioxidante em culturas de tecido caloso obtidas de cultivares de batateira com diferente tolerância salina, apenas a atividade da MnSOD surgiu aumentada em resposta ao sal, apesar de não ser suficiente para elevar a atividade total (Rahnama & Ebrahimzadeh, 2006). No entanto, quando a atividade da SOD foi avaliada nas plantas das várias cultivares, verificou-se que era superior nas mais tolerantes, estando mesmo envolvida na tolerância salina dessas plantas (Aghaei *et al.*, 2009). Na batateira, parece não existir correlação entre a resposta das plantas aos tratamentos salinos e a das culturas de tecido caloso. Nas plantas da cultivar Désirée, a mesma que foi usada para a obtenção das nossas linhas celulares, Fidalgo *et al.* (2004) verificaram que o grau de tolerância exibido quando eram sujeitas a stress salino parecia estar associado ao aumento da atividade da SOD. Se confrontarmos este resultado com o observado nas culturas de tecido caloso crescido na presença de NaCl, confirma-se que não há relação entre o comportamento da SOD nas plantas e no tecido em situação *in vitro*, no entanto, a maior atividade da enzima, representada sobretudo pela Cu/ZnSOD, na linha adaptada do que na sujeita a choque salino leva-nos admitir o seu contributo para a tolerância ao sal. Estudos realizados na batateira e noutras solanáceas também indicavam que a Cu/ZnSOD era a isoenzima que sofria maior indução em situações de secura ou de exposição à radiação UV-B, provavelmente por ser aquela que tem uma distribuição mais alargada na célula (Bowler *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1999). Curiosamente, nos ensaios com a batateira cultivada a MnSOD não era observada (Santos *et al.*, 1999; Fidalgo *et al.*, 2004), já na espécie *S. curtilobum* resistente ao frio a FeSOD representava cerca de 50% da atividade total quando as plantas eram expostas à secura (Martinez *et al.*, 2001). Esta isoenzima foi também determinante para a aclimação do tomateiro ao calor e para a remoção do O₂⁻ em diversas plantas sujeitas a condições de carência de cobre (Camejo *et al.*, 2007; Cohu & Pilon, 2007). Situação diferente foi encontrada no arroz e na cevada, duas plantas com diferente tolerância ao sal em que a FeSOD não era observada e a atividade das isoenzimas Cu/ZnSOD e MnSOD surgia aumentada pela salinidade (Fadzilla *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2001; Pérez-López *et al.*, 2009). Esta discrepância de resultados poderá estar relacionada

com os modelos experimentais usados, que recorrem ao sistema *in vitro* ou a cultivares que diferem na tolerância salina, podendo inclusivamente encontrarem-se em diferentes fases de desenvolvimento (Bowler *et al.*, 1992; Noreen & Ashraf, 2009). Os mecanismos que regulam a expressão e atividade das diversas SODs são complexos, pois além de serem reguladas pelo stress, são moduladas pela fase de desenvolvimento dos órgãos em estudo, sabendo-se que a localização subcelular de cada uma delas poderá também ter influência (Perl-Treves & Galun, 1991; Tsang *et al.*, 1991; Alscher *et al.*, 2002). Compreende-se assim que na mesma planta o comportamento das enzimas antioxidantes varie entre os órgãos, como sucedeu na *Calendula officinalis* em condições salinas em que a atividade da SOD aumentou nas raízes e diminuiu nas folhas, ocorrendo o contrário nas folhas e raízes de *V. unguiculata* nas mesmas condições (Chaparzadeh *et al.*, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2007).

De mencionar que outros fatores poderão intervir na resposta da SOD ao stress; cite-se a possibilidade do próprio H₂O₂ inativar a enzima após se ter notado que o tratamento salino das plantas de *N. plumbaginifolia* e *A. thaliana* promovia o aumento do nível de transcritos ao passo que a atividade diminuía (Savouré *et al.*, 1999; Attia *et al.*, 2008). Embora não quantificado no presente estudo, o H₂O₂ pode ser produzido nas células vegetais por outras vias para além da ação da SOD; nos peroxissomas diversas oxidases geram H₂O₂, que é o principal produto da fotorespiração, e nas mitocôndrias é formado a partir da respiração (Foyer *et al.*, 1997; del Río *et al.*, 2006). Como foi dito na secção 1.2.2., a fotorrespiração é uma via que assume especial importância nas plantas C₃ em condições de défice hídrico como é a salinidade, e a formação de H₂O₂ nas mitocôndrias é mais relevante nos tecidos não fotossintéticos (Asada, 2006; Navrot *et al.*, 2007). Por outro lado, e não menos importante, é o facto do elevado conteúdo de Na⁺ e Cl⁻ quantificado nas linhas celulares expostas ao sal poder afetar a integridade das proteínas, causando assim a redução da atividade enzimática, tal como Hernández *et al.* (1994) verificaram em protoplastos foliares de *V. unguiculata* submetidos a diferentes concentrações de NaCl. Adicionalmente, a possibilidade do excesso de Na⁺ desativar a enzima ao atuar como um inibidor competitivo é um factor a considerar para a reduzida atividade da SOD em condições salinas (Blumwald *et al.*, 2000). Refira-se ainda que a síntese proteica requer a presença de elevados níveis de K⁺, sendo inibida por elevadas concentrações de Na⁺ (Tester & Davenport, 2003). Assim, a acumulação de Na⁺ acompanhada pela redução de K⁺ nas culturas de tecido caloso em condições salinas, que se traduziu nos valores mais

baixos de K^+/Na^+ (0,43 para o tecido adaptado e 0,33 para o sujeito a tratamento de choque), pode ter prejudicado a síntese e reduzido a quantidade de enzima, justificando-se a perda de atividade observada nessas culturas, em particular na sujeita a choque salino (Shabala & Cuin, 2008). O efeito oxidativo da salinidade também é apontado como causa da supressão da síntese de novo de proteínas pois, segundo Nishiyama *et al.* (2011), a síntese proteica é o principal alvo das EROs, daí que os níveis de proteína surjam diminuídos nas folhas de batateira sujeita a stress salino (Fidalgo *et al.*, 2004; Teixeira & Pereira, 2007).

A reduzida síntese proteica é a razão provável para a menor atividade da APX determinada na fração solúvel dos calos crescidos na presença de NaCl, ao verificar-se nos géis nativos que a atividade reduzida das cAPXs nesse material estava correlacionada com uma menor quantidade de proteína. Por sua vez, a quantidade de pAPX, a única isoenzima presente nos géis de atividade da fração insolúvel, parecia não ser afetada pela condição salina, apesar da atividade enzimática decrescer (Figura 3.7A, B). Esta divergência entre o nível de proteína e a atividade da pAPX no tecido caloso, que foi já descrita noutros estudos, sugere que a regulação da isoenzima pode ser a nível pós-tradução (Shigeoka *et al.*, 2002; Gómez *et al.* 2004a), havendo a possibilidade da enzima ser inibida pelo H_2O_2 se este estiver presente a níveis suficientemente altos (del Río *et al.*, 2006). Não nos parece que possa ser este o caso, na medida em que a atividade da CAT no tecido adaptado não diferiu da do controlo, além do mais a da SOD foi reduzida pelo sal, daí admitirmos que os níveis de H_2O_2 no tecido se encontrem controlados. Perante os resultados obtidos em gel nativo e da análise ‘western blotting’ supõe-se que as duas isoenzimas sejam reguladas de um modo diferente pela salinidade e, à semelhança da SOD, a sua distribuição subcelular pode ser determinante.

Além das APXs citosólica e peroxissomal, é conhecida a existência nas células vegetais de outras isoenzimas (mitocondrial e plastidiais), cuja atividade não foi revelada nos géis nativos do tecido caloso de batateira. Estudos realizados nos cloroplastos de ervilheira demonstraram que a atividade das APXs plastidiais (sAPX e tAPX) era induzida em condições de salinidade moderada (50-70 mM NaCl), mas na presença de níveis elevados de sal (superiores a 100 mM NaCl) era reduzida de modo significativo (Gómez *et al.*, 1999, 2004a). Foi, no entanto, possível assistir ao aumento de atividade das duas APXs quando os cloroplastos foram isolados de plantas de trigo tolerantes à secura ou da halófito *Suaeda salsa* regadas com solução salina (Meneguzzo *et al.*, 1998; Cai-Hong *et al.*, 2005).

A especificidade destas isoenzimas em relação ao ascorbato torna-as extremamente instáveis perante a baixa disponibilidade do substrato e mais sensíveis ao aumento das EROs gerado pelo NaCl, ao passo que a APX citosólica por ser menos específica relativamente ao dador de eletrões mostra-se mais estável na eventualidade do ascorbato faltar (Shigeoka *et al.*, 2002). Apesar da sua localização citosólica, as cAPXs parecem ser determinantes na proteção dos plastídeos dos efeitos das EROs (Davletova *et al.*, 2005). Com efeito, Koussevitzky *et al.* (2008) verificaram que as plantas mutantes de *A. thaliana* deficientes na cAPX (*apx1*) acumulavam mais H₂O₂ e mostravam-se sensíveis à combinação do calor com a secura, ao passo que as mutantes sem as outras formas de APX não eram afetadas pelos dois fatores ambientais. O trabalho de Locato *et al.* (2009) veio confirmar que a cAPX é a mais versátil entre as formas mitocondrial e plastidial, cuja atividade contribuiu para a homeostasia redox nas culturas de células de tabaco submetidas a um choque de calor. Embora não tenham avaliado a pAPX, sabe-se de trabalho anterior que a proteção conferida pela sobre-expressão desta isoenzima (APX3) em tabaco é específica para o stress oxidativo gerado nos peroxissomas, mas não nos cloroplastos (Wang *et al.*, 1999).

O decréscimo de atividade total da APX na linha celular adaptada ao sal previa um possível aumento da atividade da CAT, dado que os peroxissomas são um dos organelos que mais contribuem para a formação do H₂O₂ durante o stress salino (Miller *et al.*, 2010). A importância das duas enzimas no controlo dos níveis de H₂O₂ e na proteção das células contra os efeitos oxidativos desta molécula foi demonstrada em diversos estudos que associaram o aumento da atividade de ambas as enzimas com a tolerância à salinidade e também a outros fatores de stress (Mittova *et al.*, 2004; Cai-Hong *et al.*, 2005; Neto *et al.*, 2006; Sekmen *et al.*, 2007; Yazici *et al.*, 2007; Arbona *et al.*, 2008; Locato *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2009). Neste trabalho verificámos que a permanência do tecido caloso adaptado em meio salino não afetou a atividade da CAT, tendo diminuído na sequência da exposição direta do tecido controlo a 150 mM de NaCl. O padrão de atividade observado em gel nativo foi concordante com os dados de espectrofotometria, mas a análise por ‘western blotting’ revelou que a quantidade da única isoforma identificada como sendo a CAT2 diminuía no tecido adaptado (Figura 3.6). Com base nestes resultados, conclui-se que a CAT2 é a forma encontrada no tecido caloso de batateira, tal como sucede no tubérculo, enquanto que nos órgãos foliares além desta foi também identificada a CAT1 (Fidalgo *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004, 2006; Almeida *et al.*, 2005).

O número de isoenzimas é variável entre as espécies, chegando nalgumas situações a variar com os tecidos analisados; por exemplo, nas folhas adultas da planta do milho foram identificadas três isoenzimas bioquimicamente distintas (CAT1, CAT2 e CAT3), encontrando-se a CAT1 e CAT3 nas células do mesófilo, e a CAT2 nas células da bainha (Scandalios, 1990; Scandalios *et al.*, 1997). Numa outra dicotiledónea também com três isoenzimas, a *N. plumbaginifolia*, a CAT1 e a CAT3 estavam distribuídas por diferentes tecidos da planta (raiz, caule, folhas e flores), enquanto que a CAT2 surgia preferencialmente no floema, daí que possa estar envolvida no processo de lenhificação (Willekens *et al.*, 1994). De facto, a CAT2 é descrita por ser expressa preferencialmente nos tecidos vasculares, embora Santos *et al.* (2004) a tenham localizado nas inclusões paracritinas nos peroxissomas das células epidérmicas e do mesófilo nas plantas de batateira crescidas sob a radiação UV-B. A função fisiológica desta isoforma não está completamente definida, ainda que os dados disponíveis apontem para o seu envolvimento na defesa contra o stress oxidativo (Santos *et al.*, 2004, 2006; Almeida *et al.*, 2005). Os nossos resultados de certa forma suportam esta ideia, na medida em que atividade da CAT2 no tecido adaptado não variou da do controlo, apesar da quantidade ser significativamente inferior, e manteve-se inalterada após a transferência do tecido para a ausência de sal surgindo, no entanto, aumentada em relação à registada no tecido sujeito a choque salino. O facto de não ter aumentado como era esperado poderá estar relacionado com as próprias características da enzima; a baixa afinidade em relação ao H₂O₂ torna-a pouco sensível a pequenas variações nos níveis desta molécula, reagindo na presença de elevadas concentrações da ERO. Segundo Mittler (2002), a CAT é particularmente importante para a remoção do excesso de H₂O₂ gerado em condições de forte stress oxidativo, o que não parece ser o nosso caso a crer na peroxidação lipídica que esteve próxima à da situação controlo. Além de que a sua distribuição na célula está restringida sobretudo aos peroxissomas, onde converte o H₂O₂ formado na fotorespiração em água e oxigénio (Miller *et al.*, 2010). De acordo com a classificação proposta para as várias isoformas da enzima e feita com base nos perfis de expressão dos genes *CAT*, essa função antioxidante cabe especificamente às catalases da classe I, predominantes nos tecidos fotossintéticos e na qual se inclui a CAT1 da batata (Willekens *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2006). Por sua vez, a CAT2 que pertence à classe II, parece ser uma enzima mais versátil ao estar associada a outros processos celulares para além da defesa e lenhificação da

parede celular, envolvendo-se também na remoção do H₂O₂ nos glioxissomas durante a senescência foliar (Santos *et al.*, 2006).

A multifuncionalidade da CAT2 provavelmente justifica o facto de ser a isoforma prevalente nos órgãos não fotossintéticos (raízes, pecíolos, brotos, tubérculos e pétalas) da planta de batateira que Santos *et al.* (2006) analisaram e nós complementámos no tecido caloso. Posteriormente, verificou-se que a CAT2 de *A. thaliana* era capaz de interagir com a proteína SOS2, um componente da via de sinalização que regula a resposta ao stress salino que, por sua vez, reage com outros fatores que fazem parte de diversas vias de sinalização incluindo a dependente do H₂O₂ (Verslues *et al.*, 2007). Esta interação da catalase com a SOS2 localizada no citosol revela um papel adicional da CAT na adaptação ao stress salino, que vai além do controlo do nível celular de H₂O₂ que afeta os componentes das vias de transdução do sinal (Azpilicueta *et al.*, 2007; Mhadhbi *et al.*, 2011).

A variação entre a atividade da CAT2 nos calos adaptado e sujeito a choque salino não foi inesperada, tendo em conta o estudo realizado por Fidalgo *et al.* (2004) em batateira onde observaram um decréscimo da atividade enzimática proporcional ao nível de salinidade imposto, que foi também registado em outras plantas expostas a stress salino e a outros fatores adversos (Balestrasse *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Parida *et al.*, 2004; Cho & Seo, 2005; Ben Amor *et al.*, 2006; Cavalcanti *et al.*, 2007). Note-se ainda que o tratamento de células em suspensão de *C. roseus* com 100 mM de NaCl inibiu consideravelmente a atividade total da CAT, que era aumentada quando as células cresciam na presença de 50 mM de NaCl (Elkahoui *et al.*, 2005). Conclui-se que a enzima é sensível à elevada salinidade, opinião partilhada por Cavalcanti *et al.* (2004, 2007) após terem verificado que a atividade decrescia nas plantas sujeitas a um tratamento com 200 mM de NaCl durante seis dias, e que fim desse tempo não recuperava para os valores normais. Perante a resposta observada, os autores admitiram que a CAT pode ter sofrido danos irreversíveis na sua estrutura, ou então, que a sua síntese terá sido muito baixa, uma hipótese também avançada por Fidalgo *et al.* (2004), tendo em conta que a salinidade interfere negativamente com a síntese proteica. Nesta perspetiva, é provável que tenha ocorrido um desequilíbrio entre a síntese da enzima e a sua degradação no tecido caloso sujeito a tratamento de choque com 150 mM NaCl que terá levado a que a atividade da CAT diminuísse neste material.

A GR e a DHAR compõem o ciclo AsA-GSH através do qual asseguram a manutenção das formas ativas da glutatona e ascorbato necessárias ao controlo efetivo do H_2O_2 nos vários organelos onde é gerado (cloroplastos, citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissomas) (Jiménez *et al.*, 1997; Foyer & Shigeoka, 2011). O aumento de atividade dessas enzimas parece ser uma resposta comum nas plantas em condições salinas, se bem que os maiores níveis de atividade sejam encontrados nas plantas que se mostram mais tolerantes ao sal (Hernández *et al.*, 2000; Cai-Hong *et al.*, 2005; Neto *et al.*, 2006; Koca *et al.*, 2007; Pérez-López *et al.*, 2009, 2010). Este comportamento também é evidenciado pelas plantas e culturas de células mantidas em condições de meio desfavoráveis, nomeadamente de excesso de certos metais pesados, ou sob concentrações elevadas de CO_2 e de ozono ou de baixas temperaturas, o que demonstra a importância das duas enzimas na proteção contra os danos oxidativos induzidos por essas condições (Verma & Dubey, 2003; Gomes-Junior *et al.*, 2006a,b, 2007; Semane *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010; Gillespie *et al.*, 2011). Porém, também se encontram na literatura referências a situações em que a atividade das enzimas não esteve relacionada com a tolerância das plantas à salinidade e a outros fatores de stress (Lee *et al.*, 2001; Aravind & Prasad, 2005; Bhargava *et al.*, 2007; Domínguez-Valdivia *et al.*, 2007; Panda & Khan, 2009). O nosso trabalho é mais um desses exemplos ao mostrar que a atividade total da GR na linha adaptada ao sal era inferior à do controlo e a mesma que foi registada no tecido caloso sujeito a tratamento de choque. Edwards *et al.* (1994) havia sugerido que o aumento de atividade total da GR ocorrido nas ervilheiras sujeitas a várias condições de stress oxidativo resultava de alterações no padrão de bandas, nomeadamente da indução de novas isoenzimas. Posteriormente, vários estudos confirmaram o aumento da atividade total da GR paralelamente à indução de isoformas específicas em resposta a diferentes fatores de stress, as quais pareciam estar envolvidas na tolerância a esses fatores (Gomes-Junior *et al.*, 2006a,b, 2007; Martins *et al.*, 2011). No nosso estudo, a redução de atividade observada nas culturas de tecido caloso expostas a 150 mM NaCl esteve associada ao desaparecimento da isoforma de maior mobilidade eletroforética (GR-3), alterando assim o padrão isoenzimático, uma vez que a atividade das bandas restantes parecia não ser afetada pelo sal. A recuperação da atividade total da enzima após a transferência do tecido adaptado para meio sem sal foi concomitante com o aparecimento da banda GR-3 no gel nativo, o que demonstra a sensibilidade desta isoforma ao sal (Figura 3.8). Da mesma forma que a GR é inibida pelos iões metálicos do tipo Cd^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{3+} se as

concentrações destes elementos no meio forem excessivas, ou por outros compostos que reagem com o grupo –SH dos tióis ligados ao centro ativo da enzima (Aravind & Prasad, 2005), é possível que esta seja também inibida pelo excesso de Na^+ e Cl^- à semelhança do que foi já comentado para as outras enzimas. E o mesmo pode ter sucedido em relação à DHAR para justificar a atividade reduzida nas linhas de tecido caloso crescidas na presença de NaCl e o facto de ter aumentado na sequência da mudança da linha adaptada para meio sem sal. Mas contrariamente à GR, a atividade da DHAR surgiu afetada pela exposição direta do tecido controlo a 150 mM de NaCl, o que leva a supor que para além do efeito iónico e osmótico da salinidade, há a possibilidade da enzima ser prejudicada pelo aumento de formação de EROs induzido pelo tratamento de choque. Como vimos, este tratamento levou a que a peroxidação lipídica aumentasse e fosse superior à ocorrida no tecido adaptado. Baseados na sensibilidade da enzima ao excesso de EROs, Knörzer *et al.* (1996) consideraram que a reduzida atividade da DHAR observada nas células em suspensão de soja em contacto com o herbicida oxifluorfen era consequência da destruição oxidativa da enzima ou da sua inativação.

Deste trabalho ressalta que a salinidade interferiu negativamente com a atividade das enzimas antioxidantes que, de um modo geral, foram afetadas pelo tratamento de choque. Neste caso, a exposição direta do tecido não adaptado a 150 mM de NaCl pode ter causado danos no sistema de defesa enzimático que o impossibilitaram de evitar a ocorrência de stress oxidativo. Apesar da salinidade ter diminuído a atividade das enzimas antioxidantes no tecido adaptado, a peroxidação lipídica não surgiu alterada em relação à situação controlo, daí que a capacidade do tecido caloso de batateira para crescer na presença de 150 mM de NaCl parece não depender de um sistema enzimático tão ativo quanto inicialmente se previa. À semelhança dos nossos resultados, outros estudos mostram que nem sempre a atividade das enzimas antioxidantes é um critério válido para avaliar a tolerância ao sal, conforme alguns autores sugeriram (Ashraf and Harris, 2004; Ashraf, 2009). Partindo da hipótese de que as enzimas antioxidantes teriam um papel ativo na tolerância das plantas de *V. unguiculata* à salinidade, Cavalcanti *et al.* (2004) verificaram que o sistema enzimático dessas plantas não foi eficaz na prevenção dos danos oxidativos indiciados pelo aumento da peroxidação lipídica e pela perda da integridade membranar. Também Noreen & Ashraf (2009) não encontraram uma relação consistente entre a resposta do sistema antioxidante e o grau de tolerância salina de diversas cultivares de ervilheira, concluindo que apenas a atividade da CAT poderia ser usada como um

indicador de tolerância à salinidade. Tendo em conta estes, e outros trabalhos (Shalata *et al.*, 2001; Rahnama & Ebrahimzadeh, 2005), conclui-se não ser possível generalizar o envolvimento do sistema enzimático na tolerância salina.

No entanto, as plantas dispõem além das enzimas atrás mencionadas de diversas moléculas com poder antioxidante. O ascorbato e a glutathiona são os principais compostos hidrossolúveis existentes nos tecidos fotossintéticos e não-fotossintéticos que podem reagir diretamente com as EROs ($^1\text{O}_2$, O_2^- e OH^-) e indiretamente, ao participarem nas principais vias de defesa do sistema antioxidante, onde interagem com a APX, DHAR e glutathiona peroxidase (GPX) no controlo dos níveis de H_2O_2 em praticamente todos os compartimentos celulares (Noctor & Foyer, 1998; Foyer & Shigeoka, 2011). O decréscimo de atividade das enzimas do ciclo AsA-GSH em condições salinas a que assistimos neste estudo poderia antever a redução dos níveis de AsA e GSH, dada a importância destes elementos como substratos nas reações de redução do H_2O_2 e do desidroascorbato catalisadas respetivamente pela APX e DHAR. Contudo, os resultados obtidos da quantificação dos dois antioxidantes não-enzimáticos mostraram que os teores totais de ascorbato (tAsA) e de glutathiona eram superiores nas culturas de tecido caloso expostas a 150 mM de NaCl, sendo na situação em que o tecido adaptado alternava para meio sem sal que se registavam os teores mais baixos de tAsA. A glutathiona quantificada neste estudo encontrava-se praticamente na forma reduzida (GSH), o que não é de estranhar tendo em conta que na maioria das situações a forma dimerizada (GSSG) representa uma fração muito pequena da glutathiona total, inferior a 5% (Schafer & Buettner, 2001). Daí que tenhamos tido dificuldades em quantificar a GSSG numa concentração tão baixa, mesmo tendo-se recorrido a uma metodologia tão sensível quanto aquela que nós usamos. Para Foyer *et al.* (2001), apenas em situações de stress extremo a taxa de oxidação da forma GSH poderá exceder a redução da GSSG e a concentração intracelular desta forma aumentar, o que parece não ter sucedido no nosso material.

Adicionalmente, verificou-se que a oxidação do ascorbato não foi afetada pela salinidade, o que fez com que a maior parte do tAsA quantificado no tecido caloso crescido na presença do sal fosse representado pela forma reduzida (mais de 50%). O desidroascorbato (DHA) e a sua forma reduzida, o ascorbato (AsA), constituem em conjunto a denominada vitamina C (Conklin, 1998). Com efeito, em situações normais, a vitamina C encontra-se nos tecidos vegetais quase exclusivamente sob a forma de AsA, a forma que está envolvida em inúmeras funções fisiológicas na célula (Smirnoff, 2000). A

função antioxidante do AsA é provavelmente a mais conhecida e que tem levado vários estudos a correlacionarem o aumento dos níveis de AsA com a tolerância à salinidade e a outros fatores ambientais adversos (Gossett *et al.*, 1996; Conklin & Barth, 2004; Arbona *et al.*, 2008; Pérez-López *et al.*, 2009, 2010). Segundo alguns autores, esse aumento contraria os efeitos tóxicos das EROs geradas pelos vários fatores e confirma a importância do metabolito na defesa contra o stress oxidativo (Parida & Das, 2005; Hideg *et al.*, 2006; Agarwal, 2007; Domínguez *et al.*, 2009, 2010). De certo modo, os nossos resultados estão em concordância com o que é documentado na literatura, uma vez que a linha adaptada ao sal apresentou um elevado teor de AsA comparativamente ao controlo (Tabela 3.7), que se refletiu numa razão AsA/DHA mais elevada, que provavelmente contribuiu para a reduzida peroxidação lipídica. Em contraste, nas plantas sujeitas a stress hídrico e a concentrações elevadas de cádmio, os decréscimos na concentração de AsA a par do aumento do conteúdo de DHA poderão justificar os elevados níveis de O_2^- e H_2O_2 e de peroxidação lipídica quantificados nessas plantas (Balestrasse *et al.*, 2001; Aravind & Prasad, 2005; Upadhyaya *et al.*, 2008).

Provavelmente, as experiências realizadas em plantas mutantes de *A. thaliana vtcl* que acumulam apenas 30% do AsA quantificado nas do tipo selvagem são aquelas que melhor caracterizam a função do AsA na proteção contra as condições ambientais adversas. Essas plantas quando expostas a stresses vários (os poluentes ozono e dióxido de enxofre, radiação UV-B e salinidade) mostraram elevados níveis de H_2O_2 e de peroxidação lipídica, reduções na taxa fotossintética e na atividade das enzimas do ciclo AsA-GSH (Conklin *et al.*, 1996, 2000; Conklin & Barth, 2004; Huang *et al.*, 2005). Curiosamente, Conklin *et al.* (1997) conseguiram restabelecer a tolerância das plantas *vtcl* a teores elevados de ozono na sequência do seu tratamento com um precursor da via biossintética do AsA (L-galactona-1,4-lactona) que elevou o teor de AsA. A aplicação exógena de AsA no tomateiro cultivado aumentou a sua tolerância ao stress salino e reduziu a peroxidação lipídica, apesar do Na^+ acumulado nos tecidos (Shalata & Neumann, 2001). Com base nestas e noutras experiências mais recentes (Athar *et al.*, 2008; Dolatabadian *et al.*, 2008; Younis *et al.*, 2010), concluímos que o AsA é um elemento importante quer na adaptação do tecido caloso à presença de NaCl a 150 mM, quer para a sobrevivência do tecido ao tratamento de choque com essa concentração salina.

À semelhança do AsA, os nossos resultados são sugestivos do envolvimento da GSH na proteção das linhas celulares dos efeitos oxidativos induzidos pela presença de NaCl, tendo

em conta os vários trabalhos que relacionaram os elevados teores de GSH observados em plantas e/ou culturas de células em condições adversas com a proteção contra o stress oxidativo (Kocsy *et al.*, 2001; Rellán-Álvarez *et al.*, 2006; Pukacka & Ratajczak, 2007, 2010; Locato *et al.*, 2008). Esta noção foi ainda corroborada pelos estudos que compararam plantas e/ou linhas celulares com diferentes graus de tolerância ao stress e revelaram que as mais tolerantes apresentavam os maiores teores de GSH (Gossett *et al.*, 1996; Devi *et al.*, 2003; Kocsy *et al.*, 2004; Arbona *et al.*, 2008). A este propósito, Tausz *et al.* (2004) consideraram que as alterações nos níveis de GSH em relação à forma oxidada podem ser um indicador do grau de stress que permite avaliar a adaptação das plantas ao seu ambiente.

Na verdade, a relação entre as formas reduzida e oxidada dos dois antioxidantes é um indicador muitas vezes utilizado para estimar o estado redox dos sistemas biológicos (Schafer & Buettner, 2001; Foyer & Noctor, 2005a; Garnczarska, 2005; Pukacka & Ratajczak, 2007, 2010). Os pares AsA/DHA e GSH/GSSG, mais do que os níveis de tAsA ou de glutathiona, por influenciarem o estado redox das células estão envolvidos em diversos processos fisiológicos nas plantas, incluindo a regulação do ciclo celular e desenvolvimento da planta, a atividade de determinadas proteínas, a regulação da expressão genética e até da morte celular (Noctor *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2004b,c; Potters *et al.*, 2002, 2010). O controlo do estado redox nos diferentes compartimentos da célula é essencial para preservar a integridade das estruturas celulares e para o funcionamento adequado das várias vias metabólicas. O AsA e a GSH participam na regulação redox não só através do controlo direto dos níveis de EROs, mas também através da ativação de vários mecanismos de defesa da célula, dado o seu envolvimento na sinalização (Szalai *et al.*, 2009; Foyer & Shigeoka, 2011). As alterações no estado de redução do AsA e da GSH sinalizam o stress e induzem a expressão de vários genes relacionados com a defesa, inclusive dos genes que codificam as enzimas da própria via biossintética da GSH (Kocsy *et al.*, 2001; Conklin & Barth, 2004; Noctor, 2006; Meyer, 2008). Os resultados disponíveis evidenciam o aumento da síntese de glutathiona e consequente acumulação em resposta à oxidação do metabolito induzida pela exposição de plantas e/ou linhas celulares a condições desfavoráveis. Nestas condições, os transcritos e a atividade das enzimas envolvidas na biossíntese da GSH aumentam, levando à sua acumulação (Gupta *et al.*, 1991; Gossett *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 2004b; Mittova *et al.*, 2003; Kocsy *et al.*, 2004). Embora não tenhamos analisado o comportamento de nenhuma

das enzimas da via biossintética da GSH, verificámos que a atividade da GR que reduz a GSSG foi diminuída pela salinidade, daí que a acumulação de GSH nas culturas de tecido caloso crescidas na presença de NaCl tenha provavelmente resultado da ativação da síntese do metabolito. Esta hipótese é reforçada se atender-se a que os níveis de GSH decresceram quando o tecido adaptado foi subcultivado na ausência de NaCl. May e Leaver (1993) já tinham demonstrado que a capacidade das células em suspensão de *A. thaliana* para resistirem ao stress oxidativo dependia da síntese de novo de GSH. Desta forma também é assegurada a manutenção de níveis de GSH apropriados para a atividade das enzimas (GPX e GST) que utilizam o metabolito na remoção das EROs e dos produtos da peroxidação lipídica (Kocsy *et al.*, 2001; Gossett *et al.*, 1996; Mittova *et al.*, 2003; Szalai *et al.*, 2009).

Uma das principais funções da GSH nas plantas consiste na sua capacidade para regenerar o ascorbato por via do ciclo AsA-GSH (Smirnoff & Wheeler, 2000). Alguns estudos têm mostrado a importância da atividade da APX, MDHAR, DHAR e GR na regulação do teor de AsA nas células em situações adversas (Gossett *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 2004a; Pukacka & Ratajczak, 2007, 2010; Locato *et al.*, 2009). Acontece, neste trabalho, que as atividades das enzimas APX, DHAR e GR surgiram diminuídas pela salinidade, apesar da disponibilidade de GSH. É conhecida a capacidade da GSH para reduzir rapidamente o DHA em AsA através de uma reação não-enzimática a pH alcalino (Noctor *et al.*, 1998); no entanto, acreditamos que as alterações nos níveis de tAsA e na razão AsA/DHA observadas nos calos em condições salinas resultem do aumento da síntese de AsA. Refira-se ainda que a divisão e a expansão celulares são dois processos fundamentais para o crescimento do tecido caloso e que requerem a presença de AsA, pelo que é possível que esteja ativa a via biossintética de AsA no tecido caloso (Davey *et al.*, 2000).

A reduzida atividade da APX não terá contribuído significativamente para a oxidação do AsA, que poderia ser oxidado pelo O_2^- ou pelos radicais tocoferoxilo resultantes da reação do α -tocoferol com os produtos da peroxidação lipídica (Smirnoff & Wheeler, 2000). O AsA assume assim um papel adicional ao intervir na regeneração do α -tocoferol, contribuindo desta forma para a proteção membranar (Beyer, 1994). Pois o α -tocoferol além de cooperar com o AsA e a GSH na redução dos níveis de EROs (principalmente do 1O_2 e OH^-), reduz os radicais lipídicos derivados da oxidação dos ácidos gordos polinsaturados das membranas, impedindo a propagação do processo oxidativo (Blokhina

et al., 2003). A sua localização exclusiva nos plastídeos protege estes organelos dos efeitos oxidativos que são frequentes em condições que limitam a fixação fotossintética do CO₂, pelo que nestas situações os níveis de α -tocoferol surgem alterados. De facto, o conteúdo de α -tocoferol aumentou em várias plantas sujeitas a condições de secura e salinidade, e mesmo quando expostas a excesso de metais como o cobre e cádmio, verificando-se nestes casos que o α -tocoferol está envolvido na tolerância ao stress oxidativo (Munné-Bosch & Alegre, 2000a,b, 2002a, 2003; Abbasi *et al.*, 2007; Collin *et al.*, 2008). Em geral, as plantas tolerantes ao sal apresentam níveis superiores de α -tocoferol do que as mais sensíveis, que se refletem num menor grau de peroxidação lipídica (Gossett *et al.*, 1994a; Ellouzi *et al.*, 2011). Os nossos resultados corroboram esta tendência, uma vez que foi na linha adaptada que se registou o teor mais elevado de α -tocoferol e os níveis mais baixos de malondialdeído. Ellouzi *et al.* (2011) explicaram a relação entre o α -tocoferol acumulado e os baixos níveis de MDA observados nas folhas da halófita *C. marítima* salinizada com base no facto deste produto da peroxidação lipídica poder ativar os genes envolvidos na síntese do antioxidante que, por sua vez, impede a propagação da reação oxidativa.

Os níveis endógenos de α -tocoferol variam em resposta às situações adversas como resultado de alterações na expressão dos genes relacionados com a via biossintética do composto, ou resultado da sua degradação e regeneração (Munné-Bosch, 2005). No tecido adaptado à salinidade admitimos que tenha havido um aumento da síntese do α -tocoferol, que levou-o a acumular-se e a contribuir para a estabilidade e proteção das membranas da peroxidação lipídica. Certamente que a disponibilidade de AsA no tecido terá facilitado a regeneração do α -tocoferol das formas oxidadas e contribuído para o valor final registado, contrariamente às plantas mutantes *vtc1* que em situações de secura apresentaram níveis reduzidos de α -tocoferol devido à falta de AsA (Munné-Bosch & Alegre, 2002b). Porém, o facto do teor do antioxidante baixar para valores controlo quando o tecido adaptado foi transferido de meio salino para a ausência de sal reforça a hipótese do sal ativar a síntese do α -tocoferol. É possível que no tecido caloso sujeito a tratamento de choque com NaCl tenha também ocorrido um aumento da síntese do composto, no entanto, esse aumento pode não ter sido suficiente para evitar a peroxidação lipídica e eventuais danos oxidativos. Ou, em alternativa, a degradação do α -tocoferol neste tecido excedeu a sua síntese, o que fez com os níveis quantificados fossem inferiores aos do tecido adaptado. Segundo Munné-Bosch (2005), este tipo de resposta é característico de situações de stress intenso em que a

elevada formação de EROs pode levar à degradação do α -tocoferol, uma vez que este não é recuperado a partir de alguns produtos da sua oxidação (ex. α -tocoferol quinona).

O efeito da salinidade na atividade das enzimas antioxidantes sugere que o α -tocoferol, juntamente com os antioxidantes AsA e GSH, e a prolina foram importantes para o restabelecimento da homeostasia redox no tecido caloso crescido na presença de NaCl. Munné-Bosch (2005) evidenciaram que existem diversos mecanismos na célula que conferem proteção antioxidante, e quando um deles se torna limitante é compensado pelo aumento de outros. Neste estudo, a divergência das respostas das enzimas antioxidantes minimiza a sua importância na proteção do tecido caloso de batateira à salinidade, podendo admitir-se que o sistema antioxidante enzimático não contribuiu para a adaptação salina do tecido, mas foi de certo modo compensado pelo aumento do sistema não-enzimático que se revelou determinante na resposta adaptativa ao sal.

3.2. Estudos em tecido caloso adaptado a 150 mM NaCl

3.2.1. Análise ultraestrutural

A análise de imagens de microscopia eletrónica de transmissão mostrou que a organização geral das células do tecido caloso crescido na presença de 150 mM NaCl não diferiu da das células do tecido controlo. Em ambas as situações eram visíveis células muito vacuolizadas, com o citoplasma denso a ocupar uma estreita faixa adjacente à parede celular, onde podiam observar-se os organelos e estruturas que são comuns neste tipo de células (Figuras 3.12A–B e 3.14A–B).

Apesar da condição salina não ter afetado a integridade estrutural das células, o estudo ultraestrutural mostrou a ocorrência de algumas diferenças comparativamente às células do tecido caloso controlo, em particular no que se refere à estrutura dos plastídios. De facto, os plastídios presentes nas células do tecido caloso crescido na presença de NaCl surgiam menos diferenciados do que no tecido controlo, com um sistema lamelar menos desenvolvido, caracterizado pela presença de poucos grana que eram, por sua vez, formados por poucos tilacóides (comparar Figura 3.13A–B com Figuras 3.14C e 3.15), características estruturais que levam a que se possam designar estes plastídios por agranares. Por vezes, nestes plastídios, podiam observar-se corpos prolamelares, como ilustrado na Figura 3.15A, o que sugere o menor grau de diferenciação destes plastídios

comparativamente com os que se observavam nas células do tecido caloso controlo. De notar ainda que os plastídios presentes nas células do tecido crescido na presença de NaCl apresentavam com frequência uma forma arredondada em vez da lobada, a forma mais comum dos plastídios das células do tecido caloso controlo (Figuras 3.13A–B e 3.15B–C).

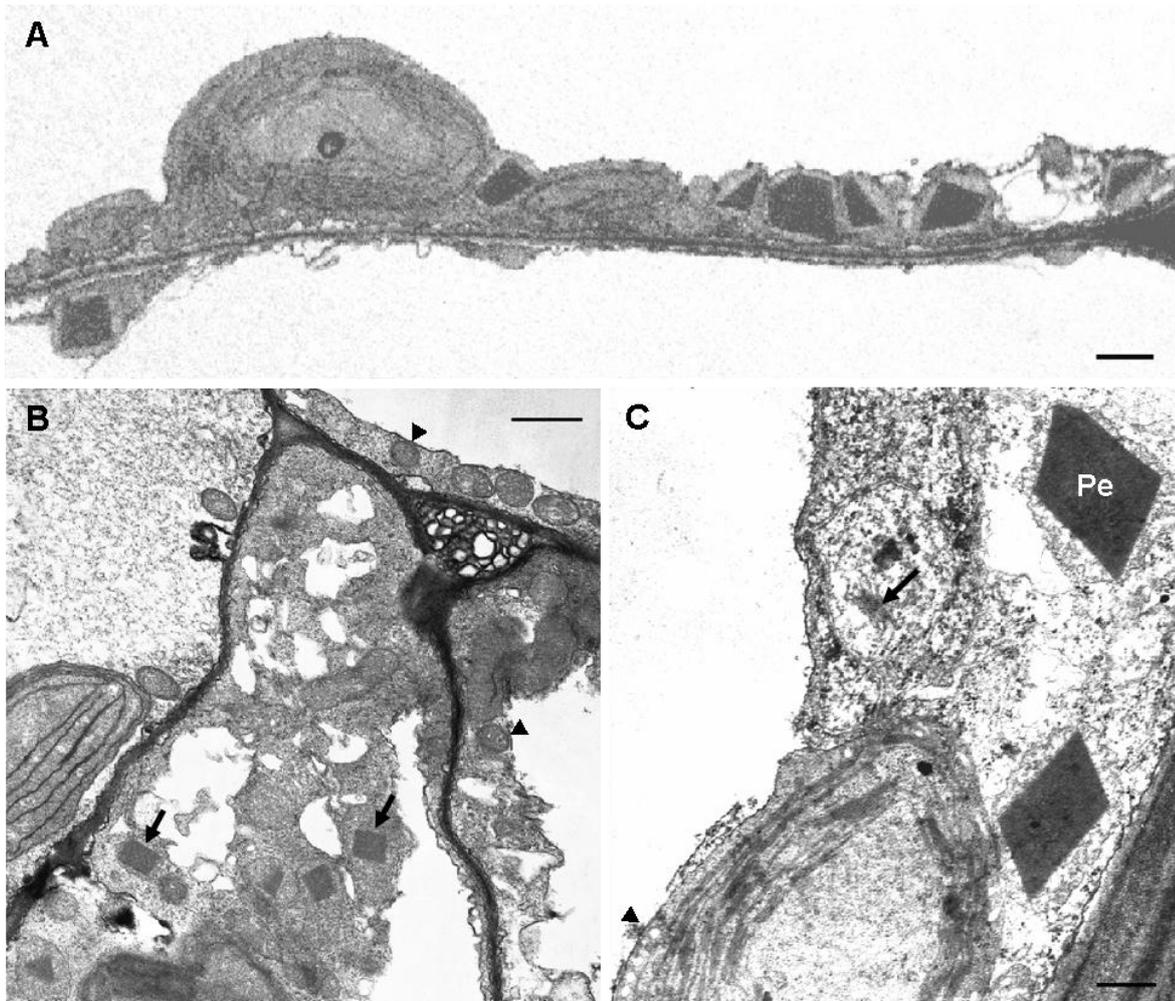


Figura 3.12 – Aspectos ultraestruturais de tecido caloso controlo. A) Porção de célula vacuolizada onde se pode observar na estreita faixa de citoplasma várias estruturas celulares (Barra: 1 μm). B) Aspecto da organização das células controlo mostrando vários peroxissomas com inclusão paracristalina (setas) e mitocôndrias (pontas de setas) (Barra: 1 μm). C) Porção da célula onde se observa parte de plastídio isento de amido, em que a presença de pequenas vesículas é notória na periferia do organelo (ponta de seta); no citoplasma vêem-se ainda peroxissomas com inclusão paracristalina (Pe) e distingue-se a presença de dictiossoma (seta) (Barra: 1 μm).

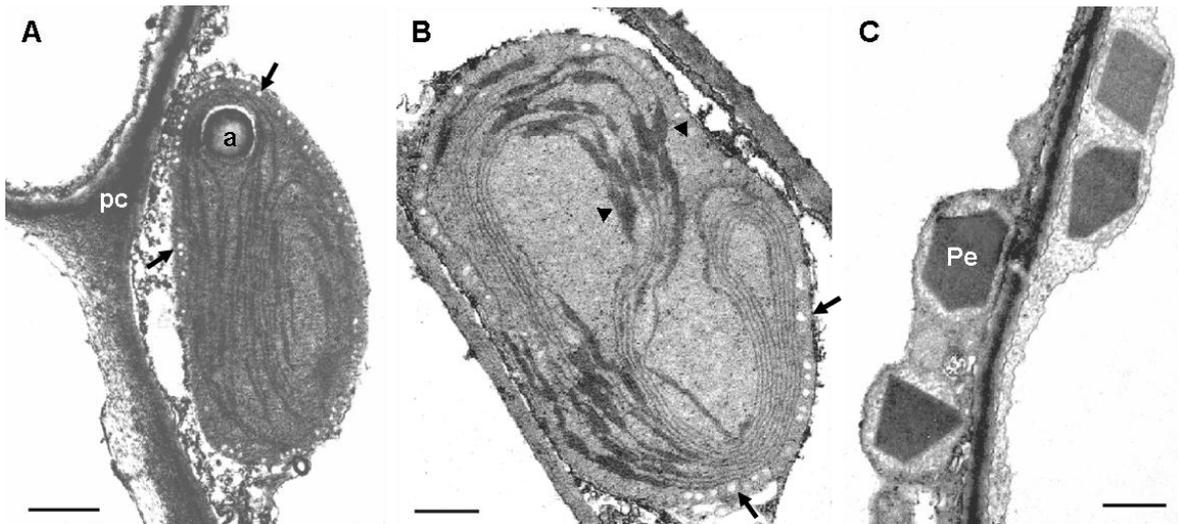


Figura 3.13 – Aspectos ultraestruturais de tecido caloso controle. A) Vista de plastídio em que além das vesículas que surgem com frequência (setas), é detetado um pequeno grão de amido (a); pc – parede celular (Barra: 1 μ m). B) Perfil de plastídio mostrando sistema lamelar organizado em grana (pontas de setas) e lamelas intergranares, acompanhado pela presença de vesículas (setas); notar a ausência de amido (Barra: 0,5 μ m). C) Pormenor que evidencia a presença de numerosos peroxissomas (Pe) que têm no estroma formações paracrystalinas (Barra: 1 μ m).

Nos plastídios das células do tecido caloso crescido em meio salino, o estroma apresentava-se pouco denso, observando-se vulgarmente a presença de amido. Como ilustrado na Figura 3.15, estes plastídios mostravam em geral mais do que um grão de amido por perfil de plastídio, de dimensões variáveis, deixando por vezes o estroma reduzido a uma fração mínima do organelo, à semelhança da morfologia dos cloroamiloplastos.

Dado que as imagens ultraestruturais sugeriam a existência de diferenças a nível do teor de amido entre o tecido caloso controle e o adaptado a NaCl (comparar Figura 3.13B com Figura 3.15B), realizou-se um estudo morfométrico, em que se determinou o volume fracional do amido em relação aos plastídios e o volume fracional destes organelos. Com efeito, a análise morfométrica ultraestrutural realizada revelou que o volume fracional do organelo (V_v plastídio) era semelhante entre as duas situações, mas o volume fracional do amido em relação aos plastídios (V_v amido/plastídio) era significativamente superior nas células do tecido adaptado (cerca de 108%), o que reflete um aumento da quantidade de amido nestas células (Tabela 3.8), como sugeriam as imagens ultraestruturais. O número médio de grãos de amido em cada plastídio era também superior nas células do tecido adaptado do que no controle (Tabela 3.8). No estroma dos plastídios das células controle com alguma frequência podiam observar-se numerosas vesículas próximas do invólucro

plastidial (Figuras 3.12C e 3.13A–B). Em contraste, nos plastídios das células adaptadas a ocorrência de tais vesículas não foi notada.

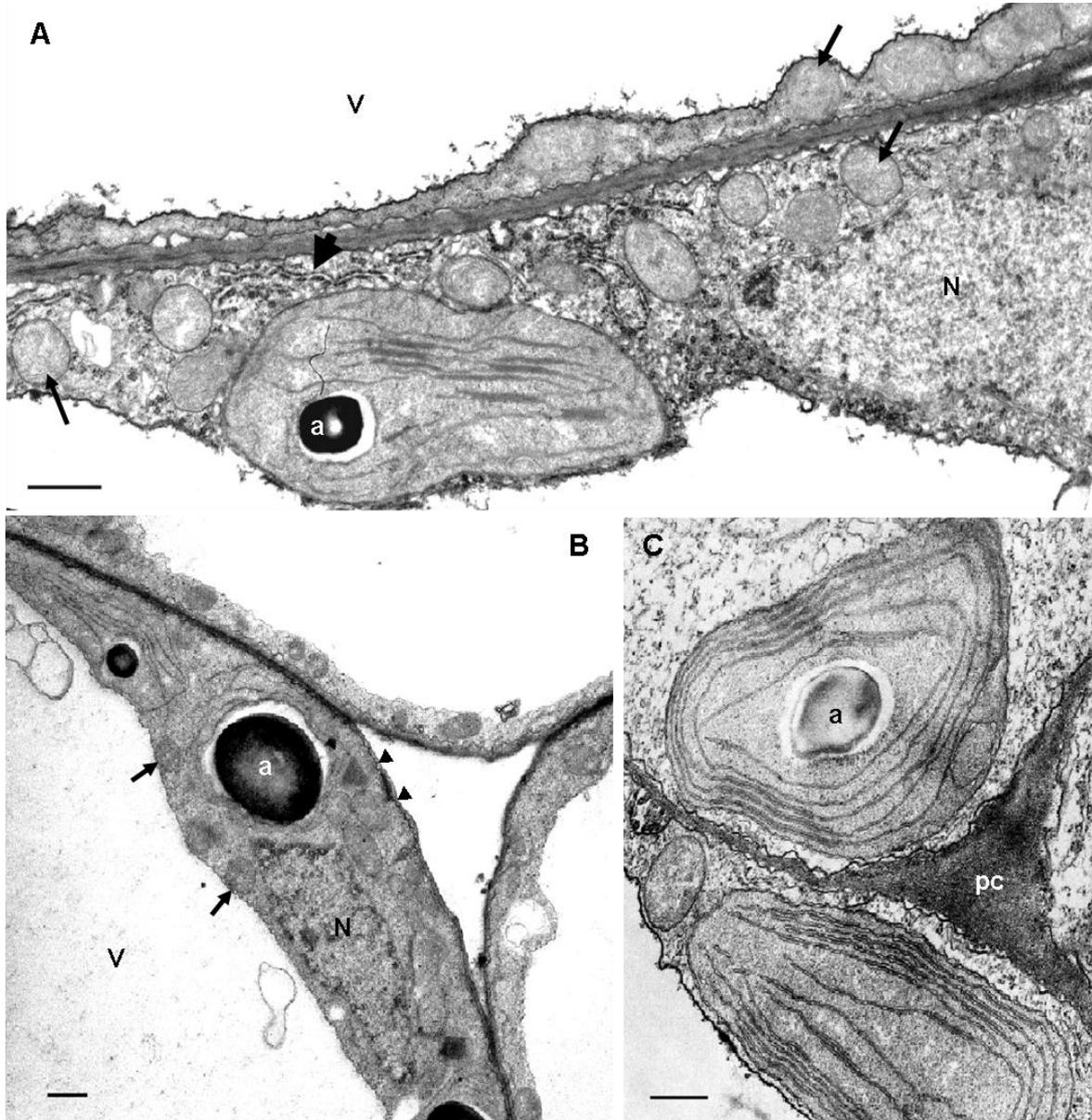


Figura 3.14 – Aspectos ultraestruturais de tecido caloso adaptado ao sal. A) Porção de células vacuolizadas, podendo observar-se numa delas parte do núcleo (N) e plastídio com um nível de organização inferior ao dos plastídios do tecido caloso controle, possuindo amido (a); no citoplasma de ambas as células podem ver-se várias mitocôndrias (setas), sendo visível numa das células alguns perfis de retículo endoplasmático rugoso (seta curta). V – vacúolo (Barra: 1 μ m). B) Região de contacto de três células que evidencia a organização geral do citoplasma, onde se encontram organelos bem preservados, como núcleo (N), plastídios contendo amido (a), mitocôndrias (setas) e peroxissomas (pontas de setas). V – vacúolo (Barra: 1 μ m). C) Zona de contacto entre células na qual se observam plastídios com sistema lamelar pouco desenvolvido, caracterizado pela ausência de grana. a – amido; pc – parede celular (Barra: 1 μ m).

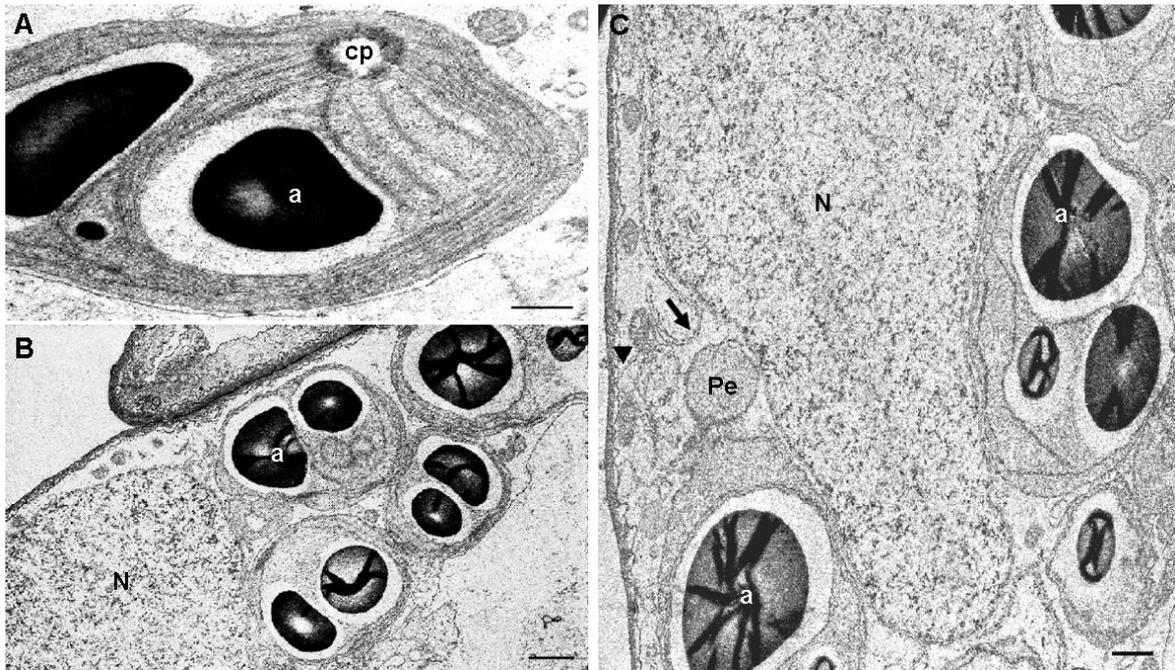


Figura 3.15 – Aspectos ultraestruturais de tecido caloso adaptado ao sal. A) Plastídio onde se distingue corpo prolamelar (cp) e volumosos grãos de amido (a); de notar que o sistema lamelar mostra um grau de diferenciação inferior ao do material controle (Barra: 0,5 μ m). B) Porção da célula onde se pode observar parte do núcleo (N) e plastídios de forma arredondada contendo grãos de amido (a) (Barra: 1 μ m). C) Imagem na qual se vê núcleo (N), vários plastídios com amido (a), mitocôndrias (ponta de seta), podendo observar-se ainda no citoplasma a presença de retículo endoplasmático (seta) próximo de peroxissoma desprovido de inclusão paracristalina (Pe) (Barra: 1 μ m).

Uma outra alteração ultraestrutural encontrada no tecido adaptado a 150 mM de NaCl consistia na presença de menor número de peroxissomas do que no tecido controle, tendo-se registado uma diferença de cerca de 49%. Acresce que os peroxissomas com inclusões paracristalinas também eram pouco abundantes nas células do tecido adaptado (Figuras 3.14B e 3.15C), contando-se que apenas 26% dos peroxissomas tinham formações paracristalinas, a contrastar com os 77% quantificados nas células do tecido controle (Tabela 3.8; Figuras 3.12C e 3.13C).

As restantes estruturas celulares, nomeadamente mitocôndrias, apresentavam um aspeto normal e semelhante ao observado nas imagens de tecido caloso controle.

Tabela 3.8 – Volume fracional (Vv) dos plastídios e do amido em relação aos plastídios (Vv amido/plastídio), número de grãos de amido por plastídio, e peroxissomas com inclusão paracristalina no tecido caloso controlo e adaptado a 150 mM de NaCl.

Condições de cultura	Vv plastídio (μm^2)	Vv amido/plastídio	Nº de grãos de amido/plastídio	Peroxisomas com inclusão paracristalina (%)
Controlo	$12,65 \pm 0,22^a$	$0,12 \pm 0,01^a$	$1,02 \pm 0,16^a$	$76,97 \pm 5,04^a$
150 mM	$11,19 \pm 0,95^a$	$0,25 \pm 0,02^b$	$2,41 \pm 0,23^b$	$25,88 \pm 2,35^b$

Valores expressos como médias \pm E.P.. Em cada coluna os valores assinalados com diferentes letras são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

O estudo ultraestrutural realizado permitiu verificar que a salinidade não afetou a integridade estrutural das células do tecido caloso, nem causou danos em organelos ou nas estruturas membranares. As membranas celulares são um dos principais alvos da ação das EROs cuja formação é induzida em situações de stress, pelo que um dos efeitos da salinidade é causar alterações nessas estruturas (Meloni *et al.*, 2003; Parida & Das, 2005). Embora não tenhamos notado alterações nas membranas das células da condição salina, o mesmo não aconteceu nas culturas de *Dactylis glomerata* em que a exposição a 200 mM de NaCl induziu a rutura da membrana plasmática e a invaginações desta estrutura, indiciando a ocorrência de plasmólise nas células (Dutta Gupta, 2007). O fenómeno de plasmólise associado ao aumento da vesiculação no citoplasma foram também observados nas células da halófito *A. nummularia* e de plantas do arroz sujeitas a um tratamento de choque com 400 mM de NaCl, o que sugere que a suscetibilidade das membranas ao sal resulta não só do efeito iónico mas sobretudo do efeito osmótico causado pelo excesso de sal (Niu *et al.*, 1996; Pareek *et al.*, 1997). Porém, as alterações ultraestruturais observadas a nível do sistema membranoso dos cloroplastos, comuns a várias plantas expostas a tratamentos salinos, são frequentemente associadas ao stress oxidativo induzido pela salinidade. Assim consideraram Mitsuya *et al.* (2000) após terem observado que ocorria degradação das membranas dos tilacóides nos cloroplastos da planta de batata-doce crescida em meio salino. Numa outra solanácea, *S. tuberosum*, Fidalgo *et al.* (2004) evidenciaram que a dilatação dos tilacóides e a desorganização do sistema lamelar nos cloroplastos das plantas tratadas com 200 mM de NaCl poderiam ser consequência do stress oxidativo ocorrido nessas plantas. O envolvimento das EROs nas alterações ultraestruturais observadas nos cloroplastos das ervilheiras sujeitas a elevada salinidade já

havia sido sugerido por Hernández *et al.* (1995), após terem verificado o aumento da peroxidação lipídica e a acumulação de H₂O₂ nesses organelos. No entanto, Yamane *et al.* (2003) ao compararem os efeitos da salinidade com os da secura na ultraestrutura dos cloroplastos sugeriram que a dilatação dos tilacóides era provocada pelo efeito iônico do NaCl, enquanto que o efeito osmótico seria responsável pela rutura do invólucro plastidial, sendo ambos os fatores indutores da formação de EROs.

Apesar de alguma controvérsia, num estudo mais recente, Wu *et al.* (2009) demonstraram a relação entre o stress oxidativo e os danos em cloroplastos e em mitocôndrias. Pois, além dos cloroplastos, foram detetadas alterações nas mitocôndrias de plantas crescidas em ambientes salinos, traduzidas pela matriz pouco densa e redução das cristas mitocondriais (Hernández *et al.*, 1993; Pareek *et al.*, 1997; Mitsuya *et al.*, 2000; Miyake *et al.*, 2006). Não é de estranhar essa relação tendo em conta que os cloroplastos e as mitocôndrias são importantes locais de formação das EROs nas células vegetais, daí estes organelos surgirem afetados pelas reações de oxidação (Miller *et al.*, 2010). Por outro lado, os resultados disponíveis mostram que as modificações ultraestruturais induzidas pela salinidade nesses organelos e por outras situações adversas são mais pronunciadas nas plantas sensíveis do que nas tolerantes, porque se admite que estas dispõem de um sistema de defesa antioxidante mais eficaz (Hernández *et al.*, 1993, 1995; Salama *et al.*, 1994; Miyake *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008). Nesta perspetiva, o facto de não termos notado alterações acentuadas na ultraestrutura das células do tecido caloso crescido na presença de 150 mM de NaCl em relação às células controlo, poderá indicar que o tecido está adaptado à condição salina do meio de cultura, o que é consentâneo quer com o seu aspeto macroscópico, quer com a reduzida peroxidação lipídica registada. À mesma conclusão chegaram Niu *et al.* (1996) quando verificaram que a ultraestrutura das células foliares das plantas expostas a 400 mM de NaCl, após vários dias de tratamento, era comparável com a das células das plantas não tratadas. Neste caso, os autores verificaram que o sal induziu alterações nos mecanismos que regulam a entrada de Na⁺ e Cl⁻ e a sua distribuição pela planta. No nosso caso, os elevados teores dos antioxidantes prolina e α -tocoferol quantificados nas células crescidas em meio salino poderão ter protegido as membranas e os outros componentes celulares da oxidação, além de contribuírem juntamente com o AsA e GSH acumulados para o equilíbrio redox nessas células. É de admitir que a prolina enquanto soluto compatível tenha tido também um papel ativo no ajustamento osmótico das células adaptadas, mas a elevada quantidade de amido detetada nos plastídios dessas

células poderá ter contribuído para ajustar o equilíbrio osmótico em face da perda de água que o tecido adaptado sofreu. Resposta semelhante foi observada numa linha celular de *Citrus* adaptada a 100 mM, em que o número de amiloplastos era superior ao das células não adaptadas (Ferreira & Lima-Costa, 2008). O aumento do teor em amido nas células crescidas em meio salino observado no nosso estudo, poderá estar relacionado com a maior necessidade de energia para manter essas células em cultura, uma vez que a adaptação ao sal envolve o aumento da síntese e acumulação de prolina e de outros osmólitos orgânicos, bem como a compartimentação intracelular dos iões Na^+ e Cl^- (Zhu, 2001; Munns & Tester, 2008). Huang & Liu (2002) já haviam relatado a síntese e acumulação de amido em culturas de tecido caloso em condições de stress osmótico e a reduzida atividade das enzimas envolvidas na sua degradação.

Se no sistema *in vitro* o teor de amido parece ser importante para a adaptação das células à condição salina, na situação *in vivo* a resposta tem sido variável. Quando Salama *et al.* (1994) analisaram os efeitos da salinidade na ultraestrutura de diferentes cultivares de trigo, viram que as mais tolerantes continham mais amido do que as sensíveis. Mas esta resposta não se estendeu às ervilheiras tolerantes ao sal, nem às batateiras expostas a elevada salinidade e à radiação UV-B (Hernández *et al.*, 1995; Fidalgo *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004). A diferença entre os dois sistemas experimentais em termos de acumulação do amido, e desde que se trate de tecido não fotoautotrófico, poderá ser explicada pelo facto dos plastídios presentes nas culturas *in vitro* não terem capacidade fotossintética e sintetizarem o amido a partir da sacarose do meio de cultura, daí o acumularem, enquanto nas plantas em situações adversas a diminuição do teor de clorofilas e a menor assimilação fotossintética do CO_2 dificultam a síntese do polissacárido (Santos *et al.*, 2004).

Um aspeto adicional nos plastídios das células crescidas na presença de NaCl consistia no sistema lamelar menos desenvolvido que apresentavam, caracterizado pela reduzida presença de grana formados por poucos tilacóides. Em geral, as condições de crescimento que existem nas culturas *in vitro* não são adequadas ao desenvolvimento de cloroplastos, embora estes se possam formar quando certas condições são convenientemente manipuladas (Husemann, 1985). Porém, os plastídios do tecido caloso controlo mostravam um sistema membranoso mais desenvolvido, acompanhado pela acumulação de vesículas no estroma que estavam ausentes no tecido adaptado, diferenças que levam a supor que a presença do sal limitou o processo de diferenciação do organelo. Por um lado, consideramos que as vesículas localizadas preferencialmente à periferia do estroma possam

participar na formação dos tilacóides ao transportarem até estas estruturas os lípidos sintetizados na membrana interna do invólucro plastidial, estando assim envolvidas na diferenciação dos plastídios (Westphal *et al.*, 2001; Andersson & Sandelius, 2004). Por outro, sabe-se que as situações de stress afetam o desenvolvimento dos grana, por interferirem negativamente com a síntese de proteínas, bem como com a formação e acumulação de clorofilas e ribossomas (Feierabend & Schrader-Reichhardt, 1976; Abdelkader *et al.*, 2007). Acrescente-se ainda que a forma esférica e a matriz menos densa que frequentemente observamos a nível plastidial nas células crescidas na presença de NaCl, foram também observadas em cloroplastos das folhas de *L. esculentum* pulverizadas com uma solução a simular a chuva ácida e das folhas de bétulas expostas a elevados níveis de ozono, o que parecem ser sintomas não específicos de vários fatores de stress (Pääkkönen *et al.*, 1995; Gabara *et al.*, 2003).

Uma modificação ultraestrutural detetada nas células adaptadas a NaCl que não é vulgarmente descrita nas plantas expostas a condições salinas consistiu na presença esporádica de peroxissomas contendo inclusões paracristalinas comparativamente ao material controlo, onde essas estruturas eram mais abundantes. De facto, são muito poucas as referências na literatura que relatam alterações a nível dos peroxissomas e, curiosamente, as disponíveis baseiam-se em trabalhos feitos na batateira (Santos *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2005). Mas, enquanto que nas folhas expostas à radiação UV-B ou pulverizadas com solução de H₂O₂ os peroxissomas com formações paracristalinas aumentavam comparativamente aos respetivos controlos (Santos *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2005), no tecido caloso crescido em condições de salinidade diminuía. Os autores correlacionaram a abundância destas estruturas com a maior atividade da CAT2 registada nas plantas tratadas, dado Santos *et al.* (2004) terem mostrado que a CAT2 era o componente proteico das inclusões paracristalinas. Como referimos, no tecido caloso adaptado ao sal ocorreu um menor número de peroxissomas contendo essas formações (26%) em relação ao quantificado no material controlo (77%), resultado que pode ser relacionado com a menor quantidade de CAT2 detetada. O paralelismo observado entre o aumento da atividade da CAT e a presença das inclusões paracristalinas nos peroxissomas das folhas de batateira sujeitas a stress, pode ser explicado com base no efeito que o H₂O₂ tem na indução da expressão dos genes da catalase (*CAT*) e dos genes *PEX* envolvidos na biogénese de peroxissomas (Polidoros & Scandalios, 1999; Guan *et al.* 2000; Guan & Scandalios, 2000; Lopez-Huertas *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2005). Considerando os

resultados do nosso estudo que mostram que no tecido caloso adaptado ocorre um paralelismo entre a diminuição da atividade da CAT e a baixa ocorrência de peroxissomas com inclusões paracristalinas, poder-se-á inferir que provavelmente este resultado é consequência do impacto negativo que a salinidade tem na síntese proteica, tendo em conta os resultados obtidos no tecido caloso controlo.

Do estudo ultraestrutural realizado sobressai que a condição salina não modificou a organização geral das células, e as alterações que são com mais frequência referidas na literatura em plantas expostas a ambientes salinos, nomeadamente a nível dos cloroplastos e mitocôndrias, não foram encontradas nas células adaptadas, o que está em concordância com o aspeto macroscópico do tecido e com a maior parte das respostas avaliadas a nível bioquímico. Apesar da escassez de estudos realizados em linhas celulares tolerantes ao sal, o presente trabalho contribuiu para elucidar as principais alterações ultraestruturais induzidas pelo NaCl no tecido caloso de batateira, sendo que uma delas, a acumulação de amido, parece ser bastante relevante para a adaptação das células à salinidade, não só pela sua importância ao contribuir para o equilíbrio osmótico, mas também como suporte adicional como fonte de energia.

3.2.2. Estudo do transporte transmembranar de Na⁺ em vesículas de tonoplasto

Para o estudo do transporte e compartimentação vacuolar do Na⁺ foram utilizadas vesículas de membrana vacuolar previamente isoladas de culturas de tecido caloso controlo e adaptado a 150 mM de NaCl. Desde os trabalhos pioneiros de Kaback (1974) que o uso de vesículas de membrana constitui um modelo experimental para o estudo dos sistemas de transporte membranar. As abordagens experimentais com vesículas de membrana possibilitam a manipulação da composição química do meio intravesicular, bem como do gradiente elétrico transmembranar, evitando as limitações associadas com os estudos em células inteiras onde o metabolismo pode interferir com o processo de transporte (DuPont *et al.*, 1982). Adicionalmente, torna-se possível avaliar com maior precisão a influência do gradiente elétrico e de pH no transporte do substrato. Recorrendo a vesículas seladas de tonoplasto já foram funcionalmente caracterizados diversos sistemas de transporte do tipo antiporte Na⁺/H⁺ de espécies diversas como *B. vulgaris*, *H. vulgare* e *Plantago* (Blumwald & Poole, 1985; Garbarino & DuPont, 1988; Staal *et al.*, 1991).

O primeiro passo para a obtenção de vesículas de membrana vacuolar consistiu no isolamento de frações de tonoplasto com elevado grau de pureza. Para tal, o tecido caloso

foi sujeito a um processo de rutura e o homogeneizado resultante foi fracionado por centrifugações diferenciais consecutivas; a fração microsomal obtida foi separada num gradiente de densidade descontínuo e, no final, conseguiu-se recuperar a fração vacuolar (ver secção 2.3.2.1.). Para avaliar a pureza das frações vacuolares obtidas mediram-se as atividades hidrolítica e de bombeamento da V-H⁺-ATPase na presença de inibidores específicos. A hidrólise de ATP a pH 7,2 (pH ótimo da V-H⁺-ATPase) não foi alterada pela azida, um inibidor da ATPase do tipo F mitocondrial, ao passo que o vanadato, conhecido por inibir a ATPase do tipo P da membrana plasmática, reduziu os valores de atividade hidrolítica total em cerca de 13%. Quando a medição foi feita na presença de nitrato (KNO₃), um inibidor da V-H⁺-ATPase, verificou-se uma redução de aproximadamente 72%. Adicionalmente, os ensaios de atividade de bombeamento da V-H⁺-ATPase realizados na presença dos inibidores mostraram que a atividade era completamente inibida pela adição de KNO₃ à mistura de reação, mantinha-se inalterada pela adição de azida, e sofria uma redução de apenas 5% quando era adicionado o vanadato comparativamente ao ensaio controlo efetuado na ausência dos inibidores (ver secção 2.3.2.2.). No seu conjunto, os resultados sugerem que as frações membranares usadas neste estudo encontravam-se enriquecidas em membranas vacuolares, tendo um baixo grau de contaminação com outras membranas celulares.

Uma vez purificadas, as membranas formam espontaneamente vesículas seladas em solução aquosa, condição essencial para se avaliar a atividade biológica das proteínas transportadoras (Kaback, 1974). Assim, para esse efeito, utilizou-se a sonda ACMA, cuja fluorescência diminui perante a redução do pH intravesicular, um fenómeno que foi usado para medir a atividade de bombeamento de H⁺ da V-H⁺-ATPase e da V-H⁺-PPase após a adição de ATP e PPi, respetivamente. Por sua vez, a atividade do antiportador Na⁺/H⁺ pode ser identificada pelo aumento da fluorescência do ACMA, por se dissipar o gradiente de H⁺ criado pelas duas bombas, promovendo-se a alcalinização do meio intravesicular.

3.2.2.1 Determinação da atividade da V-H⁺-ATPase e V-H⁺-PPase e análise por ‘western blotting’

Os efeitos da adição de 0,05–1 mM de ATP e de 2–100 µM de PPi à suspensão de vesículas de tonoplasto isoladas dos calos controlo e adaptado ao sal podem ser observados, respetivamente, nas Figuras 3.16 e 3.17. Como se pode constatar, na sequência da energização das membranas vacuolares com diferentes concentrações de ATP (Figura

3.16A) ou PPI (Figura 3.17A), o sinal de fluorescência do ACMA diminuiu e, quando o sinal estabilizou a adição de NH_4Cl 1,5 mM promoveu a recuperação imediata da fluorescência, por se dissipar o gradiente de H^+ gerado por ambas as bombas. Refira-se que a V- H^+ -PPase requer o ião Mg^{2+} , mas em elevadas concentrações este pode precipitar com o PPI (Rea & Poole, 1993). Nesta perspetiva, analisou-se a influência de diferentes concentrações de Mg^{2+} na atividade de bombeamento de H^+ da V- H^+ -PPase. Como se pode observar na Figura 3.17A (encaixe), a concentração de 5 mM parece a mais adequada para se estudar a atividade da enzima.

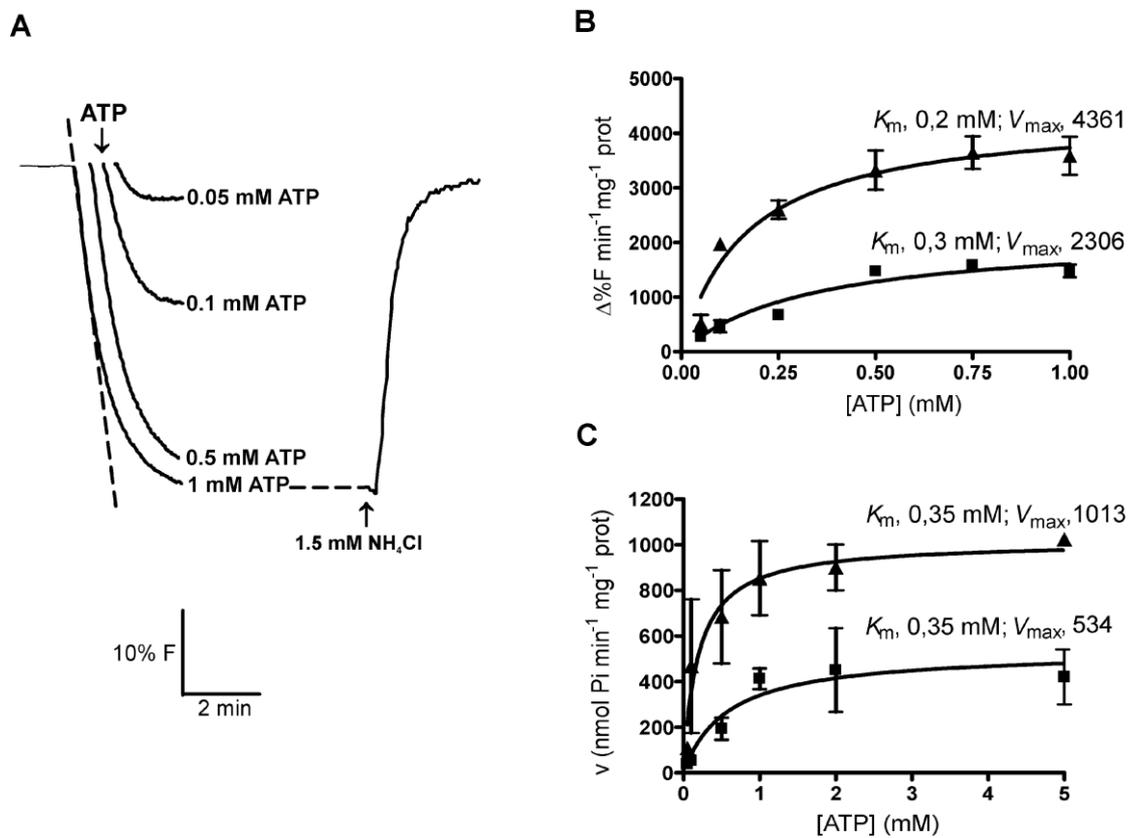


Figura 3.16 – Atividade da V- H^+ -ATPase em vesículas de tonoplasto isoladas de tecido caloso controlo e adaptado a 150 mM de NaCl. A) Atividade de bombeamento de H^+ nas vesículas isoladas de tecido caloso adaptado ao sal: as reações foram iniciadas pela adição de diferentes concentrações de ATP à mistura reacional contendo 20 μg de proteína de membrana vacuolar e a acidificação do meio intravesicular foi monitorizada pela diminuição da fluorescência da sonda ACMA. Gráficos de Michaelis-Menten das velocidades iniciais de bombeamento de H^+ (B) e de libertação de Pi (C) nas vesículas de calos controlo (■) e adaptado ao sal (▲). Os parâmetros cinéticos estimados pelo programa ‘GraphPad Prism 4.0’. Valores expressos como médias \pm E.P. (n=3).

A partir das velocidades iniciais de diminuição da fluorescência estimaram-se as velocidades iniciais de bombeamento de H^+ da V- H^+ -ATPase e da V- H^+ -PPase para cada uma das concentrações de substrato testadas e determinaram-se os parâmetros cinéticos K_m

e V_{\max} de ambas as bombas de prótons do vacúolo (Figuras 3.16B e 3.17B). Com base nesses parâmetros, verifica-se que a atividade da $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ e da $V\text{-H}^+\text{-PPase}$ foi cerca de duas a três vezes superior nas vesículas da linha celular cultivada na presença de sal do que nas vesículas da linha controle. Comparando a atividade das duas bombas de H^+ na linha adaptada, os resultados sugerem que a $V\text{-H}^+\text{-PPase}$ foi mais eficiente do que a $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ na formação e manutenção do gradiente de pH, dado que para concentrações de substrato muito inferiores exibiu uma V_{\max} 45% mais elevada do que a $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ (Figuras 3.16B e 3.17B).

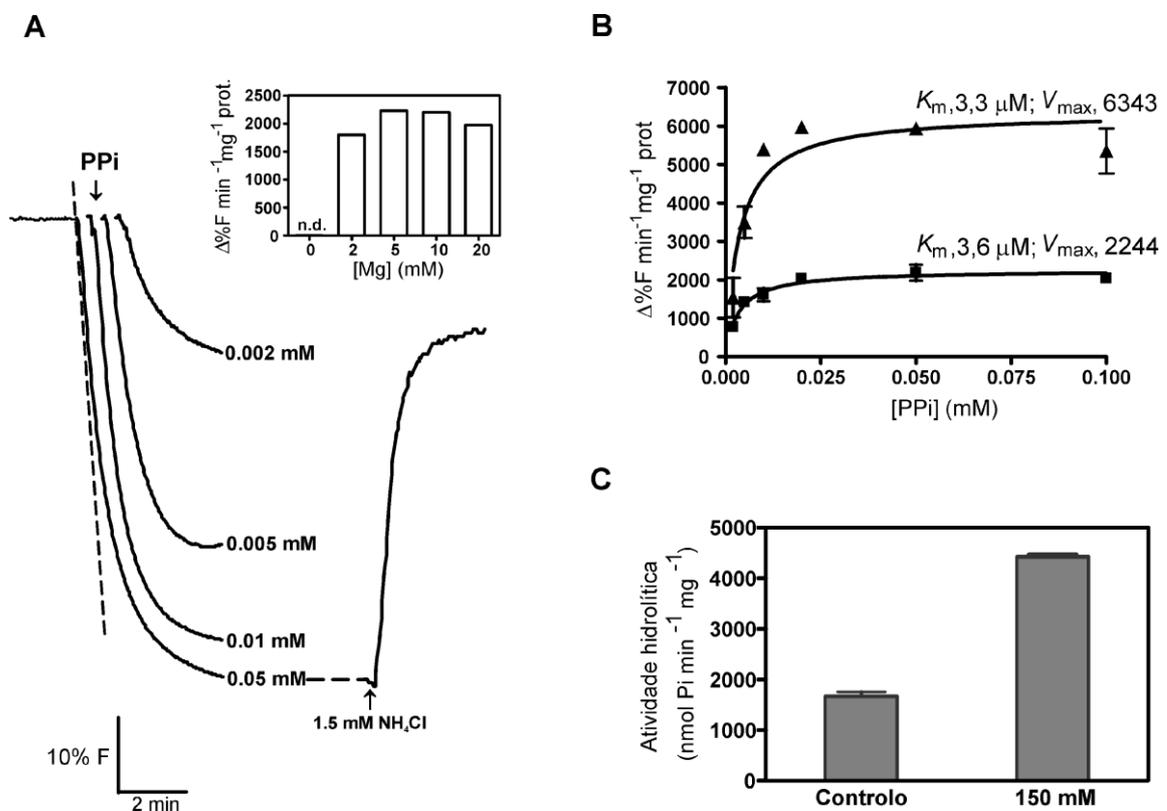


Figura 3.17 – Atividade da $V\text{-H}^+\text{-PPase}$ em vesículas de tonoplasto isoladas de tecido caloso controle e adaptado a 150 mM de NaCl. A) Atividade de bombeamento de H^+ nas vesículas isoladas de tecido caloso adaptado ao sal: as reações foram iniciadas pela adição de diferentes concentrações de PPI à mistura reacional contendo 20 μg de proteína de membrana vacuolar e a acidificação do meio intravesicular foi monitorizada pela diminuição da fluorescência do ACMA; encaixe: velocidades iniciais de bombeamento de H^+ na presença de 15 μM PPI e de concentrações crescentes de magnésio (MgCl_2), n.d. - não detectado. B) Gráficos de Michaelis-Menten das velocidades iniciais de bombeamento de H^+ para concentrações crescentes de PPI nas vesículas de calos controle (■) e adaptado ao sal (▲). Os parâmetros cinéticos foram estimados pelo programa ‘GraphPad Prism 4.0’. C) Atividade de hidrólise da $V\text{-H}^+\text{-PPase}$ determinada na presença de 100 μM de PPI nas vesículas de tonoplasto dos calos controle e adaptado a 150 mM de NaCl. Valores expressos como médias \pm E.P. ($n=3$).

A atividade hidrolítica de ambas as enzimas foi determinada através da quantificação de Pi libertado após a adição de ATP ou PPi. De acordo com as Figuras 3.16C e 3.17C, o padrão de variação foi idêntico ao do bombeamento de H⁺, ou seja, foi nas vesículas do tecido caloso adaptado ao sal que se registou maior atividade hidrolítica. De facto, nesta linha celular, a atividade hidrolítica da V-H⁺-PPase analisada com 100 μM de PPi foi quase 3 vezes superior à registada no controlo (Figura 3.17C). No caso da V-H⁺-ATPase, a V_{max} medida em vesículas de vacúolo da linha adaptada duplicou em relação ao valor estimado para o material controlo (Figura 3.16C).

A Figura 3.18A mostra o padrão eletroforético em SDS-PAGE das proteínas da membrana vacuolar do tecido caloso crescido na ausência (controlo) e na presença de 150 mM NaCl. Como se pode observar, os polipéptidos com massas moleculares próximas dos 98, 75, 63 e 48 kDa são mais abundantes nas amostras do tecido crescido na presença de sal. Tendo em mente que algumas destas bandas poderiam corresponder à V-H⁺-PPase ou a eventuais subunidades da V-H⁺-ATPase, foram usados os anticorpos policlonais contra a V-H⁺-PPase (73 kDa) e a subunidade A da ATPase vacuolar (68 kDa). A imunodeteção com o anticorpo anti-V-H⁺-PPase reconheceu um polipéptido mais abundante nas amostras de tecido adaptado ao sal do que no controlo (Figura 3.18B). Por sua vez, o anticorpo anti-subunidade A da V-H⁺-ATPase reagiu com um polipéptido com cerca de 69 kDa cuja quantidade não foi afetada pelo sal (Figura 3.18C). O polipéptido de 69 kDa assinalado na Figura 3.18A (►) pode corresponder a esta subunidade da V-H⁺-ATPase.

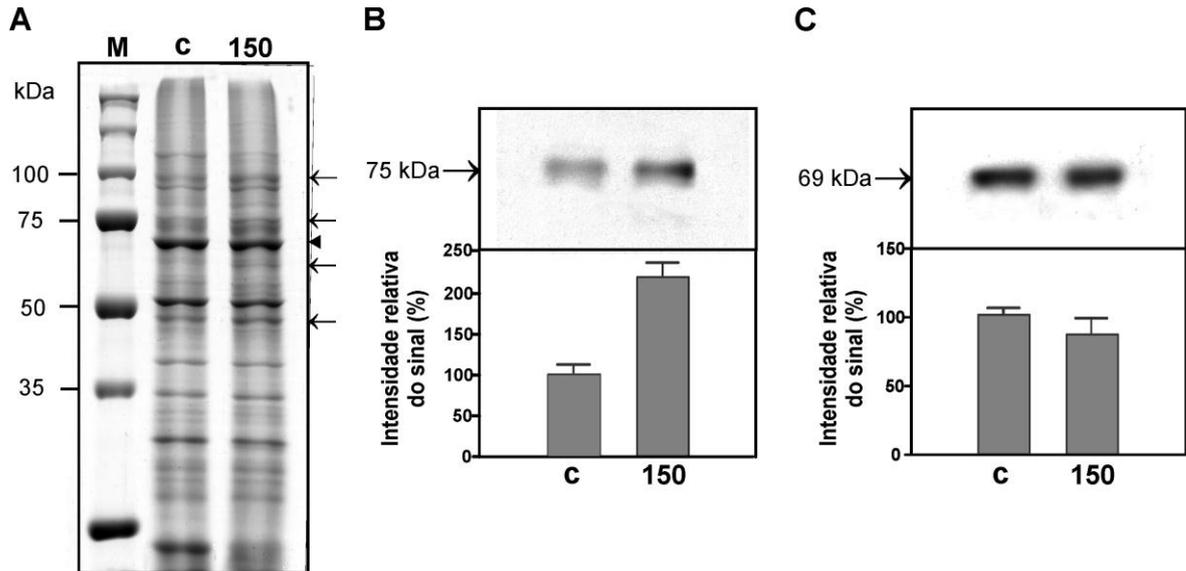


Figura 3.18 – A) Padrão eletroforético em SDS-PAGE das proteínas (60 μ g) do tonoplasto de tecido caloso controlo (c) e adaptado a 150 mM de NaCl (150). M, marcador proteico. Análise por ‘western blotting’ das proteínas do tonoplasto de tecido caloso controlo (c) e adaptado a 150 mM de NaCl (150) com os anticorpos contra a V-H⁺-PPase (B) e a subunidade A da V-H⁺-ATPase (C). A intensidade relativa das bandas imunoreativas foi quantificada por análise densitométrica. Valores expressos como médias \pm E.P. (n=3).

3.2.2.2. Estudo da atividade do sistema de antiporte Na⁺/H⁺ da membrana vacuolar

O envolvimento de um sistema de transporte do tipo antiporte Na⁺/H⁺ nas vesículas de tonoplasto do tecido caloso de batateira foi avaliado pela capacidade do Na⁺ dissipar o gradiente de pH previamente estabelecido. O gradiente eletroquímico de H⁺ foi gerado pela ativação da V-H⁺-PPase, por esta bomba se ter mostrado mais eficiente do que a V-H⁺-ATPase na geração e manutenção do gradiente através das vesículas, além de que o NaCl pode estimular a atividade da V-H⁺-ATPase (Rea & Poole, 1993). Após a estabilização do sinal de fluorescência gerado pela adição do PPI, foram adicionadas alíquotas de Na₂SO₄ ao meio de reação de modo a obterem-se concentrações finais de 4–300 mM de Na⁺ (Figura 3.19A). Nesta figura é evidente que a adição do sal promoveu a recuperação imediata da fluorescência do ACMA, sugerindo que o ião Na⁺ foi incorporado nas vesículas de vacúolo por um sistema de antiporte do tipo Na⁺/H⁺. As velocidades iniciais de efluxo de H⁺ obedeceram a uma cinética de saturação em relação à concentração extravesicular de Na⁺, estimando-se um valor de V_{\max} para as vesículas do tecido crescido em meio salino duas vezes superior ao medido em vesículas de tecido controlo e um valor de K_m ligeiramente inferior (Figura 3.19B).

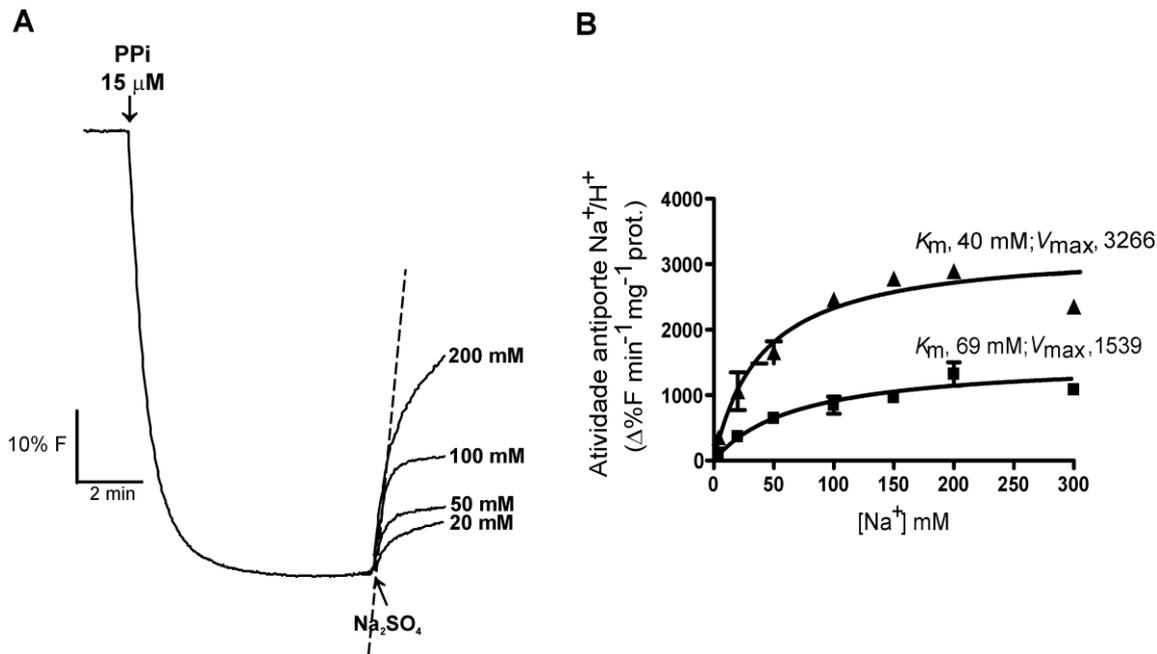


Figura 3.19 – Atividade do sistema de antiporte Na^+/H^+ em vesículas de tonoplasto isoladas de tecido caloso de batateira. A) Após a geração do gradiente de H^+ pela adição de PPI à mistura reacional contendo 20 μ g de proteína membranal do tecido caloso adaptado ao sal, a adição de concentrações crescentes de Na^+ (Na_2SO_4) promoveu o efluxo de H^+ e o consequente aumento da fluorescência do ACMA. B) Gráficos de Michaelis-Menten das velocidades iniciais de dissipação do gradiente de H^+ para as diferentes concentrações de Na^+ em vesículas de calos controle (■) e adaptado ao sal (▲). Os parâmetros cinéticos foram estimados pelo programa ‘GraphPad Prism 4.0’. Valores expressos como médias \pm E.P. (n=3).

A capacidade de diferentes sais para dissiparem o gradiente de pH pré-estabelecido foi testada nas vesículas isoladas do tecido caloso adaptado ao sal com o objetivo de se avaliar a especificidade iônica do sistema antiporte. Como se pode verificar pela análise da Figura 3.20, para além do Na_2SO_4 , outros sais de sódio foram capazes de promover a recuperação imediata do sinal de fluorescência depois de se ter gerado um gradiente de H^+ transmembranar pela adição de PPI. Os resultados mostraram que as velocidades iniciais eram idênticas e que se traduziram numa atividade antiporte semelhante (Figura 3.20A, C). A utilização do cloreto de lítio também provocou a dissipação do gradiente de pH, embora com uma velocidade inicial inferior à induzida pelos sais de sódio.

A possibilidade do sistema de antiporte Na^+/H^+ do tecido caloso de batateira poder aceitar o ião K^+ levou-nos a avaliar a atividade do sistema antiporte na ausência deste elemento, tendo-se para o efeito substituído o KCl do meio de reação pelo cloreto de colina. Nestas condições, o gradiente de pH foi gerado pela ativação da V-H^+ -ATPase cuja atividade não depende do K^+ , ao contrário da V-H^+ -PPase (Maeshima, 2001). Os resultados apresentados na Figura 3.20B mostram que a adição de várias concentrações de

NaCl provocou o efluxo de H^+ , ao contrário da adição dos sais de potássio, sugerindo que o sistema de antiporte Na^+/H^+ na linha celular adaptada ao sal não transporta o ião K^+ (Figura 3.20C).

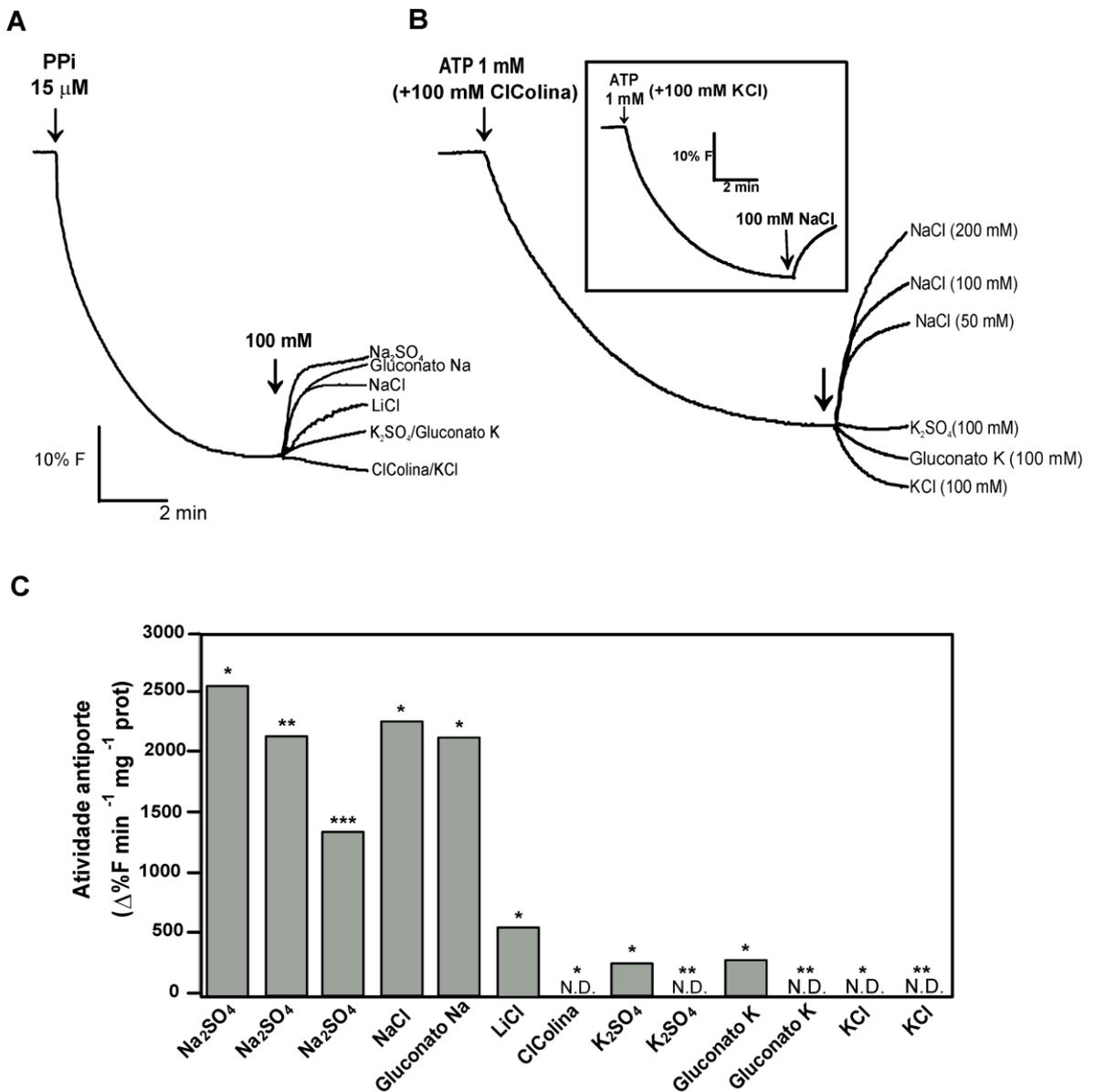


Figura 3.20 – Especificidade do sistema de antiporte catião/ H^+ da membrana vacuolar de células de tecido caloso de batateira. Diversos sais de sódio e de potássio foram adicionados à mistura reacional após ter sido gerado um gradiente de H^+ transmembranar pela ativação da $V-H^+-PPase$ (na presença de 100 mM de KCl) (A) e da $V-H^+-ATPase$ na ausência e na presença (encaixe) de 100 mM de K^+ (B). As velocidades iniciais de dissipação do gradiente de H^+ para cada um dos cátions analisados (concentração final 100 mM) foram medidas nas situações em que o gradiente de pH foi gerado pela $V-H^+-PPase$ na presença de 100 mM de KCl (*), e pela $V-H^+-ATPase$ na presença de 100 mM de cloreto de colina (**), ou de 100 mM de KCl (***); n.d. não detetado (C).

A regulação do fluxo iónico em células expostas a elevada salinidade previne a acumulação de níveis tóxicos dos iões Na^+ e Cl^- no citosol, de modo a manterem-se as concentrações adequadas dos elementos essenciais para o metabolismo celular, nomeadamente do K^+ (Olías *et al.*, 2009; Teakle & Tyerman, 2010). A manutenção de uma elevada razão K^+/Na^+ no citosol é um requisito necessário para o crescimento das plantas em ambientes salinos (Blumwald *et al.*, 2000; Yamaguchi & Blumwald, 2005). As plantas usam diferentes estratégias para manterem esta razão elevada, diminuindo a entrada do ião Na^+ na célula, ou excluindo-o para o apoplasto ou através da acumulação no vacúolo (Plett & Møller, 2010). De acordo com Yamaguchi & Blumwald (2005), o mecanismo baseado no efluxo de Na^+ do citosol para o apoplasto confere às plantas um certo grau de tolerância quando se encontram na presença de baixas concentrações de NaCl , mas em situações de elevada salinidade a compartimentação vacuolar do Na^+ consiste no mecanismo mais eficiente de adaptação à salinidade. O vacúolo assume assim um importante papel na regulação celular da homeostasia iónica ao armazenar elevados teores de Na^+ , Cl^- e de outros iões que, por sua vez, produzem uma pressão osmótica elevada no interior do organelo favorável à entrada de água nas células (Martinoia *et al.*, 2007).

O efluxo de Na^+ do citosol para o vacúolo requer a atividade coordenada das bombas de prótons e do sistema antiporte Na^+/H^+ localizados no tonoplasto. Este sistema é responsável pela entrada do Na^+ no vacúolo à custa da energia associada com a dissipação do gradiente de H^+ e parece ser regulado pela via de sinalização SOS (Qiu *et al.*, 2004). As bombas $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$ e $\text{V-H}^+\text{-PPase}$ associam a hidrólise de ATP e PPi , respetivamente, ao transporte de H^+ para o interior do vacúolo, gerando o gradiente eletroquímico de H^+ através do tonoplasto, fundamental à energização dos sistemas de transporte ativo secundário, que condicionam algumas das funções associadas ao vacúolo como a osmorregulação, controlo do pH interno e no citosol e armazenamento de iões e nutrientes (Martinoia *et al.*, 2007).

Atendendo à importância do gradiente de H^+ para a energização do sistema antiporte Na^+/H^+ é de esperar que a atividade das bombas de H^+ também seja regulada pelo stresse salino. De facto, vários estudos mostraram o aumento da atividade da $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$ e $\text{V-H}^+\text{-PPase}$ nas plantas e linhas celulares em condições salinas e a regulação da atividade destas enzimas pelo stress salino (Barkla *et al.*, 1995; Ballesteros *et al.*, 1996; Otoch *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2010). Gaxiola *et al.* (2001) mostraram a função da $\text{V-H}^+\text{-PPase}$ na compartimentação vacuolar do Na^+ e na

tolerância à salinidade das plantas transgênicas de *A. thaliana*. Nestas plantas, a sobre-expressão da V-H⁺-PPase levou ao aumento da atividade do antiportador Na⁺/H⁺. Do mesmo modo, em plantas de cevada sujeitas a stress salino observou-se uma expressão aumentada da V-H⁺-PPase e da sua atividade de bombeamento de H⁺, em paralelo com um aumento da expressão do antiportador Na⁺/H⁺ (HvNHX1) (Fukuda *et al.*, 2004a). Em linha com estes resultados, em *A. thaliana* e no arroz foi observado que a expressão simultânea da pirofosfatase e do antiportador Na⁺/H⁺ é determinante para a tolerância ao sal (Zhao *et al.*, 2006; Brini *et al.*, 2007). Foi mostrado ainda que a capacidade da halófito *S. bigelovii* para acumular no vacúolo o excesso de Na⁺ após exposição a 200 mM de NaCl resulta do aumento da atividade da V-H⁺-PPase, que gera o gradiente de H⁺ que ativa o antiportador Na⁺/H⁺ (Parks *et al.*, 2002).

Os resultados do presente estudo sugerem que o Na⁺, cujas concentrações são elevadas no tecido caloso crescido na presença de 150 mM de NaCl, pode ser compartimentado no vacúolo, mantendo-se assim o citosol protegido da sua toxicidade. Com efeito, no tecido caloso cultivado em ambiente salino observou-se um aumento da atividade hidrolítica e de bombeamento de H⁺ da V-H⁺-PPase e da V-H⁺-ATPase. Apesar da atividade da V-H⁺-ATPase ser capaz de gerar um gradiente protónico adequado para ativar o sistema de antiporte Na⁺/H⁺ após a adição de NaCl (Figura 3.20B, encaixe), a V-H⁺-PPase mostrou ser mais eficiente por ser capaz de estabelecer um gradiente de pH mais elevado à custa do consumo de baixas concentrações de PPi. Por exemplo, em *V. unguiculata* e nas halófitas *M. crystallinum* e *S. salsa* mantidas em condições salinas foi observado que a atividade da V-H⁺-ATPase é determinante para a energização do transporte do Na⁺ para o vacúolo, ao contrário da V-H⁺-PPase cuja atividade foi reduzida (Barkla *et al.*, 1995; Vera-Estrella *et al.*, 1999; Otoch *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2007). Nas halófitas foi mostrado que a atividade hidrolítica e de bombeamento de H⁺ da V-H⁺-ATPase aumenta cerca de duas vezes quando as plantas são sujeitas a 200 mM de NaCl (Barkla *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 2007). Estes resultados não diferem muito dos apresentados no presente estudo, na medida em que na linha celular exposta ao sal a atividade (bombeamento de H⁺ e hidrólise de ATP) da V-H⁺-ATPase foi cerca de duas vezes superior à observada na linha controlo; porém, a atividade (bombeamento de H⁺ e hidrólise de PPi) da V-H⁺-PPase nessa linha aumentou cerca de três vezes em relação ao controlo.

Em geral, os níveis de proteína e a atividade da V-H⁺-PPase é mais elevada nas membranas vacuolares dos tecidos em crescimento, como foi observado nos hipocótilos de

V. radiata e nos frutos jovens de pera, ao passo que a atividade da V-H⁺-ATPase tende a predominar nos tecidos desenvolvidos e nos frutos em fase de maturação (Shiratake *et al.*, 1997; Nakanishi & Maeshima, 1998). Nos tecidos jovens em crescimento é formada uma grande quantidade de PPi como subproduto de vários processos metabólicos, tais como a polimerização de DNA e RNA, a síntese de sacarose e celulose. Por sua vez, nos tecidos desenvolvidos onde a atividade metabólica é mais reduzida, os níveis de PPi são menores (Martinoia *et al.*, 2007). Estes dados podem explicar a elevada atividade da V-H⁺-PPase registada no tecido caloso adaptado ao sal. Tratando-se de um tecido em crescimento ativo, embora a uma taxa inferior ao do controlo, o PPi é usado como substrato numa situação de stress onde a disponibilidade de ATP pode estar comprometida (Façanha & de Meis, 1998). Em linha com estes resultados, em células em suspensão de *P. euphratica* a crescer exponencialmente na presença de 150 mM de NaCl, o gradiente de pH gerado pela atividade da V-H⁺-PPase foi três vezes superior ao da V-H⁺-ATPase à custa de um menor consumo de substrato (Silva *et al.*, 2010).

Noutros trabalhos em que foram usadas linhas celulares adaptadas a NaCl, a V-H⁺-PPase é apontada como a principal responsável pela energização da membrana vacuolar (Colombo & Cerana, 1993; Zingarelli *et al.*, 1994). Estes resultados, bem como os nossos, leva-nos a admitir que no sistema *in vitro* esta bomba de H⁺ é a que mais contribui para a acumulação vacuolar do Na⁺ e, conseqüentemente, para a tolerância salina. Contudo, não é possível estabelecer um modelo universal de regulação da atividade de ambas as bombas de H⁺ pelo sal que explique todas as evidências experimentais obtidas até à data (Silva & Gerós, 2009). Por exemplo, a atividade da V-H⁺-PPase da linha celular de *N. tabacum* adaptada a elevada salinidade não é alterada pelo NaCl, ao contrário da V-H⁺-ATPase que sofre um aumento dos níveis de proteína e de atividade em condições de elevada salinidade (Reuveni *et al.*, 1990). A V-H⁺-ATPase de uma linha celular de *P. euphratica* também é estimulada pelo sal (Ma *et al.*, 2002). Assim, a resposta da V-H⁺-PPase em situações de salinidade pode ser diferente de acordo com o modelo experimental e com o tipo de tratamento (Wang *et al.*, 2001).

O presente estudo mostrou diferenças entre os perfis eletroforéticos das proteínas do tonoplasto de células de tecido caloso controlo e adaptado ao sal, nomeadamente observou-se o aumento de polipéptidos com massas moleculares próximas de 98, 75, 63 e 48 kDa no gel do tecido adaptado. A banda de 75 kDa deverá corresponder à V-H⁺-PPase que consiste num único polipéptido com massa molecular de 71–80 kDa (Maeshima, 2000).

Com efeito, a imunodeteção da enzima com um anticorpo policlonal confirmou que em membranas de células do tecido caloso crescido na presença de 150 mM NaCl, a V-H⁺-PPase é mais abundante. Este aumento mediado pelo sal não foi observado quando se estudou os níveis da subunidade A da V-H⁺-ATPase. De facto, esta subunidade pertencente ao domínio V₁ responsável pela atividade catalítica da enzima não variou em relação ao controlo, apesar de se ter observado um aumento da atividade hidrolítica e de bombeamento da V-H⁺-ATPase no tecido crescido em meio salino. Portanto, e embora se tenha notado que o sal estimula a atividade de ambas as bombas de H⁺, os resultados de ‘western blotting’ sugerem que elas são provavelmente reguladas por mecanismos diferentes. Importa salientar que, ao contrário da V-H⁺-PPase, a V-H⁺-ATPase é um proteína multimérica composta pelo menos por onze subunidades diferentes, organizadas em dois setores, o periférico (V₁) voltado para o citoplasma e o transmembranar (V₀) (Figura 1.16), pelo que é provável que as subunidades que a compõem possam estar sujeitas a reações de fosforilação/desfosforilação ou à ação de diferentes proteínas reguladoras, ocorrendo assim modificações pós-tradução que podem alterar a atividade da V-H⁺-ATPase (Gaxiola *et al.*, 2007). A observação de que a subunidade C da V-H⁺-ATPase pode ser fosforilada por uma das cinases WNK sugere o envolvimento de modificações pós-tradução (Hong-Hermesdorf *et al.*, 2006). No entanto, a atividade da V-H⁺-ATPase, bem como de outras proteínas transmembranares, pode ainda ser modificada por alterações no ambiente lipídico, uma vez que já foi mostrado que modificações na composição lipídica da membrana induzidas pela salinidade podem afetar a interação das proteínas com os lípidos (Parida & Das, 2005; Zhao & Qin, 2005).

O estudo dos níveis de expressão de outras subunidades da proteína poderia complementar os resultados obtidos e clarificar o mecanismo de regulação desta bomba de prótons pelo sal. O perfil eletroforético das proteínas do tonoplasto do tecido caloso adaptado ao sal mostrou que as bandas com massas moleculares de 98, 63 e 48 kDa são mais intensas do que no controlo, pelo que é possível que algumas correspondam a subunidades da V-H⁺-ATPase (Maeshima, 2001).

A adição de NaCl a vesículas de tonoplasto energizadas promoveu a dissipação do gradiente de H⁺, sugerindo o envolvimento de um sistema do tipo antiporte Na⁺/H⁺ na membrana vacuolar no transporte de sódio para o vacúolo. Tem sido descrito que este sistema de transporte ativo secundário desempenha um papel importante na tolerância das plantas ao sal (Blumwald *et al.*, 2000; Tester & Davenport, 2003; Silva & Gerós, 2009).

Com efeito, os estudos de sobre-expressão do antiportador Na^+/H^+ vacuolar (NHX) permitiram a obtenção de plantas transgênicas capazes de crescer em meios de elevada salinidade, demonstrando a função do sistema de transporte na compartimentação vacuolar do Na^+ (Apse *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001; Apse & Blumwald, 2002; Wu *et al.*, 2004; Fukuda *et al.*, 2004b; Brini *et al.*, 2007).

De um modo geral, a salinidade induz um maior aumento da expressão do sistema de antiporte Na^+/H^+ nos genótipos resistentes ao sal do que nos sensíveis (Fukuda *et al.*, 2004a; Wu *et al.*, 2004; Saqib *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2009). Paralelamente, os estudos em vesículas de tonoplasto de espécies adaptadas ao sal como as halófitas *S. bigelovii* e *S. salsa* (Parks *et al.*, 2002; Qiu *et al.*, 2007), bem como de plantas menos tolerantes como a beterraba, o girassol e a cevada (Garbarino & DuPont, 1988; Ballesteros *et al.*, 1997; Blumwald *et al.*, 2000) mostraram que a atividade de antiporte é estimulada pela imposição transitória de um stress salino.

Em vesículas de tonoplasto de células em suspensão de beterraba, *P. euphratica* ou da halófito *M. crystallinum* também foi observada a ativação do antiportador Na^+/H^+ em resposta aos tratamentos salinos. No seu conjunto, estes estudos revelam que a compartimentação vacuolar do Na^+ consiste num mecanismo universal de adaptação celular à salinidade que coopera com outras respostas integradas ao nível da planta (Vera-Estrella *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2010).

No presente estudo foi observado que as velocidades iniciais de efluxo de H^+ dependentes da adição de concentrações crescentes de Na^+ obedeceram a uma cinética de Michaelis–Menten, o que permitiu estimar os parâmetros cinéticos do sistema de antiporte Na^+/H^+ . Os resultados mostraram que nas vesículas do tecido caloso adaptado a V_{max} do sistema de antiporte foi sensivelmente o dobro da medida nas vesículas do controlo e que a afinidade do antiportador para o Na^+ era maior. Em vesículas do tecido adaptado foi obtido um valor de K_m de 40 mM Na^+ , próximo do valor encontrado por Barkla *et al.* (1995) em *M. crystallinum* ou do exibido pelo antiportador AtNHX1 de *A. thaliana* (Venema *et al.*, 2002), mas inferior aos valores medidos em *S. bigelovii* ($K_m = 3,8$ mM Na^+) ou em raízes de *H. annuus* sujeitas a 150 mM de NaCl ($K_m = 8\text{--}14$ mM Na^+) (Ballesteros *et al.*, 1997; Parks *et al.*, 2002).

O sistema de antiporte Na^+/H^+ caracterizado no presente estudo apresenta ainda um valor de K_m muito semelhante ao do antiportador VvNHX1 do tonoplasto de *Vitis vinifera* ($K_m = 40,2$ mM Na^+) descrito por Hanana *et al.* (2007); contudo, este é capaz de

transportar o íon K^+ com elevada afinidade, ao contrário do sistema de antiporte das células de batateira que exclui o K^+ . Os autores discutem que esta proteína tem uma função importante na homeostasia do K^+ em *V. vinifera*. Também foi demonstrado que o antiportador AtNHX1 sobre-expresso em tomateiro está envolvido no transporte de K^+ para o vacúolo, controlando assim a distribuição subcelular do íon (Leidi *et al.*, 2010). Embora a literatura refira a possibilidade do antiportador Na^+/H^+ transportar o catião lítio que possui uma carga e um raio iónico semelhantes ao sódio, no presente estudo verificou-se que o antiportador Na^+/H^+ exclui este catião, em linha com outros estudos anteriores (Garbarino & DuPont, 1988; Staal *et al.*, 1991).

No seu conjunto, as evidências experimentais obtidas permitem concluir que as células de tecido caloso de batateira compartimentam o Na^+ no vacúolo para restabelecer a homeostasia iónica e osmótica no citosol. Com efeito, foi observado que o tecido mantido em meio com 150 mM de NaCl acumula uma elevada quantidade de sal e, em paralelo, exhibe uma atividade aumentada do sistema de antiporte Na^+/H^+ e das bombas de H^+ do vacúolo. A compartimentação do Na^+ no vacúolo, para além de contribuir para a redução da sua toxicidade no citosol, deve ter um papel importante na manutenção da turgidez das células em meio salino por proporcionar uma elevada pressão osmótica no interior do vacúolo, juntamente com a prolina e o amido que são acumulados no citosol e nos plastídios.

3.2.3. Eletroforese bidimensional

De modo a avaliar a expressão genética ao nível da proteína como um possível mecanismo de adaptação à salinidade, os perfis proteicos do tecido caloso controlo e crescido em meio com 150 mM NaCl foram comparados com recurso à eletroforese bidimensional (2-D). Tendo em conta que a composição do meio usado na extração influencia o tipo e a quantidade de proteínas solubilizadas (Pinheiro *et al.*, 2005), neste trabalho foram extraídas das linhas de calos (controlo e adaptado a NaCl) duas frações proteicas, designadas solúvel e salina. Em geral, a fração solúvel representou 70 a 80% da quantidade total de proteína extraída, ao passo que a fração salina constituída pelas proteínas de ligação iónica correspondeu aos restantes 20–30% da proteína total. Na Figura 3.21 são apresentados os géis representativos das duas frações proteicas obtidas do material controlo e crescido na presença de NaCl. A análise das imagens dos géis das frações solúvel e salina revelou a presença de 101 e 217 polipéptidos ('spots'),

respetivamente, não tendo sido observadas alterações qualitativas entre os padrões proteicos dos calos controlo e adaptado a 150 mM NaCl. Importa salientar que cada conjunto de 'spots' estava presente em pelo menos três dos quatro géis que foram analisados de cada fração, tendo sido selecionados apenas os 'spots' que apresentavam uma resolução igual ou superior a 150 dpi.

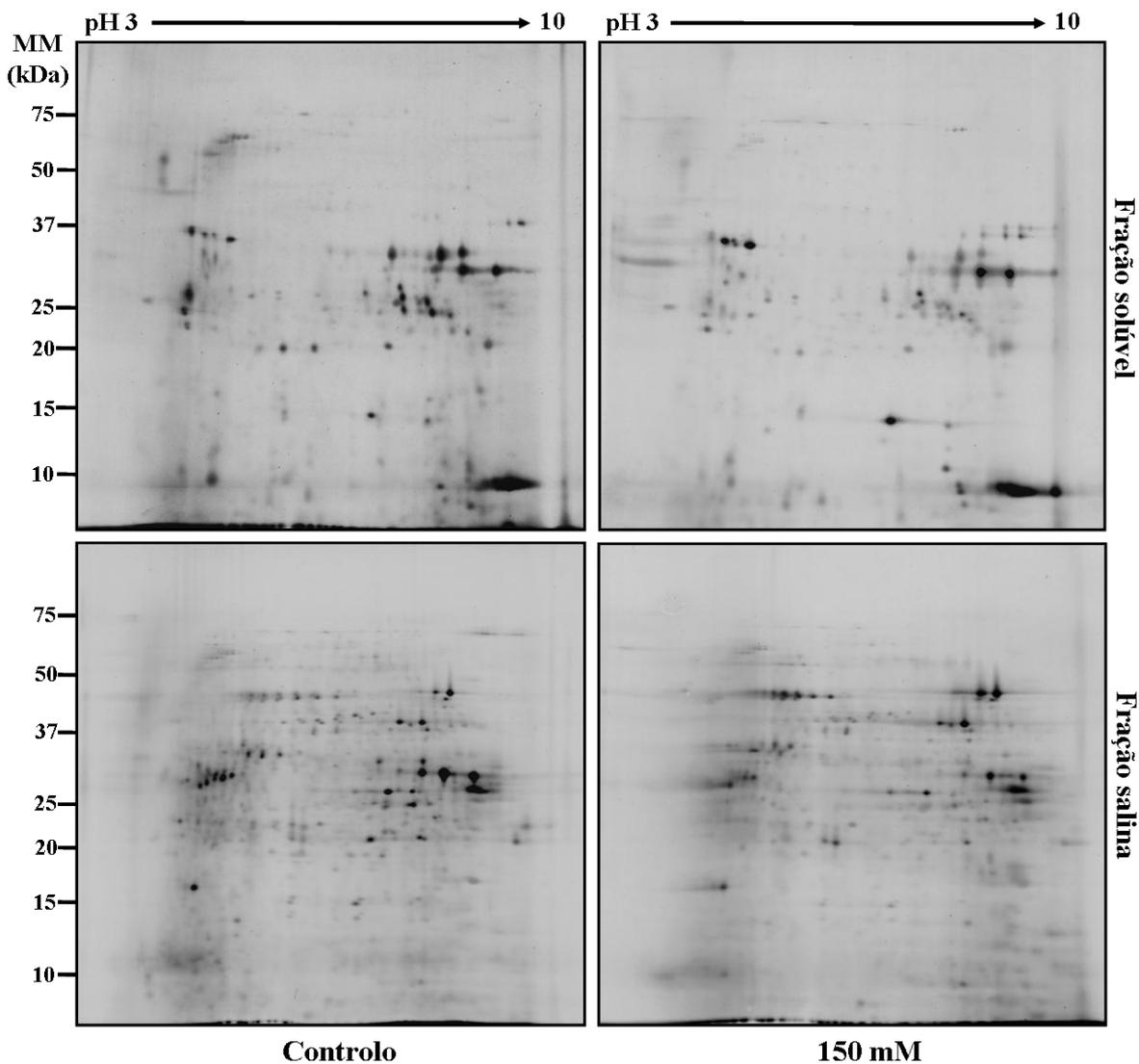


Figura 3.21 – Separação por eletroforese 2-D de extratos proteicos solúveis em água (fração solúvel) e em solução salina (fração salina) de tecido caloso controlo e adaptado a 150 mM de NaCl (150 mM). Igual quantidade de proteína (25 µg) foi separada na primeira dimensão em tiras IPG (13 cm) com um gradiente não linear de pH 3–10 e na segunda dimensão em SDS-PAGE de 12,5%. Os géis foram corados com o composto fluorescente 'LavaPurple' (Fluorotechnics) e as imagens adquiridas com recurso aos filtros de excitação 532 nm e de emissão 610 nm. As massas moleculares do padrão proteico estão assinaladas à esquerda dos géis.

Da análise global dos padrões eletroforéticos observa-se que os polipéptidos presentes na fração solúvel têm uma massa molecular aparente entre os 8–74 kDa e o ponto isoelétrico (pI) variável entre pH 5 e 9 (Figura 3.21, Tabela 3.9). Na fração salina a maioria dos ‘spots’ selecionados apresentam massas moleculares entre os 8–69 kDa e valores de pI compreendidos entre pH 4 e 9 (Figura 3.21, Tabela 3.10). Uma observação mais detalhada dos géis relativos à fração solúvel revela a existência de um número considerável de ‘spots’ no intervalo de pH 4–7 (82 ‘spots’), diminuindo para valores de pH superiores (19 ‘spots’ com pI > 7) (Figura 3.21, Tabela 3.9). Do mesmo modo, nos géis da fração salina a densidade de ‘spots’ proteicos era elevada no gradiente de pH 4–7 (180 ‘spots’), diminuindo com o aumento do pH do gel (37 ‘spots’ com pI > 7) (Figura 3.21, Tabela 3.10).

A menor densidade de polipéptidos na região básica do gel poderá resultar da menor abundância de proteínas básicas nas células do tecido caloso, ou ser consequência de limitações da própria técnica de 2-D como a capacidade para se extrair e manter essas proteínas solubilizadas, ou a estabilidade dessas proteínas ser alterada durante a focagem isoelétrica comprometendo a sua separação (Westermeyer & Naven, 2002). Perante a predominância de polipéptidos ácidos uma solução possível para aumentar a resolução do padrão eletroforético poderia passar por restringir o gradiente de pH para um intervalo linear entre 4 e 7. Mas mesmo tendo-se optado por usar na primeira dimensão tiras de 13 cm de comprimento, com um gradiente de pH não linear entre 3 e 10 que permite ter uma visão mais geral do padrão proteico do tecido caloso crescido na presença de NaCl, observaram-se variações nos níveis de expressão de algumas proteínas.

A análise quantitativa dos géis da fração solúvel do tecido adaptado a NaCl comparativamente aos da condição controlo revelou que 17 ‘spots’ mostraram alterações significativas e reproduzíveis, sendo que 15 surgiram aumentados e os restantes 2 apareciam diminuídos no padrão proteico do tecido crescido na presença de 150 mM NaCl (Figura 3.22, Tabela 3.9). Embora não esteja estabelecido na literatura um valor de referência para uma variação quantitativa significativa, de acordo com a análise estatística realizada verifica-se que, de um modo geral, o volume relativo do conjunto dos quinze ‘spots’ aumentou mais do que duas vezes no tecido adaptado do que no controlo; a variação foi menor para os ‘spots’ 946 e 1019 afetados negativamente pela salinidade (volume relativo diminuído em 2,2 a 1,5 vezes em relação ao controlo) (Tabela 3.9).

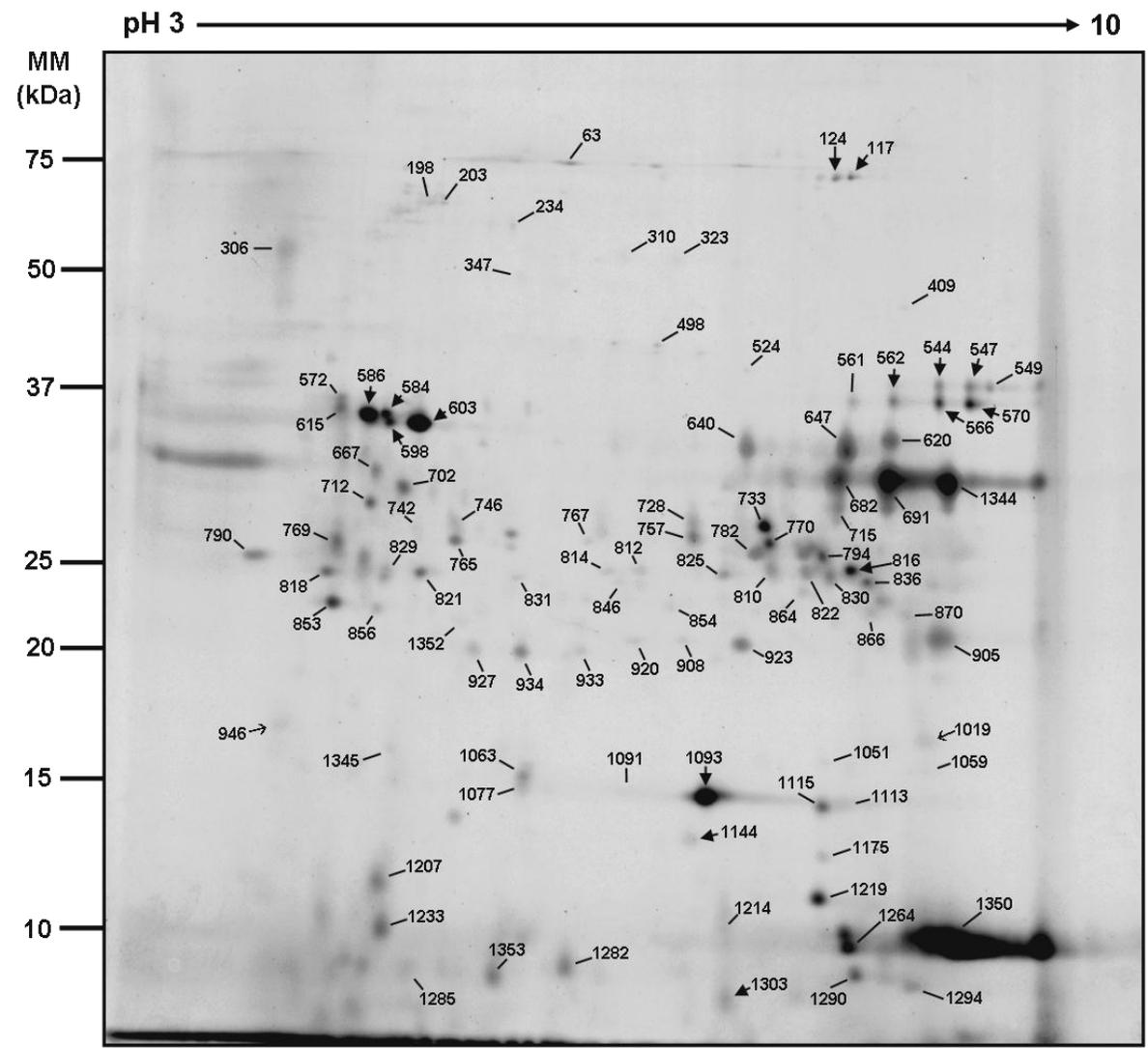


Figura 3.22 – Mapa de distribuição dos polipéptidos da fração solúvel em géis 2-D de tecido caloso crescido em meio com 150 mM de NaCl, onde estão assinalados os ‘spots’ cuja expressão aumentou (➔) e aqueles em que a expressão diminuiu (→) comparativamente à situação controlo. As massas moleculares (MM) do padrão proteico estão assinaladas à esquerda do gel.

Tabela 3.9 – Lista dos polipéptidos detetados nos géis 2-D da fração solúvel de tecido caloso de batateira correspondentes aos ‘spots’ assinalados na Fig. 3.22. A massa molecular (MM) e o pI aparente, bem como o volume normalizado de cada ‘spot’ proteico presente nos géis do tecido controlo e adaptado a 150 mM de NaCl foram determinados. O valor-*p* e o resultado do teste Kolmogorov-Smirnov (**, diferença significativa a nível de 5%; ns, não significativa) encontram-se também indicados. Os ‘spots’ diferencialmente expressos apresentam um poder de análise superior a 80%: ↑, indica o aumento de expressão do polipéptido no tecido adaptado; ↓, decréscimo de expressão.

Nº de ‘spot’	MM (kDa)	pI	ANOVA (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volume normalizado	150 mM Volume normalizado	Varição de volume
63	74,3	5,4	0,162		**	399,38 ± 103,21	634,53 ± 115,12	1,6
117	71,3	7,0	0,011	> 80%	**	144,79 ± 14,98	377,38 ± 73,49	2,6 ↑
124	71,3	6,8	0,023	> 80%	**	174,57 ± 22,64	428,40 ± 86,47	2,5 ↑
198	67,6	5,0	0,633		ns	381,19 ± 54,42	346,34 ± 32,04	1,1
203	66,6	5,1	0,383		ns	468,26 ± 118,80	337,83 ± 56,67	1,4
234	61,4	5,3	0,67		ns	426,67 ± 48,07	447,80 ± 30,27	1
306	57,4	4,6	0,046		**	3134,14 ± 218,52	1921,47 ± 388,59	1,6
310	57,4	5,6	0,282		ns	338,37 ± 41,89	405,51 ± 41,47	1,2
323	57,4	5,8	0,057		**	403,48 ± 12,30	517,11 ± 50,18	1,3
347	54,3	5,3	0,343		ns	291,65 ± 16,23	367,65 ± 69,23	1,3
409	49,7	7,5	0,545		ns	384,73 ± 66,30	459,72 ± 93,14	1,2
498	43,7	5,9	0,085		**	285,81 ± 37,10	441,71 ± 69,44	1,5
524	42,0	6,6	0,173		**	279,94 ± 35,64	206,63 ± 13,56	1,3
544	40,3	8,0	0,01	> 80%	**	331,68 ± 46,14	684,57 ± 85,55	2,1 ↑
547	40,3	8,4	0,022	> 80%	**	553,64 ± 125,40	1257,51 ± 57,96	2,3 ↑
549	40,3	9,0	0,069		**	1610,90 ± 360,20	3492,97 ± 632,37	2,2
561	38,7	7,0	0,221		ns	429,03 ± 46,83	567,58 ± 92,43	1,3
562	38,2	7,5	0,007	> 80%	**	573,96 ± 102,08	1268,89 ± 145,84	2,2 ↑
566	38,2	8,0	0,0001	> 80%	**	330,02 ± 37,87	1567,79 ± 165,88	4,8 ↑
570	38,2	8,6	0,001	> 80%	**	601,44 ± 90,12	4101,03 ± 407,07	6,8 ↑
572	37,6	4,8	0,97		ns	4387,54 ± 1026,39	4124,32 ± 682,42	1,1
584	37,1	5,0	0,003	> 80%	**	413,49 ± 73,27	1470,18 ± 289,60	3,6 ↑

Nº de 'spot'	MM (kDa)	pI	Anova (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volumes normalizados	150 mM Volumes normalizados	Varição de volume
586	37,1	4,9	0,001	> 80%	**	2164,50 ± 444,01	8457,04 ± 825,38	3,9 ↑
598	36,1	5,0	0,01	> 80%	**	335,95 ± 87,23	1004,73 ± 169,25	3 ↑
603	36,1	5,1	0,022	> 80%	**	2966,57 ± 345,44	14779,37 ± 789,26	116,2 ↑
615	35,2	4,7	0,058		**	695,09 ± 108,12	442,45 ± 35,12	1,6
620	34,7	7,5	0,436		ns	4273,39 ± 551,03	3731,54 ± 267,87	1,1
640	34,2	6,2	0,179		ns	4000,52 ± 453,47	3183,38 ± 254,42	1,3
647	34,2	7,0	0,788		ns	7023,35 ± 1082,40	6669,55 ± 410,38	1,1
667	32,0	5,0	0,359		ns	1850,30 ± 232,93	1538,24 ± 268,74	1,2
682	31,1	6,9	0,19		**	3812,84 ± 716,86	5304,98 ± 878,50	1,4
691	31,1	7,4	0,131		**	13166,36 ± 1541,16	25659,48 ± 1708,40	16,7
702	30,7	5,0	0,103		**	1713,32 ± 223,24	2329,18 ± 202,49	1,4
712	29,1	4,9	0,158		ns	622,38 ± 92,30	922,33 ± 163,82	1,5
715	28,7	6,9	0,285		ns	727,62 ± 99,46	993,83 ± 220,60	1,4
728	28,3	5,9	0,039		**	774,36 ± 68,03	1174,43 ± 139,67	1,5
733	27,2	6,3	0,074		**	2481,90 ± 570,66	4440,32 ± 784,80	1,8
742	27,2	5,1	0,116		**	424,50 ± 62,84	292,52 ± 35,45	1,5
746	26,8	5,2	0,227		ns	495,92 ± 42,39	423,96 ± 36,31	1,2
757	26,1	5,9	0,228		ns	2197,72 ± 192,74	2632,28 ± 246,08	1,2
765	26,1	5,2	0,64		ns	588,61 ± 71,00	677,31 ± 152,00	1,3
767	26,1	5,5	0,376		ns	490,79 ± 75,77	398,39 ± 49,40	1,2
769	26,4	4,8	0,048		**	10386,14 ± 1927,99	5720,79 ± 684,20	1,8
770	25,7	6,3	0,036		**	2724,05 ± 192,92	4629,56 ± 740,55	1,7
782	25,4	6,2	0,922		ns	884,74 ± 23,96	908,08 ± 91,93	1
790	25,4	4,4	0,084		**	2772,47 ± 169,82	2273,12 ± 166,22	1,2
794	25,4	6,6	0,03		**	3766,85 ± 247,70	5558,41 ± 635,78	1,5
810	23,7	6,3	0,885		ns	1812,84 ± 397,54	1623,41 ± 148,43	1,1
812	24,7	5,7	0,106		**	387,30 ± 33,27	496,06 ± 46,72	1,3
814	24,4	5,6	0,067		**	645,72 ± 38,76	501,36 ± 52,24	1,3

Nº de 'spot'	MM (kDa)	pI	Anova (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volumes normalizados	150 mM Volumes normalizados	Varição de volume
816	24,4	7,0	0,011	> 80%	**	989,20 ± 73,05	2102,90 ± 331,25	2,1 ↑
818	24,0	4,8	0,041		**	2985,31 ± 343,91	1435,99 ± 347,10	2,1
821	24,0	5,1	0,241		**	1251,36 ± 214,70	1549,95 ± 161,68	1,2
822	24,0	6,6	0,676		ns	948,19 ± 165,60	1040,36 ± 158,64	1,1
825	24,0	6,1	0,596		ns	1350,12 ± 190,65	1469,55 ± 155,48	1,1
829	24,4	5,0	0,641		ns	1647,42 ± 135,48	1721,77 ± 106,44	1
830	23,4	6,8	0,353		**	2178,23 ± 412,24	2590,62 ± 299,78	1,2
831	23,4	5,3	0,28		ns	752,02 ± 71,66	867,52 ± 64,92	1,2
836	23,7	7,2	0,074		**	2455,38 ± 136,93	3024,23 ± 229,50	1,2
846	22,5	5,6	0,611		ns	393,59 ± 43,50	433,63 ± 58,74	1,1
853	22,1	4,8	0,797		ns	1487,63 ± 236,43	1490,72 ± 420,45	1
854	22,1	5,8	0,338		ns	435,61 ± 23,80	492,40 ± 45,98	1,1
856	22,1	4,9	0,647		ns	1462,46 ± 151,41	1360,08 ± 109,05	1,1
864	21,6	6,4	0,721		ns	813,82 ± 55,77	846,22 ± 64,81	1
866	21,3	7,1	0,765		ns	1041,04 ± 105,64	998,44 ± 113,10	1
870	21,3	7,6	0,878		ns	1236,58 ± 111,80	1223,00 ± 164,42	1
905	20,1	8,0	0,729		ns	4184,66 ± 538,25	4781,72 ± 1031,64	1,1
908	19,6	5,8	0,894		ns	834,00 ± 60,16	830,53 ± 110,57	1
920	19,6	5,7	0,064		**	1664,37 ± 561,96	720,43 ± 65,97	2,3
923	19,6	6,2	0,649		ns	2025,18 ± 63,26	2162,66 ± 220,12	1,1
927	19,6	5,2	0,333		ns	2149,49 ± 317,76	1753,60 ± 263,49	1,2
933	19,6	5,5	0,06		**	3514,07 ± 636,98	2023,35 ± 363,95	1,7
934	19,6	5,3	0,938		ns	3830,08 ± 535,04	3786,46 ± 540,87	1
946	18,6	4,6	0,009	> 80%	**	3521,29 ± 527,34	1601,62 ± 187,71	2,2 ↓
1019	15,1	7,8	0,025	> 80%	**	2339,92 ± 206,75	1557,35 ± 165,37	1,5 ↓
1051	14,3	6,7	0,198		**	875,23 ± 183,86	588,94 ± 11,01	1,5
1059	13,9	7,9	0,332		ns	635,62 ± 110,16	499,92 ± 32,80	1,3
1063	14,1	5,3	0,712		ns	1554,43 ± 308,64	1619,29 ± 156,59	1

Nº de 'spot'	MM (kDa)	pI	Anova (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volumes normalizados	150 mM Volumes normalizados	Variação de volume
1077	13,0	5,3	0,334		ns	1682,46 ± 210,51	1627,73 ± 191,60	2,6
1091	13,2	5,7	0,25		**	1793,52 ± 266,03	1371,78 ± 133,54	1,3
1093	13,0	5,9	0,001	> 80%	**	5699,99 ± 621,67	20075,94 ± 3033,63	3,5 ↑
1113	12,7	7,0	0,398		ns	956,99 ± 77,21	1055,81 ± 76,76	1,1
1115	12,7	6,7	0,108		**	1324,38 ± 227,59	1909,16 ± 241,14	1,4
1144	11,5	5,9	0,006	> 80%	**	532,32 ± 28,04	1418,16 ± 338,54	2,7 ↑
1175	11,1	6,7	0,378		ns	602,88 ± 76,17	679,04 ± 37,84	1,1
1207	10,5	5,0	0,716		ns	9039,33 ± 1646,85	8206,73 ± 1254,76	1,1
1214	10,1	6,0	0,08		**	1107,67 ± 138,35	775,04 ± 70,45	1,4
1219	9,9	6,7	0,038		**	1199,82 ± 159,09	2508,85 ± 524,60	2,1
1233	9,1	5,0	0,725		ns	11750,13 ± 1405,05	11237,01 ± 2284,99	1
1264	8,9	7,0	0,328		**	5547,51 ± 681,81	7868,29 ± 1048,28	1,2
1282	8,1	5,4	0,349		ns	3577,23 ± 241,81	4165,86 ± 488,38	1,2
1285	8,1	5,2	0,529		ns	1618,03 ± 225,78	1418,28 ± 327,25	1,1
1290	8,0	7,0	0,119		**	3276,99 ± 154,09	3866,16 ± 287,79	1,2
1294	7,8	7,8	0,842		ns	3261,24 ± 173,79	3212,21 ± 222,85	1
1303	7,7	6,0	0,003	> 80%	**	1184,54 ± 64,11	1818,62 ± 134,23	1,5 ↑
1344	30,7	8,1	0,042		**	9136,27 ± 897,37	27265,81 ± 3189,30	73
1345	15,1	5,0	0,14		**	1858,68 ± 362,72	1273,98 ± 104,87	1,5
1350	8,5	8,3	0,095		ns	40550,93 ± 6016,97	59117,43 ± 6953,76	33,8
1351	25,4	8,4	0,35		ns	2184,12 ± 134,38	1878,50 ± 368,92	1,2
1352	21,3	5,2	0,279		ns	660,38 ± 136,45	500,84 ± 40,25	1,3
1353	8,0	5,2	0,2		**	3444,69 ± 462,00	4486,32 ± 518,62	1,3

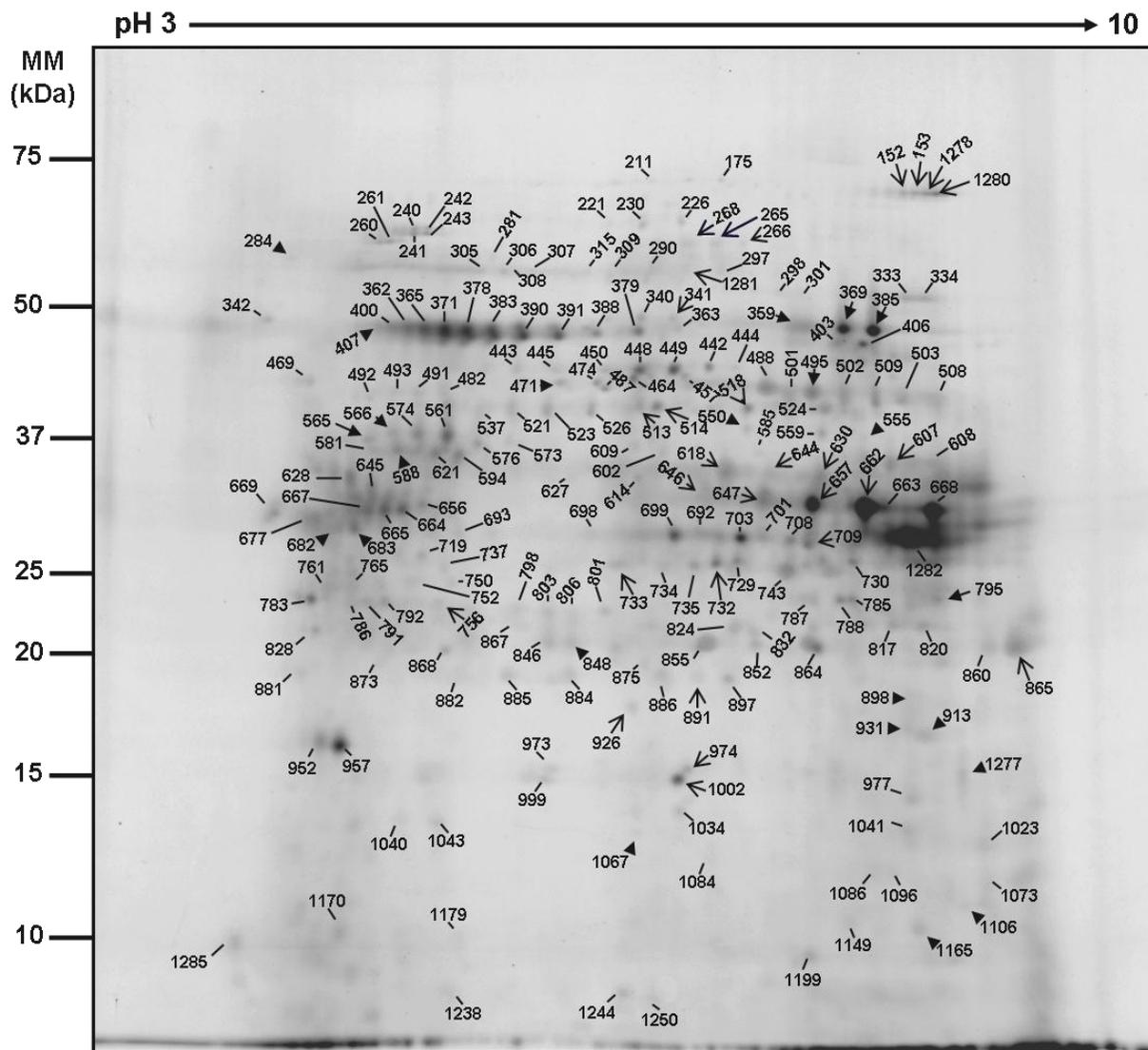


Figura 3.23 – Mapa de distribuição dos polipéptidos da fração salina em géis 2-D de tecido caloso crescido em meio com 150 mM de NaCl, onde estão assinalados os ‘spots’ cuja expressão aumentou (▲) e aqueles em que a expressão diminuiu (→) comparativamente à situação controlo. As massas moleculares (MM) do padrão proteico estão assinaladas à esquerda do gel.

Tabela 3.10 – Lista dos polipéptidos detetados nos géis 2-D da fração salina de tecido caloso de batateira correspondentes aos ‘spots’ assinalados na Fig. 3.23. A massa molecular (MM) e o pI aparente, bem como o volume normalizado de cada ‘spot’ proteico presente nos géis do tecido controlo e adaptado a 150 mM de NaCl foram determinados. O valor-*p* e o resultado do teste Kolmogorov-Smirnov (**, diferença significativa a nível de 5%; ns, não significativa) encontram-se também indicados. Os ‘spots’ diferencialmente expressos apresentam um poder de análise superior a 80%: ↑, indica o aumento de expressão do polipéptido no tecido adaptado; ↓, decréscimo de expressão.

Nº de ‘spot’	MM (kDa)	pI	Anova (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volumes normalizados	150 mM Volumes normalizados	Varição de volume
152	68,7	7,8	0,002	> 80%	**	526,01 ± 106,24	174,28 ± 7,00	3,0 ↓
153	68,7	7,9	0,009	> 80%	**	1665,57 ± 203,02	383,95 ± 29,71	4,3 ↓
175	68,7	6,5	0,236		**	289,76 ± 28,93	243,10 ± 12,74	1,2
211	67,8	5,5	0,180		**	658,22 ± 132,00	477,20 ± 23,81	1,4
221	65,2	5,4	0,050		**	614,04 ± 83,31	434,43 ± 17,57	1,4
226	65,2	5,7	0,789		ns	337,57 ± 75,78	339,93 ± 40,42	1,0
230	64,4	5,6	0,076		**	1016,62 ± 104,19	763,44 ± 56,24	1,3
240	63,6	5,0	0,344		ns	423,72 ± 76,06	499,47 ± 32,91	1,2
241	63,6	5,1	0,209		**	500,91 ± 119,93	719,20 ± 80,26	1,4
242	63,6	5,1	0,287		ns	1019,32 ± 197,82	1692,26 ± 506,97	9,8
243	63,6	5,1	0,693		ns	673,52 ± 150,79	705,01 ± 78,87	1,0
260	62,7	5,0	0,483		ns	1742,39 ± 281,88	2062,31 ± 314,25	1,2
261	61,9	5,1	0,396		ns	402,17 ± 81,16	482,53 ± 53,95	1,2
265	61,1	6,1	0,015	> 80%	**	1396,12 ± 158,48	566,45 ± 51,50	2,5 ↓
266	61,1	6,2	0,018	> 80%	**	591,42 ± 80,04	335,68 ± 30,17	1,8 ↓
268	61,1	5,8	0,039	> 80%	**	773,47 ± 65,23	357,39 ± 23,42	2,2 ↓
281	60,4	5,3	0,093		**	782,50 ± 37,77	1003,99 ± 98,93	1,3
284	58,8	4,7	0,012	> 80%	**	1435,56 ± 181,86	2519,14 ± 247,75	1,8 ↑
290	57,3	5,7	0,768		ns	2621,72 ± 387,21	2746,32 ± 337,04	1,0
297	55,8	6,1	0,609		ns	2058,97 ± 402,57	1747,62 ± 227,75	1,2
298	57,3	6,5	0,176		ns	2585,84 ± 366,05	3828,12 ± 705,12	1,5
301	56,6	6,9	0,033		**	1697,77 ± 246,30	2947,15 ± 384,86	1,7

Nº de 'spot'	MM (kDa)	pI	Anova (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volumes normalizados	150 mM Volumes normalizados	Varição de volume
305	57,3	5,3	0,159		ns	1260,99 ± 159,71	1644,54 ± 179,03	1,3
306	57,3	5,3	0,098		**	2090,95 ± 383,33	3249,32 ± 492,36	1,6
307	56,6	5,4	0,254		ns	825,46 ± 154,77	616,10 ± 70,79	1,3
308	57,3	5,4	0,594		**	415,41 ± 109,00	448,25 ± 51,40	1,1
309	56,6	5,5	0,212		**	2334,04 ± 290,11	1802,11 ± 234,85	1,3
315	57,3	5,4	0,946		ns	2196,62 ± 479,64	2153,10 ± 250,96	1,0
328	53,0	6,5	0,168		ns	552,07 ± 109,16	378,83 ± 36,48	1,5
330	53,0	6,7	0,141		**	551,37 ± 79,22	396,30 ± 61,07	1,4
333	53,0	7,9	0,325		ns	1083,26 ± 245,48	725,75 ± 122,42	1,5
334	52,3	8,3	0,580		ns	2383,72 ± 429,49	2050,50 ± 507,97	1,2
340	51,0	5,7	0,054		**	806,06 ± 128,71	488,49 ± 39,82	1,7
341	50,4	5,9	0,012	> 80%	**	695,46 ± 96,70	369,82 ± 39,25	1,9 ↓
342	49,7	4,5	0,061		**	2020,54 ± 328,95	3257,91 ± 415,63	1,6
359	49,1	6,6	0,005	> 80%	**	5818,67 ± 667,64	10672,52 ± 986,90	1,8 ↑
362	48,4	4,9	0,986		ns	1667,50 ± 298,22	1630,37 ± 224,89	1,0
363	47,2	5,9	0,224		**	2014,06 ± 212,66	1544,75 ± 353,06	1,3
365	48,4	5,1	0,273		ns	4293,16 ± 1110,74	5582,68 ± 661,54	1,3
369	47,8	7,1	0,039	> 80%	**	9087,45 ± 1026,18	23035,53 ± 1915,86	2,5 ↑
371	48,4	5,2	0,245		ns	6310,70 ± 1513,48	8572,34 ± 1146,66	1,4
378	47,8	5,2	0,086		**	13239,86 ± 1835,27	19626,46 ± 2409,84	1,5
379	48,4	5,7	0,049		**	7225,77 ± 1802,81	3460,08 ± 545,17	2,1
383	48,4	5,3	0,135		**	10345,20 ± 2170,89	15068,13 ± 1823,95	1,5
385	47,8	7,5	0,052		**	20188,73 ± 1037,27	37909,99 ± 2537,88	51,6 ↑
388	48,4	5,5	0,110		ns	8227,36 ± 1751,80	4866,15 ± 618,59	1,9
390	48,4	5,3	0,795		ns	9420,46 ± 2225,08	10897,69 ± 1918,42	1,0
391	48,4	5,4	0,613		ns	9104,26 ± 1948,18	7929,09 ± 1262,14	1,2
400	47,8	4,8	0,079		**	2700,95 ± 469,32	3742,71 ± 135,27	1,4
403	46,0	7,0	0,027		**	1710,68 ± 238,53	2838,58 ± 305,34	1,7

Nº de 'spot'	MM (kDa)	pI	Anova (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volumes normalizados	150 mM Volumes normalizados	Varição de volume
406	46,0	7,3	0,126		ns	5935,65 ± 629,98	7945,48 ± 966,18	1,3
407	46,0	4,8	0,010	> 80%	**	2031,92 ± 198,59	3034,02 ± 114,36	1,5 ↑
442	44,2	6,0	0,771		ns	1825,21 ± 228,18	1726,98 ± 191,86	1,1
443	43,7	5,3	0,322		ns	1199,76 ± 239,85	1634,30 ± 293,39	1,4
444	44,2	6,2	0,599		ns	719,07 ± 65,82	759,65 ± 50,19	1,1
445	44,2	5,4	0,941		ns	1680,30 ± 328,79	1651,73 ± 189,28	1,0
448	44,2	5,7	0,506		ns	4015,92 ± 416,52	3596,46 ± 320,50	1,1
449	44,2	5,9	0,754		ns	2975,19 ± 442,11	3147,56 ± 402,65	1,1
450	44,2	5,6	0,542		ns	1889,67 ± 267,15	2090,84 ± 228,10	1,1
457	43,1	5,9	0,675		ns	366,95 ± 45,43	346,35 ± 80,12	1,1
464	41,5	5,7	0,201		**	1578,32 ± 67,30	1817,13 ± 153,74	1,2
469	42,6	4,7	0,101		**	2314,50 ± 445,86	3685,35 ± 445,96	1,6
471	42,0	5,5	0,010	> 80%	**	1608,57 ± 86,66	2350,93 ± 201,18	1,5 ↑
474	42,0	5,5	0,141		**	1549,69 ± 189,41	2223,76 ± 388,32	1,4
482	41,5	5,2	0,268		ns	859,99 ± 108,16	1214,81 ± 240,24	1,4
487	41,5	5,6	0,770		ns	886,88 ± 135,35	836,74 ± 139,89	1,1
488	40,9	6,4	0,074		**	3134,81 ± 799,61	5153,34 ± 505,55	1,6
491	41,5	5,2	0,281		ns	1635,59 ± 284,66	2136,40 ± 368,14	2,4
492	40,9	5,1	0,328		**	539,50 ± 77,80	754,78 ± 143,47	1,4
493	40,9	5,1	0,328		ns	1414,15 ± 135,14	1749,99 ± 270,55	1,2
495	40,4	6,8	0,022	> 80%	**	4523,15 ± 795,66	8497,43 ± 853,66	2,2 ↑
501	40,4	6,5	0,027		**	2142,71 ± 396,06	4198,32 ± 635,66	2,0
502	40,4	7,1	0,184		**	2250,32 ± 82,08	2571,04 ± 199,50	1,1
503	39,9	7,8	0,787		ns	4026,81 ± 646,47	3734,66 ± 459,34	1,1
508	39,4	8,3	0,914		ns	4833,38 ± 628,02	4697,52 ± 602,72	1,0
509	40,4	7,4	0,303		ns	3978,61 ± 481,01	4739,24 ± 451,52	1,2
513	39,4	5,7	0,007	> 80%	**	5190,75 ± 790,31	2295,62 ± 296,79	2,3 ↓
514	38,9	5,8	0,002	> 80%	**	1168,97 ± 149,62	485,53 ± 41,76	2,4 ↓

Nº de 'spot'	MM (kDa)	pI	Anova (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volumes normalizados	150 mM Volumes normalizados	Varição de volume
518	38,4	6,3	0,002	> 80%	**	1670,08 ± 147,33	637,95 ± 102,77	2,6 ↓
521	38,9	5,3	0,714		ns	3170,95 ± 922,26	3184,12 ± 324,23	1,0
523	38,9	5,4	0,730		ns	2933,58 ± 448,52	2713,57 ± 385,75	1,1
524	38,4	6,9	0,193		**	1784,74 ± 237,95	2284,59 ± 262,25	1,3
526	38,9	5,5	0,767		ns	4622,40 ± 853,60	4884,15 ± 689,18	1,1
537	39,4	5,3	0,222		ns	1800,47 ± 360,88	1314,47 ± 72,72	1,4
550	36,9	6,3	0,014	> 80%	**	521,52 ± 82,08	1002,91 ± 114,91	1,9 ↑
555	36,4	7,1	0,028	> 80%	**	508,77 ± 36,84	962,97 ± 44,09	1,9 ↑
559	36,4	6,8	0,161		**	1772,98 ± 204,47	2137,47 ± 126,54	1,2
561	37,4	5,2	0,585		ns	9080,89 ± 1443,86	9716,83 ± 685,98	1,1
565	36,4	4,9	0,006	> 80%	**	1284,91 ± 116,88	2250,76 ± 213,74	1,8 ↑
566	36,9	5,0	0,006	> 80%	**	1262,05 ± 190,57	2977,32 ± 457,89	2,4 ↑
573	36,4	5,3	0,404		ns	1425,86 ± 397,15	1686,08 ± 172,81	1,2
574	37,4	5,1	0,166		**	4798,00 ± 138,12	5713,70 ± 521,54	1,2
576	36,0	5,3	0,716		ns	7388,27 ± 1444,13	8021,66 ± 531,74	1,0
581	34,6	5,0	0,097		**	580,80 ± 77,33	1141,00 ± 249,18	2,0
585	34,6	6,6	0,044		**	702,81 ± 76,32	1096,31 ± 148,61	1,6
588	35,5	5,1	0,002	> 80%	**	5167,86 ± 378,38	8451,87 ± 548,63	1,6 ↑
594	33,7	5,2	0,827		ns	5788,56 ± 572,36	5605,58 ± 642,74	1,0
602	33,7	5,4	0,389		**	1959,28 ± 345,52	2233,58 ± 157,37	1,1
607	33,3	7,6	0,024	> 80%	**	4723,18 ± 526,82	3160,67 ± 104,17	1,5 ↓
608	33,3	8,0	0,029		**	2586,68 ± 282,99	1683,09 ± 165,77	1,5
609	34,2	5,5	0,860		ns	3057,29 ± 485,09	2882,02 ± 242,30	1,1
614	32,9	5,6	0,089		ns	3951,74 ± 678,82	2536,88 ± 341,27	1,6
618	32,9	6,1	0,038	> 80%	**	4683,93 ± 301,12	2344,52 ± 90,52	2,0 ↓
621	32,9	5,1	0,410		ns	609,32 ± 41,26	721,78 ± 98,45	1,2
626	32,4	5,5	0,574		ns	730,54 ± 172,22	828,36 ± 131,49	1,1
627	32,9	5,7	0,247		**	1263,11 ± 195,76	972,40 ± 83,93	1,3

Nº de 'spot'	MM (kDa)	pI	Anova (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volumes normalizados	150 mM Volumes normalizados	Varição de volume
628	32,9	4,9	0,076		**	2365,28 ± 302,14	1561,87 ± 187,05	1,5
630	32,9	6,9	0,007	> 80%	**	10550,99 ± 415,97	7599,23 ± 292,68	1,4 ↓
644	31,6	6,4	0,010	> 80%	**	1597,02 ± 80,92	977,48 ± 109,73	1,6 ↓
645	32,0	5,0	0,460		ns	2261,11 ± 280,92	1982,74 ± 146,38	1,1
646	30,4	6,0	0,009	> 80%	**	2042,50 ± 200,46	1253,95 ± 85,13	1,6 ↓
647	29,6	6,4	0,015	> 80%	**	2390,18 ± 162,01	1431,43 ± 207,91	1,7 ↓
656	30,4	5,1	0,036		**	1985,17 ± 495,35	838,18 ± 55,24	2,4
657	29,6	6,8	0,027	> 80%	**	12195,49 ± 403,68	6860,03 ± 256,62	1,8 ↓
662	29,6	7,2	0,021	> 80%	**	49447,31 ± 2633,61	20168,12 ± 989,56	50,7 ↓
663	30,0	7,6	0,204		ns	4344,91 ± 290,53	4958,01 ± 313,24	1,1
664	29,6	5,1	0,258		ns	7378,58 ± 914,56	9225,72 ± 1103,92	1,3
665	30,0	5,0	0,740		ns	7355,00 ± 648,95	7771,60 ± 830,82	1,1
667	30,0	4,9	0,788		ns	7296,29 ± 521,17	7115,30 ± 841,62	1,0
668	29,6	8,0	0,218		**	20626,45 ± 1642,72	15933,63 ± 1435,55	6,9
669	28,9	4,5	0,321		ns	3374,11 ± 571,19	3947,24 ± 213,91	1,2
677	29,2	4,9	0,032		**	14116,55 ± 1361,76	18699,53 ± 550,49	1,3
682	28,5	4,9	0,013	> 80%	**	2337,14 ± 177,42	3160,63 ± 135,52	1,4 ↑
683	28,1	4,9	0,001	> 80%	**	4017,05 ± 274,14	6159,32 ± 132,82	1,5 ↑
692	28,1	6,0	0,966		ns	2512,43 ± 209,43	2513,81 ± 269,21	1,0
693	27,8	5,2	0,825		ns	1196,24 ± 138,99	1335,01 ± 245,88	1,1
698	27,8	5,3	0,547		ns	2069,51 ± 265,02	1836,48 ± 227,53	1,1
699	27,8	5,9	0,399		ns	3204,65 ± 341,92	3741,35 ± 479,60	1,2
701	27,4	6,4	0,047		**	1517,06 ± 141,29	1048,86 ± 134,20	1,4
703	27,4	6,2	0,378		ns	7471,98 ± 1302,97	7142,54 ± 1213,63	10,6
708	27,4	6,5	0,359		ns	3046,85 ± 422,94	2518,97 ± 230,23	1,2
709	27,1	6,8	0,027	> 80%	**	2237,12 ± 147,33	983,81 ± 101,82	2,3 ↓
719	26,4	5,1	0,611		ns	1012,92 ± 110,46	931,15 ± 164,01	1,1
729	25,7	6,2	0,136		**	4112,67 ± 520,51	3100,55 ± 246,68	1,3

Nº de 'spot'	MM (kDa)	pI	Anova (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volumes normalizados	150 mM Volumes normalizados	Varição de volume
730	25,4	7,2	0,621		ns	2100,62 ± 539,68	1698,75 ± 122,81	1,2
732	26,0	6,0	0,013	> 80%	**	2468,55 ± 394,97	1210,36 ± 154,31	2,0 ↓
733	25,7	5,6	0,009	> 80%	**	1613,09 ± 227,75	862,86 ± 61,31	1,9 ↓
734	25,7	5,8	0,047	> 80%	**	1550,87 ± 228,39	577,14 ± 195,93	1,0 ↓
735	25,7	5,9	0,126		ns	1909,25 ± 212,74	1430,05 ± 149,46	1,3
737	25,7	5,1	0,857		ns	738,16 ± 76,58	726,62 ± 106,34	1,0
743	25,0	6,5	0,335		**	5718,18 ± 687,96	4870,85 ± 107,59	1,2
750	25,4	5,5	0,495		ns	1269,58 ± 151,14	1134,51 ± 63,85	1,1
752	24,7	5,3	0,036		**	1384,72 ± 167,07	2114,93 ± 211,03	1,5
756	24,1	5,2	0,003	> 80%	**	556,95 ± 35,93	357,35 ± 23,38	1,6 ↓
761	24,1	4,8	0,989		ns	7234,33 ± 804,11	7160,08 ± 481,41	1,0
765	24,4	4,9	0,177		ns	1261,72 ± 186,37	1691,07 ± 227,96	1,3
783	23,5	4,7	0,664		ns	5311,20 ± 848,41	5523,77 ± 133,13	1,0
785	22,9	7,2	0,386		**	2249,58 ± 282,85	2308,61 ± 66,45	2,9
786	22,9	4,9	0,204		**	1055,43 ± 186,56	1352,64 ± 147,56	1,3
787	23,2	6,7	0,265		**	2075,14 ± 125,55	2227,48 ± 28,28	1,1
788	23,2	7,0	0,370		ns	1938,76 ± 180,32	2192,19 ± 185,93	1,1
791	23,2	5,0	0,080		**	826,05 ± 66,59	1273,14 ± 238,76	1,5
792	23,2	5,0	0,161		**	2928,12 ± 537,71	3729,45 ± 117,92	1,3
795	23,2	7,8	0,011	> 80%	**	2400,79 ± 254,09	4130,85 ± 408,77	1,7 ↑
798	22,6	5,3	0,427		ns	3174,65 ± 272,97	2799,32 ± 347,16	1,1
801	22,9	5,6	0,231		ns	1691,60 ± 218,07	1346,33 ± 142,44	1,3
803	22,6	5,4	0,030		**	1704,03 ± 290,98	962,53 ± 99,71	1,8
806	22,6	5,5	0,246		ns	1488,66 ± 320,92	1005,13 ± 152,51	1,5
817	21,4	7,6	0,046		**	874,41 ± 97,52	568,83 ± 72,99	1,5
820	21,7	8,1	0,033		**	2445,33 ± 123,35	1619,06 ± 215,82	1,5
824	21,7	6,2	0,160		ns	2105,38 ± 341,68	1475,83 ± 206,33	1,4
828	21,4	4,8	0,456		ns	2367,46 ± 363,61	2658,96 ± 228,73	1,1

Nº de 'spot'	MM (kDa)	pI	Anova (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volumes normalizados	150 mM Volumes normalizados	Varição de volume
832	21,4	6,3	0,814		ns	1338,33 ± 220,03	1369,62 ± 135,21	1,0
846	20,9	5,4	0,104		ns	3493,64 ± 542,12	4816,60 ± 428,68	1,4
848	20,6	5,5	0,020	> 80%	**	3576,55 ± 566,78	6063,62 ± 506,28	1,7 ↑
852	20,1	6,3	0,122		ns	1277,42 ± 147,94	960,70 ± 105,24	1,3
855	20,9	6,0	0,037		**	4855,40 ± 874,57	2765,52 ± 226,13	1,8
860	20,6	8,8	0,223		**	3550,40 ± 285,13	4464,60 ± 546,75	1,3
864	20,4	6,8	0,558		ns	4915,52 ± 488,35	4492,95 ± 505,94	1,1
865	20,4	9,8	0,007	> 80%	**	11499,05 ± 588,97	6997,39 ± 795,63	1,6 ↓
867	20,6	5,3	0,799		ns	757,67 ± 138,30	798,87 ± 129,87	1,1
868	20,6	5,2	0,062		**	1235,53 ± 79,35	1454,01 ± 50,50	1,2
873	20,6	5,1	0,094		**	3219,84 ± 408,49	4155,02 ± 290,40	1,3
875	19,8	5,7	0,999		ns	1213,17 ± 118,27	1253,39 ± 220,16	1,0
881	19,1	4,7	0,186		ns	3527,04 ± 481,85	2783,34 ± 137,14	1,3
882	18,8	5,2	0,823		ns	3767,87 ± 380,39	3855,59 ± 289,97	1,0
884	19,1	5,5	0,289		ns	4232,12 ± 702,31	3376,65 ± 302,90	1,3
885	19,1	5,3	0,742		ns	2764,13 ± 666,59	2401,26 ± 402,03	1,2
886	19,1	5,8	0,067		**	2359,34 ± 121,38	1827,72 ± 202,88	1,3
891	19,1	6,0	0,014	> 80%	**	977,01 ± 113,47	634,81 ± 33,06	1,5 ↓
897	18,8	6,1	0,120		**	2360,73 ± 291,09	1781,44 ± 133,74	1,3
898	18,6	7,3	0,006	> 80%	**	2038,85 ± 269,20	3750,61 ± 349,48	1,8 ↑
913	17,9	7,9	0,002	> 80%	**	3675,87 ± 397,67	10611,19 ± 262,29	3,2 ↑
926	17,4	5,7	0,016	> 80%	**	1131,67 ± 28,65	751,86 ± 94,31	1,5 ↓
931	17,2	7,3	0,009	> 80%	**	921,16 ± 137,74	1847,34 ± 237,27	2,0 ↑
952	16,1	4,7	0,524		ns	13001,19 ± 1145,70	12202,83 ± 742,89	1,1
957	15,9	4,9	0,161		**	7501,99 ± 785,54	9639,80 ± 854,39	1,4
973	15,1	5,4	0,123		**	732,78 ± 81,33	562,38 ± 58,42	1,3
974	15,1	5,9	0,014	> 80%	**	1065,74 ± 54,72	595,40 ± 109,11	1,8 ↓
977	14,4	6,8	0,057		**	2236,64 ± 346,34	1428,36 ± 42,13	1,6

Nº de 'spot'	MM (kDa)	pI	Anova (<i>p</i>)	Poder de análise	Teste KS	Controlo Volumes normalizados	150 mM Volumes normalizados	Varição de volume
999	14,5	5,4	0,473		**	1124,31 ± 64,43	1041,71 ± 113,04	1,1
1002	14,4	5,9	0,021	> 80%	**	2917,17 ± 152,88	2085,68 ± 203,70	1,4 ↓
1023	13,8	7,8	0,089		**	2233,67 ± 149,99	2870,89 ± 277,62	1,3
1034	13,1	5,9	0,028		**	949,24 ± 111,20	574,54 ± 73,33	1,7
1040	13,1	5,1	0,614		ns	1934,83 ± 285,22	2116,15 ± 246,44	1,1
1041	12,8	6,9	0,123		ns	1489,82 ± 244,39	2174,12 ± 284,01	1,5
1043	12,9	5,2	0,130		**	1782,14 ± 284,25	1254,64 ± 65,06	1,4
1067	12,3	5,6	0,020	> 80%	**	203,09 ± 59,33	452,73 ± 45,58	2,2 ↑
1073	12,1	8,9	0,107		**	3305,91 ± 571,44	4525,64 ± 360,97	1,4
1084	11,7	6,1	0,973		ns	1036,86 ± 177,39	1003,75 ± 56,00	1,0
1086	11,4	6,5	0,814		ns	1735,86 ± 109,18	1842,99 ± 235,10	1,1
1096	11,1	7,6	0,041		**	1363,19 ± 182,27	1929,34 ± 98,74	1,4
1106	10,7	8,4	0,005	> 80%	**	1993,85 ± 142,80	3346,57 ± 294,75	1,7 ↑
1149	9,7	7,1	0,145		ns	1754,12 ± 275,32	2416,56 ± 301,62	1,4
1165	9,6	8,0	0,011	> 80%	**	2253,86 ± 247,63	4076,10 ± 430,51	1,8 ↑
1170	9,6	4,9	0,254		**	3006,43 ± 452,38	3543,23 ± 219,82	1,2
1179	9,5	5,2	0,025		**	1890,20 ± 183,00	1384,43 ± 66,81	1,4
1199	8,9	6,8	0,111		**	6447,45 ± 922,16	8859,27 ± 856,95	1,4
1238	8,3	5,2	0,123		**	2915,33 ± 216,48	2348,69 ± 231,92	1,2
1244	8,0	5,6	0,043		**	2402,42 ± 225,97	3103,57 ± 139,10	1,3
1250	8,0	5,8	0,421		**	1440,07 ± 228,11	1710,48 ± 257,58	1,2
1277	16,1	8,2	0,048	> 80%	**	2501,41 ± 506,57	4285,69 ± 487,93	1,7 ↑
1278	68,7	8,3	0,017	> 80%	**	1640,72 ± 131,87	301,40 ± 319,82	5,4 ↓
1280	68,7	8,4	0,008	> 80%	**	880,88 ± 133,10	220,28 ± 10,84	4,0 ↓
1281	55,8	5,7	0,045	> 80%	**	864,15 ± 178,00	441,30 ± 77,20	2,0 ↓
1282	27,1	7,9	0,885		ns	43174,75 ± 4538,79	45709,20 ± 4907,11	1,1
1285	9,2	4,3	0,243		ns	7228,82 ± 1087,10	9188,50 ± 1232,68	1,3

Entre os ‘spots’ cujos níveis de expressão aumentaram consideravelmente na condição de salinidade, destacam-se os polipéptidos 547, 566, 570, 586, 603 e 1093, que foram retirados dos géis e submetidos a um processo de digestão com tripsina e posterior identificação a partir do espectro de massas peptídico e da sequenciação por MS/MS (secção 2.3.3.5.). Destes seis ‘spots’ foi possível identificar apenas dois (586 e 603), os quais se revelaram ser a mesma proteína: a enzima pectinametilesterase (Tabela 3.11). Face aos valores de massa molecular e de pI muito próximos admitimos poder estar perante isoformas decorrentes de modificações pós-traducionais da mesma proteína (Vincent *et al.*, 2007). Com efeito, as modificações do tipo fosforilação, acetilação, glicosilação ou hidrólise específica de determinados péptidos alteram a massa molecular da proteína e, eventualmente, o seu pI, sendo possível a deteção dessas formas com base nos géis 2-D (Santos *et al.*, 2004). Quanto aos outros ‘spots’ analisados, não foram identificadas proteínas com confiança estatística dentro das seleções taxonómicas (‘Other green plants’ e ‘All entries’) disponíveis nas bases de dados ‘SwissProt’ e ‘NCBIInr’.

Relativamente à análise dos padrões eletroforéticos correspondentes à extração salina foram registadas variações significativas na abundância de alguns ‘spots’ entre o tecido caloso controlo e o crescido em meio salino. Tal como se pode verificar na Fig. 3.23 e na Tabela 3.10, observa-se um total de 52 ‘spots’ em que o poder de análise é superior a 80%, o que sugere que esses ‘spots’ resultam da adaptação do tecido ao meio salino; estas alterações foram observadas consistentemente nos vários replicados realizados. Nesse conjunto observa-se que o nível de expressão de 29 ‘spots’ correspondentes à amostra crescida em meio salino diminuiu comparativamente ao controlo, tendo a expressão dos restantes 23 aumentado. Destes polipéptidos procuraram-se identificar apenas alguns: ‘spots’ 618, 630, 647, 657 e 662 cuja abundância relativa é reduzida pela salinidade, e os ‘spots’ 495 e 848 que se mostram mais intensos no padrão proteico da condição salina. Após o tratamento das amostras com tripsina e a análise por espectrometria de massa (MS/MS) identificaram-se os ‘spots’ 647, 657 e 662 como sendo várias isoformas da enzima glucana-endo-1,3- β -glicosidase, o spot ‘495’ correspondendo à forma citosólica da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e o spot 848 como sendo uma proteína GLP (‘Germin-like protein’) (Tabela 3.11). Quanto aos outros dois ‘spots’ (618 e 630), os ‘scores’ obtidos para as sequências peptídicas identificadas a partir das bases de dados de proteínas acima referidas, bem como pela base de dados de ESTs, foram bastante inferiores

Tabela 3.11 – Lista dos polipéptidos diferencialmente expressos que foram recolhidos dos géis 2-D das frações solúvel e salina de tecido caloso de batateira e identificados por PMF+MS/MS. ↑, indica o aumento de expressão do polipéptido no tecido adaptado; ↓, decréscimo de expressão. I.C., intervalo de confiança.

	Nº de 'spot'	Variação de volume	Proteína (espécie)	Nº de acesso	Teórico		Aparente		Nº péptidos	'Protein score'	'Protein score' I.C. %
					MM	pI	MM	pI			
Fração solúvel	547	↑ 2,3	Não identificado				40,3	8,4			
	566	↑ 4,8	Não identificado				38,2	8,0			
	570	↑ 6,8	Não identificado				38,2	8,6			
	586	↑ 3,9	Pectinametilesterase (<i>S. tuberosum</i>)	gi 6689890	58,4	6,5	37,1	4,9	8	72	96,6%
	603	↑ 116,2	Pectinametilesterase 3 (<i>S. lycopersicum</i>)	PME3_SOLLC	60,2	7,25	36,1	5,1	9	161	100%
	1093	↑ 3,5	Não identificado				13,0	5,9			
Fração salina	495	↑ 2,2	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, citosólica (<i>Zea mays</i>)	gi 6166167	36,7	7,02	40,4	6,8	8	110	100%
	618	↓ 2,0	Não identificado				32,9	6,1			
	630	↓ 1,4	Não identificado				32,9	6,9			
	647	↓ 1,7	Glucana-endo-1,3-β-glicosidase, isoforma 2 (<i>S. tuberosum</i>)	E132_SOLTU	38,8	6,32	29,6	6,4	9	87	99,9%
	657	↓ 1,8	Glucana-endo-1,3-β-glicosidase, isoforma 3 (<i>S. tuberosum</i>)	E133_SOLTU	36,1	6,67	29,6	6,8	9	92	100%
	662	↓ 50,7	Glucana-endo-1,3-β-glicosidase, isoforma 1 (<i>S. tuberosum</i>)	E131_SOLTU	37,1	6,79	29,6	7,2	16	139	100%
	848	↑ 1,7	'Germin-like protein' (<i>Capsicum annuum</i>)	gi 39598906	23,2	8,53	20,6	5,5	5	142	100%

ao valor mínimo estabelecido com confiança estatística para aceitar a identidade atribuída pelas bases de dados.

Os mecanismos pelos quais as plantas adquirem a capacidade para crescer em ambientes salinos continuam a ser objeto de investigação atual, na medida em que a tolerância à salinidade é um mecanismo complexo que envolve alterações fisiológicas e metabólicas que resultam diretamente de modificações na expressão genética (Qureshi *et al.*, 2007; Kosová *et al.*, 2011). Neste sentido, a proteômica oferece a possibilidade de identificar alterações ao nível das proteínas e fornece pistas sobre as suas potenciais funções no processo de tolerância à salinidade (Abbasi & Komatsu, 2004; Parker *et al.*, 2006; Vincent & Zivy, 2007; Aghaei *et al.*, 2008; Timperio *et al.*, 2008; Zörb *et al.*, 2009; Manaa *et al.*, 2011).

A análise comparativa dos proteomas obtidos de duas linhas de calos de *A. hypogaea* com diferente tolerância à salinidade mostrou que a abundância relativa de diversas proteínas identificadas como proteínas PRs, nomeadamente da família PR-10, era mais elevada na linha tolerante (Jain *et al.*, 2006). Analogamente, uma proteína com homologia das PR-10 foi mais expressa no proteoma do tecido caulinar de videira regada com uma solução de 100 mM NaCl comparativamente ao respetivo controlo (Jellouli *et al.*, 2008). A maior expressão deste tipo de proteínas nas plantas em ambientes salinos sugere que poderão estar envolvidas na proteção das estruturas celulares dos danos causados pela salinidade (Jellouli *et al.*, 2008; Manaa *et al.*, 2011). Outras proteínas relacionadas com funções de defesa, tais como as HSPs e as proteínas homólogas de osmotina, surgiam mais expressas em plantas de batateira menos sensíveis à salinidade (Aghaei *et al.*, 2008). A osmotina é conhecida por se acumular nas linhas celulares de *N. tabacum* e de *S. tuberosum* adaptadas a níveis elevados de NaCl e de PEG, embora possa ser também induzida por outras situações de stress (Singh *et al.*, 1987, 1989; Leone *et al.*, 1994a,b; Zhu *et al.*, 1995). A sobre-expressão do gene de osmotina em plantas de batateira cultivadas *in vitro* em meio com NaCl veio realçar a importância desta proteína na tolerância salina destas plantas (Evers *et al.*, 1999). Mais recentemente, Aghaei *et al.* (2008) detetaram uma proteína homóloga à osmotina apenas no proteoma da cultivar de batateira referida como tolerante, estando ausente no proteoma da mais sensível, o que reforça o envolvimento deste tipo de proteínas na tolerância salina desta cultura.

A análise comparativa dos padrões eletroforéticos de calos de batateira crescidos na ausência e na presença de 150 mM de NaCl mostra que não houve síntese de novo de proteínas nas células do tecido caloso adaptado. No entanto, observaram-se variações significativas ao nível da abundância relativa de alguns polipéptidos presentes nos padrões dos géis 2-D das duas frações proteicas (solúvel e salina). Entre os 318 ‘spots’ proteicos reprodutíveis presentes nos géis das frações solúvel e salina, a análise quantitativa revelou que a abundância relativa de 38 ‘spots’ aumentou no tecido crescido em meio salino, tendo 31 sofrido um decréscimo de concentração comparativamente aos correspondentes ‘spots’ na situação controlo. Apesar de não ter sido possível analisar por espectrometria de massa a totalidade dos ‘spots’ diferencialmente expressos, tentaram identificar-se treze cuja quantidade se mostrou alterada nas células adaptadas a NaCl. Apenas sete foram identificados com elevado grau de confiança (Tabela 3.11). Entre estes, dois (‘spots’ 586 e 603) presentes nos géis da fração solúvel e cuja abundância relativa é mais elevada no tecido caloso adaptado do que no controlo correspondem à mesma forma proteica, à enzima pectinametilsterase.

As pectinametilsterases são enzimas que atuam sobre a parede celular, alterando o grau de metilesterificação das pectinas que fazem parte da lamela média desta estrutura (Pelloux *et al.*, 2007). Estudos realizados mostram que a adaptação das culturas de células de plantas de tabaco e milho à presença de elevadas concentrações de NaCl está associada a um aumento do teor de pectinas o que, à partida, parece resultar da menor capacidade dessas células para a síntese de celulose (McCann *et al.*, 1994; Schmohl & Horst, 2000). Efetivamente, a transferência destas células para meio sem sal traduz-se numa redução dos níveis de substâncias pécicas para valores inferiores aos das células não adaptadas (Schmohl & Horst, 2000). A toxicidade pelo alumínio é também indutora da quantidade de pectinas nas células do ápice da raiz, bem como da atividade da pectinametilsterase de diferentes plantas (Schmohl *et al.*, 2000; Eticha *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011). Estes trabalhos denotam uma relação entre o conteúdo de pectinas da parede e o grau de metilesterificação destas moléculas com a resistência ao stress. Adicionalmente, os níveis de expressão do gene que codifica esta enzima variam em resposta a fatores de stress abiótico e biótico (Pelloux *et al.*, 2007).

Contudo, é sabido que as proteínas da parede celular têm um importante papel no controlo da extensibilidade da parede e, conseqüentemente, na expansão celular (Zhu *et al.*, 2006). Em ambientes salinos, a expansão celular é reduzida pela diminuição da

turgescência, mas não pela extensibilidade da parede (Neumann *et al.*, 1988). Estudos realizados mostraram que a atividade e abundância de várias proteínas ligadas à parede celular, inclusive da pectinametilesterase, eram superiores nos ápices das raízes em condições de seca do que nas hidratadas, contribuindo para o aumento da extensão da parede e para o crescimento celular mesmo em condições desfavoráveis (Zhu *et al.*, 2006, 2007 e referências). Daí que a maior abundância da pectinametilesterase no tecido caloso adaptado possa estar associada com a manutenção do crescimento do tecido na presença de NaCl, apesar da perda de água ocorrida (2% em relação ao controle).

É compreensível que as proteínas da parede celular ou do espaço extracelular surjam alteradas em resposta à salinidade e não só, uma vez que o apoplasto é tido como uma importante barreira fisiológica aos fatores ambientais adversos, intervindo na percepção de sinais e fazendo parte do mecanismo de defesa constitutivo das plantas (Bhushan *et al.*, 2007; Vincent & Zivy, 2007). Askari *et al.* (2006) detetaram nos padrões 2-D da halófito *S. aegyptiaca* sujeita a elevadas concentrações salinas que entre as proteínas que surgiam aumentadas estava um grupo associado com a reorganização da parede celular e a estabilidade do citoesqueleto, que foi também identificado no proteoma da raiz da planta do arroz em presença de 150 mM de NaCl (Yan *et al.*, 2005). Comparando os proteomas de genótipos de tomateiro com diferente grau de tolerância ao sal, Manaa *et al.* (2011) verificaram que as proteínas envolvidas no reforço da parede celular tinham maior expressão na presença do sal, principalmente nas plantas mais tolerantes. Resultado um pouco diferente foi observado por Bhushan *et al.* (2007) quando analisaram o padrão de expressão de proteínas da matriz extracelular de plantas de *Cicer arietinum* em situação de seca e verificaram que os níveis de algumas proteínas relacionadas com a parede celular diminuía, tais como as proteínas responsáveis pela biossíntese de celulose e a enzima que catalisa a reação de hidrólise das ligações β -D-glicosídicas da β -1,3-glucana encontrada na parede celular, a denominada glucana-endo-1,3- β -glicosidase. No presente trabalho, observamos também que esta enzima nas suas várias isoformas sofreu uma diminuição na intensidade dos respectivos spots nos géis relativos à fração salina do tecido caloso crescido em meio salino ('spots' 647, 657 e 662, Tabela 3.11). Apesar desta proteína estar também implicada no processo de extensão da parede e no crescimento celular, é certo que a sua abundância foi reduzida nas raízes das plantas de milho sujeitas a déficit hídrico (Zhu *et al.*, 2007). Inclusivamente, no estudo comparativo de duas espécies C_4 do género *Cynodon* sob stress hídrico, Zhao *et al.* (2011) detetaram que a concentração desta proteína

aumentava apenas na espécie com maior sensibilidade à secura. O aumento do nível e da atividade da enzima foi já descrito em diferentes espécies de plantas em resposta a infeções provocadas por fungos e ao défice hídrico (Lee *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011; Acosta-Muñiz *et al.*, 2012); mas neste caso, a maior atividade desta hidrolase a par de outras (quitinase e celulase) foi interpretada como um sinal de danos causados pelo défice hídrico prolongado (Lee *et al.*, 2008). Com efeito, Bhushan *et al.* (2007) consideraram as alterações ocorridas ao nível das proteínas associadas ao apoplasto como uma resposta adaptativa ao stress hídrico imposto, pois para os autores caso a expressão da glucana-endo-1,3- β -glicosidase e de outras hidrolases tivesse aumentado tal facto seria justificado pela necessidade dos açúcares da parede celular serem usados para o ajustamento osmótico no citosol. Perante estas observações, podemos admitir que o facto da enzima glucana-endo-1,3- β -glicosidase ser menos abundante no tecido caloso adaptado ao sal poderá indiretamente contribuir para a estabilidade estrutural das paredes celulares.

Adicionalmente, foi também identificada a partir do padrão da fração salina uma proteína GLP ('spot' 848), cuja abundância relativa aumentou no tecido caloso mantido em meio salino. Trata-se de uma proteína que se inclui na família das 'germin-like proteins' (GLPs) que engloba um conjunto vasto de proteínas previamente identificadas em diversas espécies e que têm homologia com as germinas (El-Sharkawy *et al.*, 2010). Este grupo de proteínas parece assumir funções no desenvolvimento das plantas, mas é na resposta ao ataque por agentes patogénicos e de outros parasitas (nemátodos, insetos fitófagos) que se destacam (Bernier & Berna, 2001; Godfrey *et al.*, 2007). De tal forma, que houve já estudos em que se procedeu à sobre-expressão de certos genes GLP, conseguindo-se no final obter plantas com maior resistência à infeção pelo fungo causador do míldio (Zimmermann *et al.*, 2006; Manosalva *et al.*, 2009). As funções específicas destas proteínas do apoplasto estão ainda por esclarecer, embora tenha sido proposto que alguns membros das GLPs exibem uma atividade tipo a da SOD, contribuindo para a produção extracelular de H₂O₂ que, como já se referiu, assume o papel de molécula sinal na ativação das respostas de defesa a várias condições de stress (Godfrey *et al.*, 2007; Manosalva *et al.*, 2009). O aumento da expressão de uma GLP foi igualmente observado por Dani *et al.* (2005) aquando da caracterização do padrão de expressão de proteínas do apoplasto de plantas de tabaco sujeitas a um tratamento com 100 mM de NaCl, sendo esta proteína também identificada em condições de défice hídrico nas espécies do género *Cynodon* mas apenas nas plantas tolerantes à secura (Zhao *et al.*, 2011). Nestes estudos, a GLP foi

incluída na mesma categoria funcional que outras reconhecidas por terem um papel ativo nos mecanismos de defesa das plantas, nomeadamente as já referidas PRs que parecem ter estado envolvidas na aquisição da tolerância salina na linha de tecido caloso de *A. hypogaea* e que surgiram com uma concentração incrementada nos génotipos de tomateiro mais tolerantes ao sal, e as proteínas envolvidas na homeostasia redox como a SOD, APX, GST e DHAR, descritas por serem mais expressas nas plantas aclimatadas à secura e expostas à salinidade e a outras condições adversas (Jain *et al.*, 2006; Parker *et al.*, 2006; Zhen *et al.*, 2007; Xu & Huang, 2008; Xiao *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011).

A forma citosólica da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é a proteína correspondente ao ‘spot’ 495 presente nos géis 2-D da fração salina, que aparece em maior quantidade no tecido caloso crescido em meio salino. Esta enzima do citosol é essencial na via da glicólise, catalisando a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato na presença de NAD^+ e fosfato inorgânico, estando assim envolvida no metabolismo energético (Zou *et al.*, 2011). O aumento da expressão da enzima foi também observado em plantas expostas a condições de calor e de secura (Xu & Huang, 2008; Zhao *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011). Estudos anteriores evidenciavam já que condições ambientais adversas induzem um aumento na expressão dos genes que codificam esta enzima glicolítica (Laxalt *et al.*, 1996; Pillai *et al.*, 2002). Na batateira, Laxalt *et al.* (1996) observaram que o nível de transcritos da forma citosólica aumentou na sequência da infeção das plantas com *Phytophthora infestans* ou do tratamento com eliciadores, tendo sido acompanhado pelo aumento de outras enzimas conhecidas por participarem nas reações de defesa contra patógenos. Estas observações, juntamente com o nosso resultado estão de acordo com a existência de diversos processos celulares de adaptação que estão dependentes de energia (ATP) e que justificam o aumento de expressão desta enzima da via glicolítica. É, por exemplo, o caso da estimulação da atividade de bombas de H^+ que é fundamental para a compartimentação vacuolar do Na^+ e da síntese incrementada de solutos compatíveis necessários ao ajustamento osmótico.

Em conclusão, a análise proteómica baseada na separação por eletroforese bidimensional das proteínas solúveis e ionicamente ligadas revelou alterações ao nível da abundância relativa de algumas proteínas do tecido caloso crescido na presença de NaCl. Os resultados obtidos da identificação de alguns ‘spots’ revelam o aumento da quantidade de proteínas conhecidas como estando envolvidas nos mecanismos de defesa contra uma diversidade de

stresses e a variação na expressão de algumas enzimas da parede celular sugere que, de certo modo, podem contribuir para a adaptação do tecido caloso de batateira à salinidade. Estes resultados fornecem algumas pistas sobre os fatores determinantes da tolerância à salinidade no tecido caloso, no entanto, deverão ser explorados e alargados à identificação de outros ‘spots’ com o objetivo de melhor elucidar os mecanismos de resposta a esta condição ambiental adversa.

3.2.4. Avaliação genotípica através de marcadores RAPD

Neste trabalho tem-se vindo a verificar que a adaptação do tecido caloso de batateira a meio com 150 mM de NaCl envolve alterações a nível bioquímico e ultraestrutural, sendo que algumas dessas alterações parecem minimizar os efeitos adversos da salinidade e contribuir para o aspeto macroscópico que, como já se referiu, não difere do aspeto do tecido controlo mantido na ausência de sal. No entanto, a probabilidade da ocorrência de variação somaclonal é elevada nas culturas de tecido caloso, sobretudo se estas estiverem expostas a factores adversos (Gao *et al.*, 2010). Nesta perspetiva, o recurso ao método dos polimorfismos amplificados ao acaso (RAPD) poderá ser útil, no âmbito do nosso estudo, para se avaliar se existem alterações na molécula de DNA que permitam distinguir a linha celular adaptada ao sal da linha controlo. Deste modo, é possível determinar se a linha de tecido mantida na presença de 150 mM de NaCl está fisiologicamente adaptada à salinidade ou se trata de uma linha variante.

O método RAPD deteta polimorfismos na sequência nucleotídica do DNA genómico recorrendo à amplificação do DNA e à utilização de sequências arbitrárias de dez nucleotídeos capazes de se ligarem a cada uma das cadeias do DNA. Assim, a produção de marcadores RAPD baseia-se na probabilidade de uma sequência de DNA complementar à de um único ‘primer’ ocorrer em diferentes locais nas cadeias opostas do DNA molde (Tingey & del Tufo, 1993). Neste estudo, para a reação de amplificação do DNA extraído das linhas de calos controlo e adaptado ao sal foram usados quarenta ‘primers’ arbitrários dos ‘kits’ OPB 1-20 e OPE 1-20 da série Operon, dos quais apenas oito se mostraram capazes de fornecer padrões de bandas de DNA específicos e reprodutíveis. Na Figura 3.24 estão representados os padrões eletroforéticos dos produtos amplificados com os oito ‘primers’ selecionados e indicados na Tabela 3.12. Dos restantes ‘primers’ testados, em dois não houve amplificação (OPB-13 e OPE-01) e trinta geraram produtos de

amplificação que eram monomórficos, podendo ver-se na Figura 3.25 exemplos de padrões RAPDs obtidos por dois desses ‘primers’.

Tabela 3.12 – Lista dos ‘primers’ arbitrários selecionados e respectivos produtos polimórficos no tecido caloso controlo e adaptado a 150 mM de NaCl. +, indica o aparecimento de uma nova banda; –, ausência de banda.

‘Primer’	Sequência (5’ para 3’)	Massa molecular (bp)	Controlo	150 mM
OPB-01	GTTTCGCTCC	1980	+	–
OPB-04	GGACTGGAGT	887	+	–
		850	–	+
		820	+	–
OPB-09	TGGGGGACTC	1998	+	–
		580	–	+
		300	+	–
OPB-18	CCACAGCAGT	1095	–	+
		482	+	–
OPE-02	GGTGCGGGAA	566	+	–
OPE-06	AAGACCCCTC	1296	+	–
		1242	–	+
		547	+	–
OPE-14	TGCGGCTGAG	1804	+	–
OPE-19	ACGGCGTATG	2211	–	+
		1296	+	–

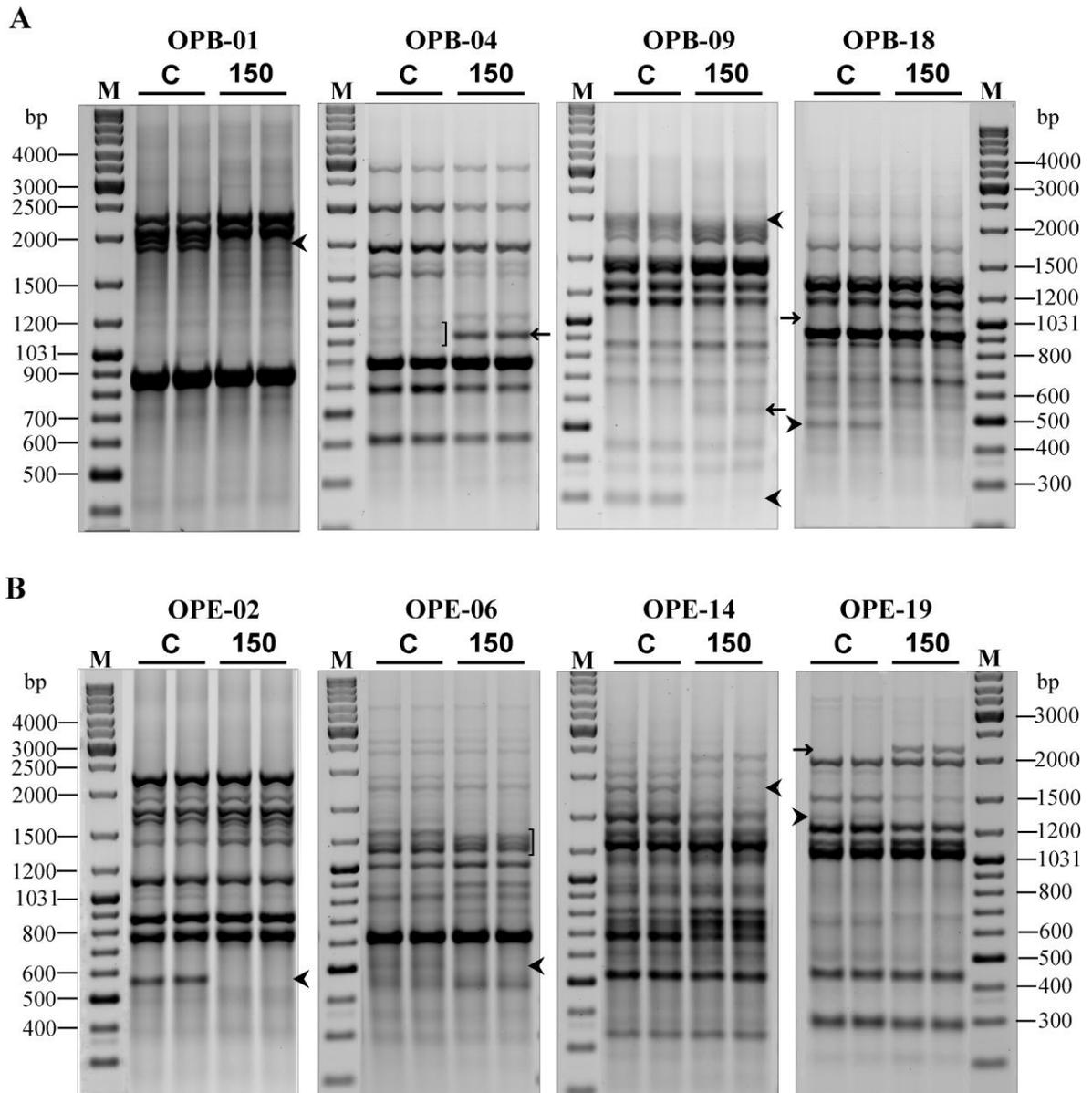


Figura 3.24 – Padrões de marcadores RAPDs específicos para o tecido caloso controle (c) e adaptado a 150 mM de NaCl (150) obtidos com os ‘primers’ dos ‘kits’ OPB (A) e OPE (B). Cada amostra foi analisada em quadruplicado para assegurar a reprodutibilidade entre os perfis, embora aqui estejam representados os padrões eletroforéticos em duplicado. As bandas polimórficas que permitiram discriminar a linha adaptada ao sal da linha controle estão assinaladas em cada um dos padrões gerados pelos ‘primers’ indicados no cimo dos géis; as setas indicam o aparecimento de novas bandas de DNA nas colunas referentes ao material crescido em meio salino, as pontas de setas assinalam as bandas que estão ausentes, mas que existem no controle. As barras evidenciam uma área do gel onde foram detetados polimorfismos entre as duas linhas de calos. M, Marcador molecular (1 kb).

A análise dos padrões RAPDs obtidos pelos ‘primers’ selecionados para as duas linhas de calos revelaram que dezasseis bandas com massas moleculares entre 300–2211 bp eram polimórficas, sendo estas detetadas através da presença e/ou ausência do produto amplificado em relação ao controle. Comparando os padrões de bandas de DNA,

vulgarmente designados por “impressão digital”, gerados, por exemplo, pelo ‘primer’ quatro do ‘kit’ OPB verificou-se que as bandas com massas moleculares próximas de 887 e 820 bp estavam ausentes no padrão do material crescido em meio salino, surgindo uma banda nova com cerca de 850 bp que não era detetada no padrão do controlo (Figura 3.24A). Também com um outro ‘primer’ OPB-18 foi possível detetar a ocorrência de polimorfismos, pois no gel do tecido adaptado apareciam duas bandas, sendo que uma delas (com massa molecular de 820 bp) estava presente e a outra (com cerca de 482 bp) ausente em relação ao gel controlo. Estes e os restantes ‘primers’ OPB-01 e OPB-09 ao gerarem padrões RAPDs diferentes entre o material controlo e o adaptado ao sal, mostraram que estamos perante duas linhas celulares geneticamente diferentes (Figura 3.24A).

Os resultados obtidos com a utilização dos ‘primers’ 2, 6, 14 e 19 do ‘kit’ OPE permitiram também mostrar um elevado grau de polimorfismo entre as linhas controlo e crescida em meio salino, uma vez que no conjunto geraram sete bandas polimórficas, como ilustrado na Figura 3.24B e indicado na Tabela 3.12. Entre estes ‘primers’, destacou-se o OPE-06 por ser aquele que produziu maior número de bandas polimórficas, após se ter comparado o padrão eletroforético dos RAPDs obtido para o tecido adaptado com o do controlo (Figura 3.24B e Tabela 3.12). Muito embora os ‘primers’ OPB-04 e OPB-09 tenham também gerado três bandas polimórficas pelo que, juntamente com o OPE-06, foram os ‘primers’ com maior capacidade para discriminar a linha adaptada ao sal da linha controlo.

No final, com o conjunto dos oito ‘primers’ foi possível obter as dezasseis bandas de RAPDs que tornaram evidente que a linha adaptada ao sal é diferente da linha controlo, sendo que onze estavam ausentes e as restantes cinco encontravam-se presentes nos padrões eletroforéticos do tecido caloso mantido na presença de 150 mM de NaCl (Tabela 3.12).

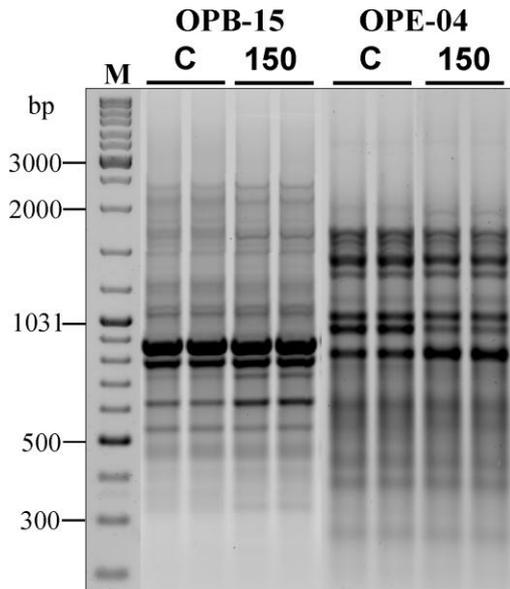


Figura 3.25 – Padrões de RAPDs para o tecido caloso controle (C) e adaptado a 150 mM de NaCl (150) obtidos com os ‘primers’ OPB-15 e OPE-04. Os padrões eletroforéticos para cada amostra estão representados em duplicado. Notar a ausência de polimorfismos na sequência da amplificação do DNA com estes ‘primers’. M, Marcador molecular (1 kb).

Com o objetivo de se detetarem possíveis alterações genotípicas causadas pela permanência do tecido caloso em condições salinas recorreu-se ao método RAPD que se baseia na molécula de DNA como fonte de informação de polimorfismos (Williams *et al.*, 1990). Esta técnica, contrariamente a outras, não requer o conhecimento prévio da sequência de DNA genómico, além de exigir pequenas quantidades de DNA para a deteção de polimorfismos, sendo uma técnica rápida e menos dispendiosa quando comparada com outras (Agarwal *et al.*, 2008). Provavelmente, estas razões fizeram com que a análise RAPD tenha sido bastante utilizada em estudos diversos relacionados com a identificação e caracterização de cultivares, a descrição de relações taxonómicas interespecíficas e determinação de relações filogenéticas entre espécies (Nguyen *et al.*, 2004; Chakrabarti *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2008).

Com base nos marcadores RAPD foi possível conhecer as relações genéticas entre as espécies do género *Solanum* e *Vigna*, informação fundamental para se definirem as estratégias a implementar para o melhoramento de certas espécies (Singh *et al.*, 2006; Dikshit *et al.*, 2007). Recentemente, Srivastava *et al.* (2011) recorreram aos marcadores RAPD para determinar a variação genética entre as cultivares de *V. mungo* provenientes de diferentes locais geográficos. Os RAPDs como método de “impressão digital” do DNA permitiram a destrição entre plantas mutantes, inclusivamente facilitaram a identificação de novas cultivares obtidas através da mutação induzida com raios gama (Kumar *et al.*, 2006; Chakrabarty & Datta, 2010). A obtenção de padrões de marcadores RAPD específicos para uma dada cultivar possibilita a sua identificação e discriminação

relativamente a outras, o que é vantajoso para a certificação do material de propagação vegetativa (Schiliro *et al.*, 2001; Chakrabarti *et al.*, 2006; Sucher & Carles, 2008; Moon *et al.*, 2010). Relativamente a este aspeto, vários grupos de trabalho têm optado pelo método RAPD para avaliarem a estabilidade genética de plantas micropropagadas, no sentido de validarem os procedimentos desenvolvidos para a multiplicação *in vitro* dessas plantas (Soneji *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Venkatachalam *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010).

A variação somaclonal é um fenómeno comum nas culturas de células e de tecidos, que resulta em parte do stress oxidativo induzido pelas técnicas de culturas *in vitro* (Larkin & Scowcroft, 1981; Batková *et al.*, 2008). Daí que este fenómeno pode ser agravado se as culturas forem expostas a condições desfavoráveis, nomeadamente de salinidade. Neste caso, a variação somaclonal pode ser útil para a seleção *in vitro* de linhas celulares tolerantes a NaCl, e caso haja a possibilidade de se regenerarem plantas a partir dessas linhas, constitui uma oportunidade para a obtenção de plantas capazes de crescer em meios com elevados níveis de NaCl (Brown & Thorpe, 1995; Rai *et al.*, 2011). De acordo com alguns autores, a melhor estratégia para contornar o problema da salinidade nos solos consiste no desenvolvimento de plantas tolerantes ao sal (Winicov, 1998; Munns *et al.*, 2002; Yamaguchi & Blumwald, 2005; Barrett-Lennard & Setter, 2010). Nesta perspetiva, as culturas *in vitro* têm sido apontadas como alternativa viável aos métodos tradicionais de melhoramento para a obtenção de plantas mais resistentes ao sal através da seleção de linhas celulares tolerantes a NaCl (Winicov, 1996; Jain, 2001; Vijayan *et al.*, 2003; Rai *et al.*, 2011). Contudo, o número de plantas efetivamente melhoradas por esta via é ainda muito reduzido, em parte devido à perda da capacidade regenerativa durante o processo de seleção *in vitro* na presença do sal e à frequente instabilidade da característica selecionada ao nível dos calos e das plantas regeneradas, que poderá estar associada às alterações epigenéticas muito frequentes nas culturas de tecidos. Admite-se que a metilação do DNA seja a principal causa das modificações epigenéticas, que são responsáveis por alterar a expressão genética e provocar a variação fenotípica por vezes referida na literatura, embora possam ocorrer outros mecanismos de alterações epigenéticas (Kaepler *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2010). Acrescente-se ainda o facto das variações epigenéticas serem transmitidas através de divisões mitóticas, prejudicando a seleção das células mutantes que, à partida, são aquelas que preservam a “verdadeira” tolerância salina (Tal, 1994). Segundo Jain (2001), a utilidade da variação somaclonal para o melhoramento de

plantas é condicionada pela estabilidade genética da característica em estudo quer ao nível das células selecionadas, quer ao nível das plantas regeneradas, sendo os marcadores moleculares como os RAPDs uma ferramenta bastante útil para identificar variantes somaclonais e avaliar a estabilidade genética da tolerância salina.

Perante as considerações feitas, e sabendo-se ainda que o processo que usámos para a obtenção do tecido caloso tolerante a 150 mM de NaCl, a seleção gradual, por envolver um maior número de subculturas do que a seleção direta, baseada numa única exposição ao sal, é mais favorável à ocorrência de alterações epigenéticas (Jain, 2001; Tal, 1994; Gao *et al.*, 2010), optou-se por proceder à análise genotípica da linha de tecido caloso crescida na presença de NaCl pelo método RAPD. O estudo realizado mostrou que a linha celular adaptada que foi usada como modelo experimental para conhecer alguns dos parâmetros que estão envolvidos na tolerância ao sal é geneticamente diferente da linha controlo. De facto, os padrões eletroforéticos dos produtos amplificados com os oito ‘primers’ apresentados na Tabela 3.12 revelaram a ocorrência de polimorfismos, tendo-se assim obtido padrões de DNA específicos para o tecido caloso adaptado a NaCl. Os ‘primers’ selecionados geraram um total de dezasseis marcadores RAPDs que permitiram discriminar o tecido caloso adaptado do tecido controlo. Os ‘primers’ com maior poder discriminante (OPB-04, OPB-09 e OPE-06) geraram respetivamente três bandas polimórficas cada um, verificando-se que era nos padrões eletroforéticos do tecido adaptado que se registava a maior ausência das bandas de RAPDs. Resultado idêntico foi observado por Liu *et al.* (2005, 2009) quando recorreram à análise RAPD para avaliar os efeitos de toxicidade a nível do DNA causados pela exposição de plantas a solos contaminados por cádmio (Cd); os autores notaram que o número de bandas polimórficas ausentes era superior nos perfis RAPDs correspondentes às plantas sujeitas às concentrações mais elevadas de Cd do que nas plantas não tratadas, o que sugeria que a estabilidade do DNA genómico era afetada pelo excesso do metal pesado. Contrariamente a Liu *et al.* (2009) que detetaram que as bandas polimórficas ausentes tinham pesos moleculares elevados, mostrando assim uma relação direta entre o tamanho dos produtos amplificados e as alterações no DNA induzidas pelo Cd, no nosso caso as bandas que estavam ausentes apresentavam pesos variáveis entre os 300 e 1998 bp, já os pesos moleculares das bandas que surgiam apenas nos perfis do material adaptado variavam entre os 580 e 2862 bp. Apesar de nenhum dos ‘primers’ referenciados ter produzido bandas polimórficas que fossem exclusivamente reveladas na linha de tecido caloso crescido em

meio salino, os marcadores RAPDs selecionados permitiram mostrar que esta é uma linha variante. Nas batateiras tolerantes ao sal regeneradas a partir de uma linha celular adaptada a 150 mM de NaCl bastou um marcador RAPD gerado por um dos setenta 'primers' ensaiados para demonstrar que essas plantas eram variantes somaclonais (Ochatt *et al.*, 1999).

O presente estudo vem confirmar a eficiência da técnica RAPD na detecção de polimorfismos no tecido caloso de batateira em resposta à salinidade do meio. Confirma-se assim que a capacidade do tecido caloso para crescer na presença de 150 mM de NaCl poderá estar também associada com o facto de se tratar de uma linha variante. Neste caso, haverá todo o interesse em se tentar a regeneração de plantas à semelhança de outros estudos, que a partir de linhas celulares previamente selecionadas conseguiram obter plantas que mostravam ser também tolerantes à salinidade (Winicov, 1991, 1996; Ochatt *et al.*, 1999; Shankhdhar *et al.*, 2000; Sharry & Silva, 2006; Rai *et al.*, 2011).

4. Conclusões e perspectivas futuras

4. Conclusões e perspectivas futuras

A salinidade é um dos fatores ambientais adversos que mais tem sido investigado pelo impacto negativo que tem no crescimento e produção das plantas, com repercussões em termos económicos e ambientais. Embora sejam conhecidos os efeitos da salinidade em diversos processos metabólicos, os mecanismos que conferem às plantas a capacidade para crescerem na presença de elevadas concentrações de sais não estão ainda completamente esclarecidos, continuando a serem objeto de investigação.

A complexidade da adaptação à salinidade resulta das interações entre vários processos fisiológicos a diferentes níveis de organização da planta para produzir os ajustamentos necessários à mitigação dos efeitos prejudiciais do excesso de sal. As culturas *in vitro* oferecem a possibilidade de selecionar linhas celulares adaptadas à salinidade que podem ser usadas como modelo experimental para estudar os mecanismos de tolerância a nível celular sem a interferência da organização estrutural que existe na planta intacta.

Perante a escassez de informação sobre a seleção *in vitro* e caracterização de linhas adaptadas a concentrações elevadas de NaCl para a batateira, no trabalho presente desenvolveu-se uma linha de tecido caloso capaz de crescer na presença de 150 mM de NaCl, com o objetivo de identificar aspetos do seu comportamento que possam ser determinantes da condição de tolerância à salinidade. Numa das abordagens, foram analisados os componentes enzimáticos e não-enzimáticos do sistema de defesa antioxidante na adaptação do tecido à salinidade e também na resposta ao tratamento de choque com 150 mM de NaCl. Os resultados obtidos da quantificação da atividade das principais enzimas por espectrofotometria e em gel nativo de poliacrilamida mostraram que, com a exceção da CAT, a salinidade afetou negativamente a atividade das enzimas responsáveis pela remoção das EROs, embora não tenha provocado alterações nos padrões isoenzimáticos, excetuando o da GR. Apesar do tecido caloso adaptado ter acumulado os maiores níveis de Na^+ e Cl^- , induzidos certamente pelo facto de permanecer continuamente em meio salino, os teores de K^+ e Ca^{2+} foram superiores aos encontrados na situação de choque salino, tal como a razão K^+/Na^+ , o que poderá justificar o facto da atividade da generalidade das enzimas surgir mais reduzida no tecido caloso sujeito a tratamento de choque com NaCl.

A salinidade induziu um aumento dos compostos com ação antioxidante ao verificar-se que os níveis de ascorbato (total e reduzido) e de glutatona na forma reduzida eram superiores no material exposto a 150 mM de NaCl. O conteúdo de α -tocoferol também aumentou em condições salinas, se bem que o tecido caloso adaptado tenha mostrado o maior incremento. Tendo em conta o papel do composto lipossolúvel na proteção contra a oxidação lipídica, é de concluir que esse aumento terá contribuído para que a peroxidação lipídica não surgisse aumentada na linha celular adaptada a NaCl. Adicionalmente, a acumulação de prolina ocorrida nesta linha poderá ter cooperado com o α -tocoferol na proteção das estruturas membranares contra o stress oxidativo, atendendo à função antioxidante atribuída ao aminoácido.

O comportamento do sistema de defesa antioxidante sugere que a tolerância ao sal da linha adaptada estará relacionada com o aumento dos metabolitos antioxidantes que, perante a ineficácia das enzimas no controlo dos níveis intracelulares de EROs, terão sido importantes para a homeostasia redox no tecido caloso crescido em meio salino.

A nível ultraestrutural, constatou-se que a integridade estrutural das células do tecido caloso crescido na presença de NaCl não foi afetada pelo facto de acumularem elevado teor de Na^+ , tendo-se notado inclusivamente que a organização geral das células era semelhante à das células do tecido controlo. Foram, no entanto, detetadas algumas alterações nos plastídios do tecido adaptado que se manifestavam por um menor grau de diferenciação destes organelos, acompanhado pelo aumento da quantidade de amido. A acumulação de amido induzida pela salinidade poderá ter sido benéfica para a adaptação das células à salinidade, na medida em que contribui para o equilíbrio osmótico e como suporte adicional como fonte de energia. A presença reduzida de peroxissomas com formações paracristalinas nas células do tecido caloso adaptado é coerente com a menor quantidade de CAT2 revelada por 'western blotting' neste material, tendo em conta que a CAT2 aparece sob a forma de cristais nos peroxissomas.

O facto de não se terem notado alterações ultraestruturais acentuadas nas células do tecido caloso adaptado a 150 mM de NaCl poderá estar também relacionado com a compartimentação no vacúolo do excesso de Na^+ quantificado neste tecido, ficando assim o citoplasma e organelos protegidos da toxicidade deste elemento. Com efeito, assistiu-se ao aumento das atividades hidrolítica e de bombeamento das duas bombas de H^+ nas vesículas de tonoplasto isoladas do tecido adaptado, que foram capazes de gerar um gradiente eletroquímico de H^+ transmembranar fundamental para a energização do sistema

antiporte Na^+/H^+ . Se bem que a $\text{V-H}^+\text{-PPase}$ tenha sido mais eficiente do que a $\text{V-H}^+\text{-ATPase}$ na formação e manutenção desse gradiente, o que resultou em parte do aumento da quantidade da enzima no tecido exposto a NaCl . A adição de Na^+ promoveu a dissipação do gradiente de H^+ , sugerindo o envolvimento de um sistema de transporte do tipo antiporte Na^+/H^+ na membrana vacuolar do tecido caloso de batateira, específico para o Na^+ e cuja atividade era superior nas vesículas do tecido adaptado. Em face destes resultados, conclui-se que as células do tecido caloso crescido em meio salino compartimentam o Na^+ no vacúolo como forma de restabelecerem a homeostasia iônica no citosol.

Numa outra abordagem desenvolvida neste trabalho recorreu-se à separação das proteínas solúveis e ionicamente ligadas presentes no tecido caloso crescido na presença de NaCl por eletroforese bidimensional (2-D) em géis de poliacrilamida. A análise comparativa dos perfis proteicos obtidos nas situações controlo e salina permitiram detetar alterações ao nível da abundância relativa de diversas formas proteicas separadas nos géis 2-D. Registou-se que cerca de 38 polipéptidos exibiam um aumento de expressão no padrão eletroforético do tecido exposto a NaCl , enquanto 31 polipéptidos surgiram com um nível de expressão diminuído. Embora não tenha sido possível identificar todos estes polipéptidos, a variação significativa de alguns deles antevia a possibilidade de puderem estar de certa forma envolvidos no processo de adaptação do tecido à salinidade. Entre as proteínas cuja quantidade variou destacam-se as que estão presentes no apoplasto, nomeadamente com funções na reorganização da parede celular (pectinametilsterases, isoformas de glucana-endo-1,3- β -glicosidase) e na defesa celular ('germin-like protein'), estando uma outra envolvida no metabolismo energético (forma citosólica de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

A aplicação da técnica RAPD para a análise do DNA genómico do tecido caloso crescido em meio salino veio confirmar que se trata de uma linha variante, pois permitiu detetar a ocorrência de polimorfismos após a obtenção de padrões RAPD específicos para este material. Um conjunto de oito 'primers' arbitrários gerou um total de dezasseis marcadores RAPD que discriminaram a linha de tecido adaptada ao sal da linha controlo.

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho leva-nos a considerar a possibilidade de se recorrer à tecnologia *in vitro* para a obtenção de linhas celulares adaptadas à salinidade de plantas com elevado valor agronómico, como é o caso da batateira que tem uma

tolerância moderada à salinidade. Os resultados apresentados demonstram a capacidade do tecido caloso para crescer na presença de 150 mM de NaCl e a utilidade deste sistema experimental para o estudo dos mecanismos de tolerância a nível celular, que oferece ainda a vantagem de poderem ser regeneradas plantas com maior resistência ao sal. Neste sentido, o facto de termos concluído estarmos perante uma linha celular variante, geneticamente diferente daquela que lhe deu origem, aumenta o interesse pela regeneração e, no caso de se obterem plantas viáveis, avaliar o seu comportamento em diferentes condições salinas (*in vitro* e *ex vitro*). A situação atual da salinidade em muitas regiões do globo terrestre que prejudica gravemente a produtividade agrícola, torna premente que se procurem vias alternativas aos programas tradicionais de melhoramento que pouco têm contribuído para o aumento da tolerância salina das plantas cultivadas.

Ao nível da compreensão dos mecanismos subjacentes à tolerância à salinidade no tecido caloso de batateira, parece-nos importante alargar a identificação das proteínas diferencialmente expressas nos padrões 2-D do tecido adaptado, pois acreditamos que estas proteínas podem estar direta ou indiretamente envolvidas na adaptação à salinidade. A identificação dessas proteínas torna possível definir a função biológica de cada uma delas no processo adaptativo a este tipo de stress ambiental, além de que possibilitará a identificação e clonagem dos respetivos genes, abrindo “caminho” ao desenvolvimento de plantas tolerantes à salinidade por via da engenharia genética.

5. Bibliografia

5. Bibliografia

- Abbasi A.-R., Hajirezaei M., Hofius D., Sonnewald U. & Voll L.M. (2007). Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology* **143**: 1720–1738.
- Abbasi A.-R., Saur A., Hennig P., Tschiersch H., Hajirezaei M., Hofius D., Sonnewald U. & Voll L.M. (2009). Tocopherol deficiency in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants leads to accelerated senescence. *Plant, Cell and Environment* **32**: 144–157.
- Abbasi F.M. & Komatsu S. (2004). A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics* **4**: 2072–2081.
- Abdelkader A.F., Aronsson H., Solymosi K., Böddi B. & Sundqvist C (2007). High salt stress induces swollen prothylakoids in dark-grown wheat and alters both prolamellar body transformation and reformation after irradiation. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2553–2564.
- Acosta-Muñiz C.H., Escobar-Tovar L., Valdes-Rodríguez S., Fernández-Pavia S., Arias-Saucedo L.J., Barquera M.C.E. & Lim M.Á.G. (2012). Identification of avocado (*Persea americana*) root proteins induced by infection with the oomycete *Phytophthora cinnamomi* using a proteomic approach. *Physiologia Plantarum* **144**: 59–72.
- Adams V.D. (1989). Methods for biological determination. In: *Water and Wastewater Examination Manual*. CRC Press, Taylor & Francis Group: 143–145.
- Afroz A., Ali G.M., Mir A. & Komatsu S. (2011). Application of proteomics to investigate stress-induced proteins for improvement in crop protection. *Plant Cell Reports* **30**: 745–763.
- Agarwal S. (2007). Increased antioxidant activity in *Cassia* seedlings under UV-B radiation. *Biologia Plantarum* **51**: 157–160.
- Agarwal M., Shrivastava N. & Padh H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* **27**: 617–631.
- Aghaei K., Ehsanpour A.A. & Komatsu S. (2008). Proteome analysis of potato under salt stress. *Journal of Proteome Research* **7**: 4858–4868.
- Aghaei K., Ehsanpour A.A. & Komatsu S. (2009). Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes. *Journal of Integrative Plant Biology* **51**: 1095–1103.
- Ahmad P., Jaleel C.A., Azooz M.M. & Nabi G. (2009). Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. *Botany Research International* **2**: 11–20.
- Ahsan N., Lee D.-G., Lee S.-H., Kang K.Y., Bahk J.D., Choi M.S., Lee I.-J., Renaut J. & Lee B.-H. (2007). A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. *Physiologia Plantarum* **131**: 555–570.
- Almeida J.M., Fidalgo F., Confraria A., Santos A., Pires H. & Santos I. (2005). Effect of hydrogen peroxide on catalase gene expression, isoform activities and levels in leaves of potato sprayed with homobrassinolide and ultrastructural changes in mesophyll cells. *Functional Plant Biology* **32**: 707–720.
- Alscher R.G., Donahue J.L. & Cramer C.L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* **100**: 224–233.
- Alscher R.G., Erturk N. & Heath L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1331–1341.
- Amako K., Chen G.-X. & Asada K. (1994). Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology* **35**: 497–504.
- Anderson M.D., Prasad T.K. & Stewart C.R. (1995). Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology* **109**: 1247–1257.
- Andersson M.X. & Sandelius A.S. (2004). A chloroplast-localized vesicular transport system: a bioinformatics approach. *BMC Genomics* **5**: 40–47.
- Anil V.S., Krishnamurthy H. & Mathew M.K. (2007). Limiting cytosolic Na⁺ confers salt tolerance to rice cells in culture: a two-photon microscopy study of SBFI-loaded cells. *Physiologia Plantarum* **129**: 607–621.

- Aono M., Saji H., Sakamoto A., Tanaka K., Kondo N. & Tanaka K. (1993). Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant and Cell Physiology* **34**: 129–135.
- Aono M., Saji H., Sakamoto A., Tanaka K., Kondo N. & Tanaka K. (1995). Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. *Plant and Cell Physiology* **36**: 1687–1691.
- Apel K. & Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373–399.
- Apse M.P. & Blumwald E. (2002). Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 146–150.
- Apse M.P. & Blumwald E. (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters* **581**: 2247–2254.
- Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A. & Blumwald E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 1256–1258.
- Aravind P. & Prasad M.N.V. (2005). Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 107–116.
- Arbona V., Hossain Z., López-Clement M.F., Pérez-Clemente R.M. & Gómez-Cadenas A. (2008). Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum* **132**: 452–466.
- Armengaud P., Thiery L., Buhot N., Grenier-De March G. & Saviouré A. (2004). Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiologia Plantarum* **120**: 442–450.
- Arzani A. (2008). Improving salinity tolerance in crop plants: a biotechnological view. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **44**: 373–383.
- Asada K. (1997). The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, J.G. Scandalios (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 715–735.
- Asada K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 601–639.
- Asada K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* **141**: 391–396.
- Ashraf M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances* **27**: 84–93.
- Ashraf M. & Ali Q. (2008). Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Environmental and Experimental Botany* **63**: 266–273.
- Ashraf M. & Foolad M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 206–216.
- Ashraf M. & Harris P.J.C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* **166**: 3–16.
- Askari H., Edqvist J., Hajheidari M., Kafi M. & Salekdeh G.H. (2006). Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics* **6**: 2542–2554.
- Athar H.-ur-R., Khan A. & Ashraf M. (2008). Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environmental and Experimental Botany* **63**: 224–231.
- Atkin O.K. & Macherel D. (2009). The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany* **103**: 581–597.
- Attia H., Arnaud N., Karray N. & Lachaâl M. (2008). Long-term effects of mild salt stress on growth, ion accumulation and superoxide dismutase expression of *Arabidopsis* rosette leaves. *Physiologia Plantarum* **63**: 293–205.
- Aubert S., Hennion F., Bouchereau A., Gout E., Bligny R. & Dome A.J. (1999). Subcellular compartmentation of proline in the leaves of the subantarctic Kerguelen cabbage *Pringlea antiscorbutica* R-Br. *In vivo* C-13 NMR study. *Plant, Cell and Environment* **22**: 255–259.
- Azpilicueta C.E., Benavides M.P., Tomaro M.L. & Gallego S.M. (2007). Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**: 589–595.

- Backhausen J.E., Klein M., Klocke M., Jung S. & Scheibe R. (2005). Salt tolerance of potato (*Solanum tuberosum* L. var. Désirée) plants depends on light intensity and air humidity. *Plant Science* **169**: 229–237.
- Badawi G.H., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kawano N., Tanaka K. & Tanaka K. (2004a). Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Science* **166**: 919–928.
- Badawi G.H., Kawano N., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kubo A. & Tanaka K. (2004b). Overexpression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiologia Plantarum* **121**: 231–238.
- Bajaj Y.P.S. (1987). Biotechnology and 21st century potato. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 3, Y.P.S. Bajaj (Eds). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 3–22.
- Bajji M., Kinet J.-M. & Lutts S. (1998). Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Science* **137**: 131–142.
- Balestrasse K.B., Gardey L., Gallego S.M. & Tomaro M.L. (2001). Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 497–504.
- Ballesteros E., Donaire J.P. & Belver A. (1996). Effects of salt stress on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Physiologia Plantarum* **97**: 259–268.
- Ballesteros E., Blumwald E., Donaire J.P. & Belver A. (1997). Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiologia Plantarum* **99**: 328–334.
- Ballesteros E., Kerkeb B., Donaire J.P. & Belver A. (1998). Effects of salt stress on H⁺-ATPase activity of plasma membrane-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Plant Science* **134**: 181–190.
- Banu M.N.A., Hoque M.A., Watanabe-Sugimoto M., Matsuoka K., Yoshimasa Nakamura Y., Shimoishi Y. & Murata Y. (2009). Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *Journal of Plant Physiology* **166**: 146–156.
- Barkla B.J. & Pantoja O. (1996). Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 159–184.
- Barkla B.J., Zingarelli L., Blumwald E. & Smith J.A.C. (1995). Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiology* **109**: 549–556.
- Barrett-Lennard E.G. & Setter T.L. (2010). Developing saline agriculture: moving from traits and genes to systems. *Functional Plant Biology* **37**: iii–iv.
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F.J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M.C., Valderrama R., Sandalio L.M. & del Río L.A. (2006). Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1785–1793.
- Bartels D. & Sunkar R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 23–58.
- Bartosz G. (1997). Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **19**: 47–64.
- Basu S., Gangopadhyay G., Mukherjee B.B. & Gupta S. (1997). Plant regeneration of salt adapted callus of indica rice (var. Basmati 370) in saline conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **50**: 153–159.
- Basu S., Gangopadhyay G. & Mukherjee B.B. (2002). Salt tolerance in rice *in vitro*: implication of accumulation of Na⁺, K⁺ and proline. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **69**: 55–64.
- Bates L.S., Waldren R.P. & Teare I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* **39**: 205–207.
- Batková P., Pospíšilová J. & Synková H. (2008). Production of reactive oxygen species and development of antioxidative systems during *in vitro* growth and *ex vitro* transfer. *Biologia Plantarum* **52**: 413–422.
- Becana M., Aparicio-Tejo P., Irigoyen J.J. & Sanchez-Diaz M. (1986). Some enzymes of hydrogen peroxide metabolism in leaves and root nodules of *Medicago sativa*. *Plant Physiology* **82**: 1169–1171.
- Becana M., Paris F.J., Sandalio L.M. & Del Río L.A. (1989). Isoenzymes of superoxide dismutase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Plant Physiology* **90**: 1286–1292.
- Ben Amor N., Jiménez A., Megdiche W., Lundqvist M., Sevilla F. & Abdelly C. (2006). Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. *Physiologia Plantarum* **126**: 446–457.

- Benavides M.P., Marconi P.L., Gallego S.M., Comba M.E. & Tomaro M.L. (2000). Relationship between antioxidant defence systems and salt tolerance in *Solanum tuberosum*. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 273–278.
- Ben-Hayyim G., Spiegel-Roy P. & Neumann H. (1985). Relation between ion accumulation of salt-sensitive and isolated stable salt-tolerant cell lines of *Citrus aurantium*. *Plant Physiology* **78**: 144–148.
- Ben-Hayyim G., Kafkafi U. & Ganmore-Neumann R. (1987). Role of internal potassium in maintaining growth of cultured *Citrus* cells on increasing NaCl and CaCl₂ concentrations. *Plant Physiology* **85**: 434–439.
- Bernier F. & Berna A. (2001). Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **26**: 349–358.
- Bertini I., Manganl S., Viezzoli M.S. (1998). Structure and properties of copper-zinc superoxide dismutases. *Advances in Inorganic Chemistry* **45**: 127–250.
- Bethke P.C. & Drew M.C. (1992). Stomatal and nonstomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annuum* during progressive exposure to NaCl salinity. *Plant Physiology* **99**: 219–226.
- Beyer R.E. (1994). The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 545–554.
- Bhandal I.S. & Malik C.P. (1988). Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *International Review of Cytology* **110**: 205–254.
- Bhargava P., Atri N., Srivastava A.K. & Rai L.C. (2007). Cadmium mitigates ultraviolet-B stress in *Anabaena doliolum*: enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *Biologia Plantarum* **51**: 546–550.
- Bhatnagar-Mathur P., Vadez V. & Sharma K.K. (2008). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports* **27**: 411–424.
- Bhushan D., Pandey A., Choudhary M.K., Datta A., Chakraborty S. & Chakraborty N. (2007). Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**: 1868–1884.
- Binzel M.L., Hasegawa P.M., Handa A.K. & Bressan R.A. (1985). Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiology* **79**: 118–125.
- Binzel M.L., Hasegawa P.M., Rhodes D., Handa S., Handa A.K. & Bressan R.A. (1987). Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiology* **84**: 1408–1415.
- Binzel M.L., Hess F.D., Bressan R.A. & Hasegawa P.M. (1988). Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiology* **86**: 607–614.
- Blokhina O., Virolainen E. & Fagerstedt K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: 179–194.
- Blumwald E. (2000). Sodium transport and salt tolerance in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **12**: 431–434.
- Blumwald E. & Poole R.J. (1985). Na⁺/H⁺ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **78**: 163–167.
- Blumwald E. & Poole R.J. (1987). Salt tolerance in suspension cultures of sugar beet. Induction of Na⁺/H⁺ antiport activity at the tonoplast by growth in salt. *Plant Physiology* **83**: 884–887.
- Blumwald E., Aharon G.S. & Apse M.P. (2000). Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 140–151.
- Bohnert H.J. & Jensen R.G. (1996). Metabolic engineering for increased salt tolerance – the next step. *Australian Journal of Plant Physiology* **23**: 661–667.
- Bohnert H.J., Nelson D.E. & Jensen R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* **7**: 1099–1111.
- Bor M., Özdemir F. & Türkan I. (2003). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science* **164**: 77–84.
- Bordallo P.N., Silva D.H., Maria J., Cruz C.D. & Fontes E.P. (2004). Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars. *Horticultura Brasileira* **22**: 300–304.
- Borsani O., Cuartero J., Fernández J.A., Valpuesta V. & Botella M.A. (2001). Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. *The Plant Cell* **13**: 873–887.
- Borsani O., Valpuesta V. & Botella M.A. (2003). Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **73**: 101–115.

- Bota J., Flexas J & Medrano H. (2004). Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress?. *New Phytologist* **162**: 671–681.
- Boughanmi N., Michonneau P., Daghfous D. & Fleurat-Lessard P. (2005). Adaptation of *Medicago sativa* cv. Gabès to long-term NaCl stress. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **168**: 262–268.
- Bowler C., Montagu M.V. & Inzé D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 83–116.
- Bowler C., Van Camp W., Van Montagu M. & Inzé D. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**: 199–218.
- Bueno P., Piqueras A., Kurepa J., Saviouré A., Verbruggen N., Montagu M.V. & Inzé D. (1998). Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Science* **138**: 27–34.
- Bunkelmann J.R. & Trelease R.N. (1996). Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiology* **110**: 589–598.
- Bush D.S. (1995). Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 95–122.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Bressan R.A., Hasegawa P.M. & Pardo J.M. (1998). Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends in Plant Science* **3**: 411–412.
- Brini F., Hanin M., Mezghani I., Berkowitz G.A. & Masmoudi K. (2007). Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter *TNHX1* and H⁺-pyrophosphatase *TVPI* improve salt- and drought-stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* plants. *Journal of Experimental Botany* **58**: 301–308.
- Britto D.T. & Kronzucker H.J. (2008). Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiologia Plantarum* **133**: 637–650.
- Britto D.T., Ebrahimi-Ardebili S., Hamam A.M., Coskun D. & Kronzucker H.J. (2010). ⁴²K analysis of sodium-induced potassium efflux in barley: mechanism and relevance to salt tolerance. *New Phytologist* **186**: 373–384.
- Broin M., Cuiñé S., Peltier G. & Rey P. (2000). Involvement of CDSP32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. *FEBS Letters* **467**: 245–248.
- Brown D.C.W. & Thorpe T.A. (1995). Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **11**: 409–415.
- Cai-Hong P., Su-Jun Z., Zhi-Zhong G. & Bao-Shan W. (2005). NaCl treatment markedly enhances H₂O₂-scavenging system in leaves of halophyte *Suaeda salsa*. *Physiologia Plantarum* **125**: 490–499.
- Cakmak I. (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **168**: 521–530.
- Camejo D., Martí M.C., Nicolás E., Alarcón J.J., Jiménez A. & Sevilla F. (2007). Response of superoxide dismutase isoenzymes in tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) during thermo-acclimation of the photosynthetic apparatus. *Physiologia Plantarum* **131**: 367–377.
- Cano E.A., Perez-Alfocea F., Moreno V. & Bolarin M. (1996). Responses of NaCl stress of cultivated and salt-tolerant breeding lines tomato species and their hybrids in callus cultures. *Plant Cell Reports* **15**: 791–794.
- Carden D.E., Walker D.J., Flowers T.J. & Miller A.J. (2003). Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na⁺ and K⁺ to salt tolerance. *Plant Physiology* **131**: 676–683.
- Carystinos G.D., MacDonald H.R., Monroy A.F., Dhindsa R.S. & Poole R.J. (1995). Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiology* **108**: 641–649.
- Castro A.J., Carapito C., Zorn N., Magné C., Leize E., Dorselaer A.V. & Clément C. (2005). Proteomic analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) tissues subjected to herbicide stress. *Journal of Experimental Botany* **56**: 2783–2795.
- Cavalcanti F.R., Oliveira J.T.A., Martins-Miranda A.S., Viegas R.A. & Silveira J.A.G. (2004). Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist* **163**: 563–571.
- Cavalcanti F.R., Lima J.P.M.S., Ferreira-Silva S.L., Viegas R.A. & Silveira J.A.G. (2007). Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. *Journal of Plant Physiology* **164**: 591–600.

- Cerezo M., García-Agustín P., Serna M.D. & Primo-Millo E. (1997). Kinetics of nitrate uptake by *Citrus* seedlings and inhibitory effects of salinity. *Plant Science* **126**: 105–112.
- Chakrabarti S.K., Pattanayak D., Sarkar D., Chimote V.P. & Naik P.S. (2006). Stability of RAPD fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. *Biologia Plantarum* **50**: 531–536.
- Chakrabarty D. & Datta S.K. (2010). Application of RAPD markers for characterization of γ -ray-induced rose mutants and assessment of genetic diversity. *Plant Biotechnology Report* **4**: 237–242.
- Chalapathi Rao A.S.V. & Reddy A.R. (2008). Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in plant cells. In: *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*, N.A. Khan (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 111–147.
- Chandler P.M. & Robertson M. (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**: 113–141.
- Chaparro J.X., Werner D.J., O'Malley D. & Sederoff R.R. (1994). Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. *Theoretical and Applied Genetics* **87**: 805–815.
- Chaprazadeh N., D'Amico M.L., Khavari-Nejad R.A., Izzo R. & Navari-Izzo F. (2004). Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 695–701.
- Chaves M.M. & Davies B. (2010). Drought effects and water use efficiency: improving crop production in dry environments. *Functional Plant Biology* **37**: iii–vi.
- Chaves M.M. & Oliveira M.M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2365–2384.
- Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J.P., Rodrigues M.L., Ricardo C.P.P., Osório M.L., Carvalho I., Faria T. & Pinheiro C. (2002). How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* **89**: 907–916.
- Chaves M.M., Maroco J.P. & Pereira J.S. (2003). Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**: 239–264.
- Chaves M.M., Flexas J. & Pinheiro C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**: 551–560.
- Chauhan S., Forsthoefel N., Ran Y., Quigley F., Nelson D.E. & Bohnert H.J. (2000). Na^+ /myo-inositol symporters and Na^+/H^+ -antiport in *Mesembryanthemum crystallinum*. *The Plant Journal* **24**: 511–522.
- Cheeseman J.M. (1988). Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology* **87**: 547–550.
- Chen H., Cui S., Fu S., Gai J. & Yu D. (2008). Identification of quantitative trait loci associated with salt tolerance during seedling growth in soybean (*Glycine max* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* **59**: 1086–1091.
- Chen S., Li J., Wang S., Hüttermann A. & Altman A. (2001). Salt, nutrient uptake and transport, and ABA of *Populus euphratica*; a hybrid in response to increasing soil NaCl. *Trees - Structure and Function* **15**: 186–194.
- Chen T.H. & Murata N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 250–257.
- Chen Z. & Gallie D.R. (2004). The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *The Plant Cell* **16**: 1143–1162.
- Chen Z. & Gallie D.R. (2005). Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance. *Plant Physiology* **138**: 1673–1689.
- Chen Z. & Gallie D.R. (2006). Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiology* **142**: 775–787.
- Chen Z. & Gallie D.R. (2008). Dehydroascorbate reductase affects non-photochemical quenching and photosynthetic performance. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 21347–21361.
- Chen Z., Newman I., Zhou M., Mendham N., Zhang G. & Shabala S. (2005). Screening plants for salt tolerance by measuring K^+ flux: a case study for barley. *Plant, Cell and Environment* **28**: 1230–1246.
- Chen Z., Pottosin I.I., Cuin T.A., Fuglsang A.T., Tester M., Jha D., Zepeda-Jazo I., Zhou M., Palmgren M.G., Newman I.A., & Shabala S. (2007a). Root plasma membrane transporters controlling K^+/Na^+ homeostasis in salt-stressed barley. *Plant Physiology* **145**: 1714–1725.
- Chen Z., Cuin T.A., Zhou M., Twomey A., Naidu B.P. & Shabala S. (2007b). Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **58**: 4245–4255.

- Cho U. & Seo N. (2005). Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* **168**: 113–120.
- Choudharya O.P., Josana A.S., Bajwaa M.S. & Kapurb M.L. (2004). Effect of sustained sodic and saline-sodic irrigation and application of gypsum and farmyard manure on yield and quality of sugarcane under semi-arid conditions. *Field Crops Research* **87**: 103–116.
- Clare D.A., Duong M.N., Darr D., Archibald F. & Fridovich I. (1984). Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains for catalase. *Analytical Biochemistry* **140**: 532–537.
- Claussen W. (2005). Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science* **168**: 241–248.
- Cobbett C.S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* **123**: 825–832.
- Cohu C.M. & Pilon M. (2007). Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability. *Physiologia Plantarum* **128**: 747–755.
- Collin V.C., Eymery F., Genty B., Rey P. & Havaux M. (2008). Vitamin E is essential for the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to metal-induced oxidative stress. *Plant, Cell and Environment* **31**: 244–257.
- Colombo R. & Cerana R. (1993). Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatase in NaCl-grown cells of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology* **142**: 226–229.
- Conklin P. (1998). Vitamin C: a new pathway for an old antioxidant. *Trends in Plant Science* **3**: 329–330.
- Conklin P. & Barth C. (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell and Environment* **27**: 959–970.
- Conklin P.L., Williams E.H. & Last R.L. (1996). Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 9970–9974.
- Conklin P.L., Pallanca J.E., Last R.L. & Smirnov N. (1997). L-Ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant *vtc1*. *Plant Physiology* **115**: 1277–1285.
- Conklin P.L., Saracco S.A., Norris S.R. & Last R.L. (2000). Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics* **154**: 847–856.
- Conklin P.L., Gatzek S., Wheeler G.L., Dowdle J., Raymond M.J., Rolinski S., Isupov M., Littlechild J.A. & Smirnov N. (2006). *Arabidopsis thaliana* VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 15662–15670.
- Corpas F. & Trelease R. (1998). Differential expression of ascorbate peroxidase and a putative molecular chaperone in the boundary membrane of differentiating cucumber seedling peroxisomes. *Journal of Plant Physiology* **153**: 332–338.
- Cosgrove D.J. (1997). Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell* **9**: 1031–1041.
- Cramer G.R. (2002). Sodium-calcium interactions under salinity stress. In: *Salinity: environment-plants-molecules*. A. Läuchli & U. Lüttge (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands: 205–228.
- Cramer G.R. & Jones R.L. (1996). Osmotic stress and abscisic acid reduce cytosolic calcium activities in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **19**: 1291–1298.
- Cramer G.R., Läuchli A. & Polito V.S. (1985). Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiology* **79**: 207–211.
- Cuartero J., Bolarín M.C., Asíns M.J. & Moreno V. (2006). Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1045–1058.
- Cuin T.A., Parsons D. & Shabala S. (2010). Wheat cultivars can be screened for NaCl salinity tolerance by measuring leaf chlorophyll content and shoot sap potassium. *Functional Plant Biology* **37**: 656–664.
- Dabuxilat M. & Ikeda M. (2005). Interactive effect of salinity and supplemental calcium application on growth and ionic concentration of soybean and cucumber plants. *Soil Science and Plant Nutrition* **51**: 549–555.
- Dani V., Simon W.J., Duranti M. & Croy R.R. (2005). Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics* **5**: 737–745.
- Darley C.P., Davies J.M. & Sanders D. (2000). Chill-induced changes in the activity and abundance of the vacuolar proton-pumping pyrophosphatase from mung bean hypocotyls. *Plant Physiology* **109**: 659–665.
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D. & Van Breusegem F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**: 779–795.

- Dat J., Pellinen R., Beeckman T., Van De Cotte B., Langebartels C., Kangasjärvi J., Inzé D. & Van Breusegem F. (2003). Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *The Plant Journal* **33**: 621–632.
- Davenport S.B., Gallego S.M., Benavides M.P. & Tomaro M.L. (2003). Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regulation* **40**: 81–88.
- Davey M.W., Montagu M.V., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I.J.J., Strain J.J., Favell D. & Fletcher J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 825–860.
- David A., Yadav S. & Bhatla S.C. (2010). Sodium chloride stress induces nitric oxide accumulation in root tips and oil body surface accompanying slower oleosin degradation in sunflower seedlings. *Physiologia Plantarum* **140**: 342–354.
- Davletova S., Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Oliver D.J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K. & Mittler R. (2005). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**: 268–281.
- De Costa W., Zörb C., Hartung W. & Schubert S. (2007). Salt resistance is determined by osmotic adjustment and abscisic acid in newly developed maize hybrids in the first phase of salt stress. *Physiologia Plantarum* **131**: 311–321.
- del Río L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gómez M. & Barroso J.B. (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1255–1272.
- del Río L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M. & Barroso J.B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **141**: 330–335.
- Demidchik V. & Tester M. (2002). Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots. *Plant Physiology* **128**: 379–387.
- Demiral T. & Türkan I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany* **53**: 247–257.
- Demiral T. & Türkan I. (2006). Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. *Environmental and Experimental Botany* **56**: 72–79.
- Demirevska-Kepova K., Simova-Stoilova L., Stoyanova Z.P. & Feller U. (2006). Cadmium stress in barley: growth, leaf pigment, and protein composition and detoxification of reactive oxygen species. *Journal of Plant Nutrition* **29**: 451–468.
- den Boer B.G.W. & Murray J.A.H. (2000). Triggering the cell cycle in plants. *Trends in Cell Biology* **10**: 245–250.
- Desikan R., Reynolds A., Hancock J.T. & Neill S.J. (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochemical Journal* **330**: 115–120.
- Devi S.R., Yamamoto Y. & Matsumoto H.S. (2003). An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**: 59–68.
- Devos K.M. & Gale M.D. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **84**: 567–572.
- Dietz K.J., Tavakoli N., Kluge C., Mimura T., Sharma S.S., Harris G.C., Chardonnens A.N. & Golldack D. (2001). Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1969–1980.
- Dikshit H.K., Jhang T., Singh N.K., Koundal K.R., Bansal K.C., Chandra N., Tickoo J.L. & Sharma T.R. (2007). Genetic differentiation of *Vigna* species by RAPD, URP and SSR markers. *Biologia Plantarum* **51**: 451–457.
- Ding S., Lu Q., Zhang Y., Yang Z., Wen X., Zhang L. & Lu C. (2009). Enhanced sensitivity to oxidative stress in transgenic tobacco plants with decreased glutathione reductase activity leads to a decrease in ascorbate pool and ascorbate redox state. *Plant Molecular Biology* **69**: 577–592.
- Dolatabadian A., Sanavy S.A.M.M. & Chashmi N.A. (2008). The effects of foliar application of ascorbic acid (vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of canola

- (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* **194**: 206–213.
- Domínguez D.M., Santiago R.T. & García F.C. (2009). Modulation of the antioxidative response of *Spartina densiflora* against iron exposure. *Physiologia Plantarum* **136**: 169–179.
- Domínguez D.M., García F.C., Raya A.C. & Santiago R.T. (2010). Cadmium-induced oxidative stress and the response of the antioxidative defense system in *Spartina densiflora*. *Physiologia Plantarum* **139**: 289–302.
- Domínguez-Valdivia M.D., Aparicio-Tejo P.M., Lamsfus C., Cruz C., Martins-Loução M.A. & Moran J.F. (2007). Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-tolerant and -sensitive plants. *Physiologia Plantarum* **132**: 359–369.
- Donahue J.L., Okpodu C.M., Cramer C.L., Grabau E.A. & Alischer R.G. (1997). Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. *Plant Physiology* **113**: 249–257.
- Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S. & Smirnoff N. (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal* **52**: 673–689.
- Dracup M. (1991). Increasing salt tolerance of plants through cell culture requires greater understanding of tolerance mechanisms. *Australian Journal of Plant Physiology* **18**: 1–15.
- DuPont F.M., Bennett A.B. & Spanswick R.M. (1982). Localization of a proton-translocating ATPase on sucrose gradients. *Plant Physiology* **70**: 1115–1119.
- Dutta Gupta S. (2007). Plasma membrane ultrastructure in embryogenic cultures of orchardgrass during NaCl stress. *Biologia Plantarum* **51**: 759–763.
- Edwards E.A., Rawsthorne S. & Mullineaux P.M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**: 278–284.
- Edwards E.A., Enard C., Creissen G.P. & Mullineaux P.M. (1994). Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta* **192**: 137–143.
- Elkahoui S., Hernández A.J., Abdelly C., Ghir R. & Limam Fb. (2005). Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. *Plant Science* **168**: 607–613.
- Elkhatib H.A., Elkhatib E.A., Khalaf-Allah A.M. & El-Sharkawy A.M. (2004). Salt tolerance of four potato cultivars. *Journal of Plant Nutrition* **27**: 1575–1583.
- Ellouzi H., Hamed K.B., Cela J., Munné-Bosch S. & Abdelly C. (2011). Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte). *Physiologia Plantarum* **142**: 128–143.
- El-Sharkawy I., Mila I., Bouzayen M. & Jayasankar S. (2010). Regulation of two germin-like protein genes during plum fruit development. *Journal of Experimental Botany* **61**: 1761–1770.
- Epstein E., Norlyn J.D., Rush D.W., Kingsbury R.W., Kelley D.B., Cunningham G.A. & Wrona A.F. (1980). Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* **210**: 399–404.
- Ericson M.C. & Alfinito S.H. (1984). Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture. *Plant Physiology* **74**: 506–509.
- Espinoza N.O., Estrada R., Silva-Rodriguez D., Tovar P., Lizarraga R. & Dodds J.H. (1986). The potato: a model crop plant for tissue culture. *Outlook on agriculture* **15**: 21–26.
- Eticha D., Stass A. & Horst W.J. (2005). Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance. *Plant, Cell and Environment* **28**: 1410–1420.
- Evers D., Overney S., Simon P., Greppin H. & Hausman J.F. (1999). Salt tolerance of *Solanum tuberosum* L. overexpressing an heterologous osmotin-like protein. *Biologia Plantarum* **42**: 105–112.
- Eymery F. & Rey P. (1999). Immunocytolocalization of two chloroplastic drought-induced stress proteins in well-watered or wilted *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 305–312.
- Façanha A.R. & de Meis L. (1998). Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiology* **116**: 1487–1495.
- Fadzilla N.M., Finch R.P. & Burdon R.H. (1997). Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Journal of Experimental Botany* **48**: 325–331.
- Faisal M. & Anis M. (2009). Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during ex vitro establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **99**: 125–132.
- FAO (2008). International year of the potato. <http://www.potato2008.org/en/index.html>.

- FAO (2011). Land and Plant Nutrition Management Service. ProSoil – Problem Soils Database. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/prosoil/salt.htm>. Acedido em Fevereiro de 2011.
- FAOSTAT. FAO Statistics Division. <http://faostat.fao.org/>. Acedido em Dezembro de 2011.
- Feierabend J. & Schrader-Reichhardt U. (1976). Biochemical differentiation of plastids and other organelles in rye leaves with a high-temperature-induced deficiency of plastid ribosomes. *Planta* **129**: 133–145.
- Fernie A.R. & Willmitzer L. (2001). Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology* **127**: 1459–1465.
- Ferreira A.L. & Lima-Costa M.E. (2008). Growth and ultrastructural characteristics of *Citrus* cells grown in medium containing NaCl. *Biologia Plantarum* **52**: 129–132.
- Fidalgo F. (1995). Tratamentos de batateiras com agroquímicos. Estudos bioquímicos e ultraestruturais de plantas crescidas no campo. Tese de doutoramento. Instituto de Botânica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. 212 pp.
- Fidalgo F., Santos A., Santos I. & Salema R. (2004). Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. *Annals of Applied Biology* **145**: 185–192.
- Fidalgo F., Freitas R., Ferreira R., Pessoa A.M. & Teixeira J. (2011). *Solanum nigrum* L. antioxidant defence system isozymes are regulated transcriptionally and posttranslationally in Cd induced stress. *Environmental and Experimental Botany* **72**: 312–319.
- Flexas J., Bota J., Loreto F., Cornic G. & Sharkey TD. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. *Plant Biology* **6**: 269–279.
- Flexas J., Ribas-Carbó M., Bota J., Galmés J., Henkle M., Martínez-Cañellas S. & Medrano H. (2006). Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist* **172**: 73–82.
- Flowers T.J. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **55**: 307–319.
- Flowers T.J. & Dalmond D. (1992). Protein synthesis in halophytes: the influence of potassium, sodium and magnesium *in vitro*. *Plant and Soil* **146**: 153–161.
- Flowers T.J. & Yeo A.R. (1995). Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next?. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**: 875–884.
- Flowers T.J. & Flowers S.A. (2005). Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders?. *Agricultural Water Management* **78**: 15–24.
- Flowers T.J. & Colmer T.D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* **179**: 945–963.
- Flowers T.J., Troke P.F. & Yeo A.R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **28**: 89–121.
- Flowers T.J., Hajibagherp M.A. & Yeo A.R. (1991). Ion accumulation in the cell walls of rice plants growing under saline conditions: evidence for the Oertli hypothesis. *Plant, Cell and Environment* **14**: 319–325.
- Flowers T.J., Garcia A., Koyama M. & Yeo A.R. (1997). Breeding for salt tolerance in crop plants - the role of molecular biology. *Acta Physiologiae Plantarum* **19**: 427–433.
- Flowers T.J., Gaur P.M., Gowda C.L.L., Krishnamurthy L., Samineni S., Siddique K.H.M., Turner N.C., Vadez V., Varshney R.K. & Colmer T.D. (2010). Salt sensitivity in chickpea. *Plant, Cell and Environment* **33**: 490–509.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist* **146**: 359–388.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**: 355–364.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2005a). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* **28**: 1056–1071.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2005b). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* **17**: 1866–1875.
- Foyer C.H. & Noctor G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology* **155**: 2–18.
- Foyer C.H. & Shigeoka S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology* **155**: 93–100.

- Foyer C.H., Lelandais M., Galap C. & Kunert K.J. (1991). Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiology* **97**: 863–872.
- Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.D. & Scott I.M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* **100**: 241–254.
- Foyer C.H., Theodoulou F.L. & Delrot S. (2001). The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science* **6**: 486–492.
- Francois L.E. & Maas E.V. (1994). Crop response and management on salt-affected soils. In: *Handbook of Plant and Crop Stress*, M. Pessarakli (Eds.). Marcel Dekker, New York: 149–181.
- Fricke W., Leigh R.A. & Tomos A.D. (1996). The intercellular distribution of vacuolar solutes in the epidermis and mesophyll of barley leaves changes in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1413–1426.
- Fricke W., Akhiyarova G., Wei W., Alexandersson A., Miller A., Kjellbom P.O., Richardson A., Wojciechowski T., Schreiber L., Veselov D., Kudoyarova G. & Volkov V. (2006). The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1079–1095.
- Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L., McCourt P., McPeck M.A., Thomas T.L. & McClung C.R. (1996). Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* **112**: 327–336.
- Fukuda A., Chiba K., Maeda M., Nakamura A., Maeshima M. & Tanaka Y. (2004a). Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H⁺-pyrophosphatase, H⁺-ATPase subunit A, and Na⁺/H⁺ antiporter from barley. *Journal of Experimental Botany* **55**: 585–594.
- Fukuda A., Nakamura A., Tagiri A., Tanaka H., Miyao A., Hirochika H. & Tanaka Y. (2004b). Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant and Cell Physiology* **45**: 146–159.
- Gabara B., Skłodowska M., Wyrwicka A., Glińska S. & Gapińska M. (2003). Changes in the ultrastructure of chloroplasts and mitochondria and antioxidant enzyme activity in *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves sprayed with acid rain. *Plant Science* **164**: 507–516.
- Gandonou C.B., Errabi T., Abrini J., Idaomar M. & Skali S.N. (2006). Selection of callus cultures of sugarcane (*Saccharum* sp.) tolerant to NaCl and their response to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **87**: 9–16.
- Gao F., Gao Q., Duan X., Yue G., Yang A. & Zhang J. (2006). Cloning of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3259–3270.
- Gao X., Yang D., Cao D., Ao M., Sui X., Wang Q., Kimatu J.N. & Wang L. (2010). *In vitro* micropropagation of *Freesia hybrida* and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. *Journal of Plant Growth Regulation* **29**: 257–267.
- Garbarino J. & DuPont F.M. (1988). NaCl induces a Na⁺/H⁺ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiology* **86**: 231–236.
- Garnczarska M. (2005). Response of the ascorbate-glutathione cycle to re-aeration following hypoxia in lupine roots. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 583–590.
- Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J.F. & Dommes J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* **37**: 263–285.
- Gaxiola R.A., Rao R.I., Sherman A., Grisafi P., Alper S.L. & Fink G.R. (1999). *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1 can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 1480–1485.
- Gaxiola R.A., Li J., Undurraga S., Dang L.M., Allen G.J., Alper S.L. & Fink G.R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 11444–11449.
- Gaxiola R.A., Palmgren M.G. & Schumacher K. (2007). Plant proton pumps. *FEBS Letters* **581**: 2204–2214.
- Ghars M.A., Parre E., Debez A., Bordenave M., Richard L., Leport L., Bouchereau A., Savauré A. & Abdelly C. (2008). Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. *Journal of Plant Physiology* **165**: 588–599.
- Ghassemi F., Jakeman A.J. & Nix H.A. (1995). Salinisation of land and water resources: human causes, extent, management and case studies. CAB International, UK: 526 pp.

- Ghosh N., Adak M.K., Ghosh P.D., Gupta S., Sen Gupta D.N. & Mandal C. (2011). Differential responses of two rice varieties to salt stress. *Plant Biotechnology Report* **5**: 89–103.
- Gierth M. & Mäser P. (2007). Potassium transporters in plants-involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Letters* **581**: 2348–2356.
- Gill S.S. & Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 909–930.
- Gillespie K.M., Rogers A. & Ainsworth E.A. (2011). Growth at elevated ozone or elevated carbon dioxide concentration alters antioxidant capacity and response to acute oxidative stress in soybean (*Glycine max*). *Journal of Experimental Botany* **62**: 2667–2678.
- Godfrey D., Able A.J. & Dry I.B. (2007). Induction of a grapevine germin-like protein (VvGLP3) gene is closely linked to the site of *Erysiphe necator* infection: a possible role in defense?. *The American Phytopathological Society* **20**: 1112–1125.
- Goffeau A. & Slayman C.W. (1981). The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **639**: 197–223.
- Gómez J.M., Hernández J.A., Jiménez A., del Río L.A. & Sevilla F. (1999). Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research* **31**: S11–S18.
- Gómez J.M., Jiménez A., Olmos E. & Sevilla F. (2004a). Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* **55**: 119–130.
- Gómez L.D., Vanacker H., Buchner P., Noctor G. & Foyer C.H. (2004b). Intercellular distribution of glutathione synthesis in maize leaves and its response to short-term chilling. *Plant Physiology* **134**: 1662–1671.
- Gómez L.D., Noctor G., Knight M.R. & Foyer C.H. (2004c). Regulation of calcium signalling and gene expression by glutathione. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1851–1859.
- Gomes-Junior R.A., Moldes C.A., Delite F.S., Pompeu G.B., Gratão P.L., Mazzafera P., Lea P.J. & Azevedo R.A. (2006a). Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* **65**: 1330–1337.
- Gomes-Junior R.A., Moldes C.A., Delite F.S., Gratão P.L., Mazzafera P., Lea P.J. & Azevedo R.A. (2006b). Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**: 420–429.
- Gomes-Junior R.A., Gratão P.L., Gaziola S.A., Mazzafera P., Lea P.J. & Azevedo R.A. (2007). Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. *Functional Plant Biology* **34**: 449–456.
- Goreta S., Bučević-Popović V., Pavela-Vrančić M. & Perica S. (2007). Salinity-induced changes in growth, superoxide dismutase activity, and ion content of two olive cultivars. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **170**: 398–403.
- Gossett D.R., Millhollon E.P. & Lucas M.C. (1994a). Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science* **34**: 706–714.
- Gossett D.R., Millhollon E.P., Lucas M.C., Banks S.W. & Marney M.-M. (1994b). The effects of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt-tolerant and salt-sensitive cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* **13**: 498–503.
- Gossett D.R., Banks S.W., Millhollon E.P. & Lucas M.C. (1996). Antioxidant response to NaCl stress in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine, and exogenous glutathione. *Plant Physiology* **112**: 803–809.
- Goyal K., Walton L.J. & Tunnacliffe A. (2005). LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* **388**: 151–157.
- Grattapaglia D. & Sederoff R. (1994). Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* **137**: 1121–1137.
- Greenway H. (1972). Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. *Plant Physiology* **49**: 256–259.
- Greenway H. & Munns R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology* **31**: 149–190.
- Gu R., Liu Q., Pei D. & Jiang X. (2004). Understanding saline and osmotic tolerance of *Populus euphratica* suspended cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **78**: 261–265.

- Guan L.M. & Scandalios J.G. (2000). Hydrogen-peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free Radical Biology and Medicine* **28**: 1182–1190.
- Guan L.M., Zhao J. & Scandalios J.G. (2000). *Cis*-elements and *trans*-factors that regulate expression of the maize Cat1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *The Plant Journal* **22**: 87–95.
- Gueta-Dahan Y., Yaniv Z., Zilinskas B.A. & Ben-Hayyim G. (1997). Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in *Citrus*. *Planta* **203**: 460–469.
- Guo W.L., Wu R., Zhang Y.F., Liu X.M., Wang H.Y., Gong L., Zhang Z.H. & Liu B. (2007). Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f. *Plant Cell Reports* **26**: 1297–1307.
- Gupta A.S., Alscher R.G. & McCune D. (1991). Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiology* **96**: 650–655.
- Gupta A.S., Heinen J.L., Holaday A.S., Burke J.J. & Allen R.D. (1993). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 1629–1633.
- Haghjou M.M., Shariati M. & Smirnov N. (2009). The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate–glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiologia Plantarum* **135**: 272–280.
- Halliwell B. (2000). Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?. *Cardiovascular Research* **47**: 410–418.
- Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* **141**: 312–322.
- Halliwell B. & Chirico S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition* **57**: 715S–725S.
- Halliwell B. & Foyer C. (1978). Properties and physiological function of glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* **139**: 9–17.
- Hamada A., Shono M., Xia T., Ohta M., Hayashi Y., Tanaka A. & Hayakawa T. (2001). Isolation and characterization of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Molecular Biology* **46**: 35–42.
- Hanana M., Cagnac O., Yamaguchi T., Hamdi S., Ghorbel A. & Blumwald E. (2007). A grape berry (*Vitis vinifera* L.) cation/proton antiporter is associated with berry ripening. *Plant and Cell Physiology* **48**: 804–811.
- Hanqing F., Yifeng W., Hongyu L., Rongfang W., Kun S. & Lingyun J. (2010). Salt stress-induced expression of rice AOX1a is mediated through an accumulation of hydrogen peroxide. *Biologia* **65**: 868–873.
- Hartmann T.N., Fricker M.D., Rennenberg H. & Meyer A.J. (2003). Cell-specific measurement of cytosolic glutathione in poplar leaves. *Plant, Cell and Environment* **26**: 965–975.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.-K. & Bohnert H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 463–499.
- Hassan N.M., Serag M.S., El-Feky F.M. & Nemat Alla M.M. (2008). *In vitro* selection of mung bean and tomato for improving tolerance to NaCl. *Annals of Applied Biology* **152**: 319–330.
- Hauser F. & Horie T. (2010). A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by HKT transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell and Environment* **33**: 552–565.
- Hawkins H.-J. & Lips S.H. (1997). Cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. as a model system for N and salinity response effect of salinity on NO₃⁻ uptake and PM-ATPase activity. *Journal of Plant Physiology* **150**: 103–109.
- He T. & Cramer G.R. (1992). Growth and mineral nutrition of six rapid-cycling *Brassica* species in response to seawater salinity. *Plant and Soil* **139**: 285–294.
- Heath R.L. & Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**: 189–198.
- Henriksson E. & Henriksson K.N. (2005). Salt-stress signalling and the role of calcium in the regulation of the *Arabidopsis* ATHB7 gene. *Plant, Cell and Environment* **28**: 202–210.
- Hernández J.A. & Almansa M.S. (2002). Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum* **115**: 251–257.

- Hernández J.A., Corpas F.J., Gómez M., del Río L.A. & Sevilla F. (1993). Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum* **89**: 103–110.
- Hernández J.A., del Río L.A. & Sevilla F. (1994). Salt stress-induced changes in superoxide dismutase isozymes in leaves and mesophyll protoplasts from *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *New Phytologist* **126**: 37–44.
- Hernández J.A., Olmos E., Corpas F.J., Sevilla F. & del Río L.A. (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science* **105**: 151–167.
- Hernández J.A., Campillo A., Jiménez A., Alarcón J.J. & Sevilla F. (1999). Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytologist* **141**: 241–251.
- Hernández J.A., Jiménez A., Mullineaux P. & Sevilla F. (2000). Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment* **23**: 853–862.
- Hernández J.A., Ferrer M.A., Jiménez A., Barceló A.R. & Sevilla F. (2001). Antioxidant systems and O₂⁻/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* **127**: 817–831.
- Heuer B. & Nadler A. (1995). Growth and development of potatoes under salinity and water deficit. *Australian Journal of Agricultural Research* **46**: 1477–1486.
- Heuer B. & Nadler A. (1998). Physiological response of potato plants to soil salinity and water deficit. *Plant Science* **137**: 43–51.
- Hideg E., Barta C., Kálai T., Vass I., Hideg K. & Asada K. (2002). Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescence sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiology* **43**: 1154–1164.
- Hideg E., Rosenqvist E., Váradi G., Bornman J. & Vincze E. (2006). A comparison of UV-B induced stress responses in three barley cultivars. *Functional Plant Biology* **33**: 77–90.
- Hien D.T., Jacobs M., Angenon G., Hermans C., Thu T.T., Son L.V. & Roosens N.H. (2003). Proline accumulation and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. *Plant Science* **165**: 1059–1068.
- Higinbotham N. (1973). Electropotential of plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **24**: 25–46.
- Hmida-Sayari A., Gargouri-Bouziid R., Bidani A., Jaoua L., Saviouré A. & Jaoua S. (2005). Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Science* **169**: 746–752.
- Hoffmann G.J. (1990). Leaching fraction and root zone salinity control. In: *Agricultural salinity assessment and management*, K.K. Tanji (Eds.). American Society of Civil Engineers, New York: 237–261.
- Hong-Hermesdorf A., Brüx A., Grüber A., Grüber G. & Schumacher K. (2006). A WNK kinase binds and phosphorylates V-ATPase subunit C. *FEBS Letters* **580**: 932–939.
- Hong Z., Lakkineni K., Zhang Z. & Verma D.P. (2000). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* **122**: 1129–1136.
- Hoque M.A., Okuma E., Banu M.N.A., Nakamura Y., Shimoishi Y. & Murata Y. (2007a). 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.
- Hoque M.A., Banu M.N.A., Okuma E., Amako K., Nakamura Y., Shimoishi Y. & Murata Y. (2007b). Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. *Journal of Plant Physiology* **164**: 1457–1468.
- Horie T. & Schroeder J.I. (2004). Sodium transporters in plants. Diverse genes and physiological functions. *Plant Physiology* **136**: 2457–2462.
- Horneck D.A., Ellsworth J.W., Hopkins B.G., Sullivan D.M. & Stevens R.G. (2007). Managing salt-affected soils for crop production. PNW Extension publication 601-E, Oregon State University, University of Idaho, Washington: 28 pp.
- Horton D. & Anderson J. (1992). Potato production in the context of the world and farm economy. In: *The potato crop. The scientific basis for improvement*, P. Harris (Eds). Chapman & Hall, London: 794–815.
- Hossain M.A. & Asada K. (1984). Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiology* **25**: 85–92.

- Hossain Z., Mandal A.K.A., Datta S.K. & Biswas A.K. (2006). Isolation of a NaCl-tolerant mutant of *Chrysanthemum morifolium* by gamma radiation: *in vitro* mutagenesis and selection by salt stress. *Functional Plant Biology* **33**: 91–101.
- Hossain Z., Mandal A.K.A., Datta S.K. & Biswas A.K. (2007). Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line. *Journal of Biotechnology* **129**: 658–667.
- Hu X., Jiang M., Zhang A. & Lu J. (2005). Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta* **223**: 57–68.
- Huang C., He W., Guo J., Chang X., Su P. & Zhang L. (2005). Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *Journal of Experimental Botany* **56**: 3041–3049.
- Huang W.L. & Liu F.L. (2002). Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **43**: 107–113.
- Husemann W. (1985). Photoautotrophic growth of cells in culture. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, I.K. Vasil (Eds.). Academic Press Inc, New York, London: 213–252.
- Hu X., Jiang M., Zhang A. & Lu J. (2005). Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta* **223**: 57–68.
- Hyun T.K., Kumar K., Rao K.P., Sinha A.K. & Roitsch T. (2011). Role of α -tocopherol in cellular signaling: α -tocopherol inhibits stress-induced mitogen-activated protein kinase activation. *Plant Biotechnology Reports* **5**: 19–25.
- Imlay J.A. & Linn S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**: 1302–1309.
- INE (2010). Estadísticas Agrícolas 2010. *Instituto Nacional de Estadística, I.P.*
- IPCC (2007). Intergovernmental Panel on Climate Change. <http://www.ipcc.ch/>. Acedido em Fevereiro de 2011.
- Jacobsen T. & Adams R.M. (1958). Salt and silt in ancient mesopotamian agriculture. *Science* **128**: 1251–1258.
- Jain S.M. (2001). Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* **118**: 153–166.
- Jain S., Srivastava S., Sarin N.B. & Kav N.N.V. (2006). Proteomics reveals elevated levels of PR 10 proteins in saline-tolerant peanut (*Arachis hypogaea*) calli. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**: 253–259.
- James R.A., Rivelli A.R., Munns R. & von Caemmerer S. (2002). Factors affecting CO₂ assimilation, leaf injury and growth in salt-stressed durum wheat. *Functional Plant Biology* **29**: 1393–1403.
- Jaspers P. & Kangasjärvi J. (2010). Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum* **138**: 405–413.
- Jellouli N., Ben Jouira H., Skouri H., Ghorbel A., Gourgouri A. & Mliki A. (2008). Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. *Journal of Plant Physiology* **165**: 471–481.
- Jiménez A., Hernández J.A., del Río L.A. & Sevilla F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* **114**: 275–284.
- Jiménez A., Hernández J.A., Barceló A.R., Sandalio L.M., del Río L.A. & Sevilla F. (1998a). Mitochondrial and peroxisomal ascorbate peroxidase of pea leaves. *Physiologia Plantarum* **104**: 687–692.
- Jiménez A., Hernández J.A., Pastori G., del Río L.A. & Sevilla F. (1998b). Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology* **118**: 1327–1335.
- Jorrín-Novo J.V., Maldonado A.M., Echevarría-Zomeño S., Valledor L., Castillejo M.A., Curto M., Valero J., Sghaier B., Donoso G. & Redondo I. (2009). Plant proteomics update (2007-2008): Second-generation proteomic techniques, an appropriate experimental design, and data analysis to fulfill MIAPE standards, increase plant proteome coverage and expand biological knowledge. *Journal of Proteomics* **72**: 285–314.
- Kaback H.R. (1974). Transport studies in bacterial membrane vesicles. *Science* **186**: 882–892.
- Kader M.A., Lindberg S., Seidel T., Gollack D., Yemelyanov V. (2007). Sodium sensing induces different changes in free cytosolic calcium concentration and pH in salt-tolerant and -sensitive rice (*Oryza sativa*) cultivars. *Physiologia Plantarum* **130**: 99–111.
- Kaepler S.M., Kaepler H.F. & Rhee Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* **43**: 179–188.
- Kao W.-Y., Tsai T.-T. & Shih C.-N. (2003). Photosynthetic gas exchange and chlorophyll a fluorescence of three wild soybean species in response to NaCl treatments. *Photosynthetica* **41**: 415–419.

- Kang J.-y, Choi H.-in, Im M.-y. & Kim S.Y. (2002). Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *The Plant Cell* **14**: 343–357.
- Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B., Wingsle G., Creissen G. & Mullineaux P. (1999). Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 654–657.
- Karrenberg S., Edelstein C., Lexer C. & Rieseberg L. (2006). Response to salinity in the homoploid hybrid species *Helianthus paradoxus* and its progenitors *H. annuus* and *H. petiolaris*. *New Phytologist* **170**: 615–629.
- Kasukabe N., Watanabe-Sugimoto M., Matsuoka K., Okuma E., Obi I., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y. & Kakutani T. (2006). Expression and Ca²⁺ dependency of plasma membrane K⁺ channels of tobacco suspension cells adapted to salt stress. *Plant Cell Physiology* **47**: 1674–1677.
- Katerji N., van Hoorn J.W., Hamdy A. & Mastroianni M. (2000) Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. *Agricultural Water Management* **43**: 99–109.
- Kaya C., Kirnak H., Higgs D. & Saltali K. (2002). Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. *Scientia Horticulturae* **93**: 65–74.
- Kerepesi I. & Galiba G. (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science* **40**: 482–487.
- Kerkeb L., Donaire J.P. & Rodríguez-Rosales M.P. (2001). Plasma membrane H⁺-ATPase activity is involved in adaptation of tomato calli to NaCl. *Physiologia Plantarum* **111**: 483–490.
- Ketchum R.E.B., Warren R.S., Klima L.J., Lopez-Gutierrez F. & Nabors M.W. (1991). The mechanism and regulation of proline accumulation in suspension cell cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata* L.. *Journal of Plant Physiology* **137**: 368–374.
- Khavari-Nejad R.A. & Mostofi Y. (1998). Effects of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides, and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars. *Photosynthetica* **35**: 151–154.
- Khedr A.H.A., Abbas M.A., Wahid A.A.A., Quick W.P. & Abogadallah G.M. (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2553–2562.
- Kim S.T., Kim S.G., Hwang D.H., Kang S.Y., Kim H.J., Lee B.H., Lee J.J. & Kang K.Y. (2004). Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics* **4**: 3569–3578.
- Kingston-Smith A.H. & Foyer C.H. (2000). Bundle sheath proteins are more sensitive to oxidative damage than those of the mesophyll in maize leaves exposed to paraquat or low temperatures. *Journal of Experimental Botany* **51**: 123–130.
- Kinraide T.B. (1999). Interactions among Ca²⁺, Na⁺ and K⁺ in salinity toxicity: quantitative resolution of multiple toxic and ameliorative effects. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1495–1505.
- Kishor P.B.K., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A. & Verma D.P.S. (1995). Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* **108**: 1387–1397.
- Kishor P.B.K., Sangam S., Amrutha R.N., Sri Laxmi P., Naidu K.R., Rao K.R.S.S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P. & Sreenivasulu N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* **88**: 424–438.
- Knight H. & Knight M.R. (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* **6**: 262–267.
- Knight H., Trethewey A.J. & Knight M.R. (1997). Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. *Plant Journal* **12**: 1067–1078.
- Knörzer O.C., Burner J. & Boger P. (1996). Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiologia Plantarum* **97**: 388–396.
- Koca H., Bor M., Özdemir F. & Türkan İ. (2007). The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 344–351.
- Kochhar S. & Kochhar V.K. (2005). Expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in relation to combined stress of cadmium and heat in *Vigna mungo* seedlings. *Plant Science* **168**: 921–929.
- Kocsy G., Galiba G. & Brunold C. (2001). Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* **113**: 158–164.
- Kocsy G., Szalai G. & Galiba G. (2004). Effect of osmotic stress on glutathione and hydroxymethylglutathione accumulation in wheat. *Journal of Plant Physiology* **161**: 785–794.

- Kosová K., Vítámvás P., Prášil I.T. & Renaut J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics* **74**: 1301–1322.
- Kottapalli K.R., Rakwal R., Shibato J., Burow G., Tissue D., Burke J., Puppala N., Burow M. & Payton P. (2009). Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. *Plant, Cell and Environment* **32**: 380–407.
- Koussevitzky S., Suzuki N., Huntington S., Armijo L., Sha W., Cortes D., Shulaev V. & Mittler R. (2008). Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 34197–34203.
- Koval V.S. & Koval S.F. (1996). Genetic analysis of salt tolerance in barley—identification of number of genes. *Genetica* **32**: 1098–1103.
- Krieger-Liszkay A. & Trebst A. (2006). Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1677–1684.
- Krishnan N., Dickman M.B. & Becker D.F. (2008). Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* **44**: 671–681.
- Kronzucker H.J., Szczerba M.W., Moazami-Goudarzi M. & Britto D.T. (2006). The cytosolic Na⁺:K⁺ ratio does not explain salinity-induced growth impairment in barley: a dual-tracer study using ⁴²K⁺ and ²⁴Na⁺. *Plant, Cell and Environment* **29**: 2228–2237.
- Kruk J., Schmid G.H. & Strzalka K. (2000). Interaction of α -tocopherol quinone, α -tocopherol and other prenyllipids with photosystem II. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 271–277.
- Kulkarni A.P., Mitra A., Chaudhuri J., Byczkowski J.Z. & Richards I. (1990). Hydrogen peroxide: A potent activator of dioxygenase activity of soybean lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **166**: 417–423.
- Kumar S., Prasad K.V. & Choudhary M.L. (2006). Detection of genetic variability among chrysanthemum radiomutants using RAPD markers. *Current Science* **90**: 1108–1113.
- Kuźniak E. & Skłodowska M. (2005). Fungal pathogen-induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants. *Planta* **222**: 192–200.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the heat of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lamb C. & Dixon R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251–275.
- Larkin P.J. & Scowcroft W.R. (1981). Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics* **60**: 197–214.
- LaRosa P.C., Singh N.K., Hasegawa P.M. & Bressan R.A. (1989). Stable NaCl tolerance of tobacco cells is associated with enhanced accumulation of osmotin. *Plant Physiology* **91**: 855–861.
- LaRosa P.C., Rhodes D., Rhodes J.C., Bressan R.A. & Csonka L.N. (1991). Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase. *Plant Physiology* **96**: 245–250.
- Läuchli A. (1990). Calcium, salinity and the plasma membrane. In: *Calcium in Plant Growth and Development*. R.T. Leonard & P.K. Hepler (Eds.). American Society of Plant Physiologists, Rockville: 26–35.
- Läuchli A. & Grattan S.R. (2007). Plant growth and development under salinity stress. In: *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops*. M.A. Jenks, P.M. Hasegawa & S.M. Jain (Eds.). Springer, Netherlands: 1–32.
- Lawlor D.W. (2002). Limitations to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Annals of Botany* **89**: 871–885.
- Laxalt A.M., Cassia R.O., Sanllorenti P.M., Madrid E.A., Andreu A.B., Daleo G.R., Conde R.D., Lamattina L. (1996). Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stress conditions and elicitor treatments in potato. *Plant Molecular Biology* **30**: 961–972.
- Lebaudy A., Véry A.-A. & Sentenac H. (2007). K⁺ channel activity in plants: genes, regulations and functions. *FEBS Letters* **581**: 2357–2366.
- Lee B.R., Jung W.J., Lee B.H., Avice J.C., Ourry A. & Kim T.H. (2008). Kinetics of drought-induced pathogenesis-related proteins and its physiological significance in white clover leaves. *Physiologia Plantarum* **132**: 329–337.

- Lee D.H., Kim Y.S. & Lee C.B. (2001). The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology* **158**: 737–745.
- Leidi E.O., Barragán V., Rubio L., El-Hamdaoui A., Ruiz M.T., Cubero B., Fernández J.A., Bressan R.A., Hasegawa P.M., Quintero F.J. & Pardo J.M. (2010). The AtNHX1 exchanger mediates potassium compartmentation in vacuoles of transgenic tomato. *The Plant Journal* **61**: 495–506.
- Leone A., Costa A., Tucci M. & Grillo S. (1994a). Adaptation versus shock response to polyethylene glycol-induced low water potential in cultured potato cells. *Physiologia Plantarum* **92**: 21–30.
- Leone A., Costa A., Tucci M. & Grillo S. (1994b). Comparative analysis of short- and long-term changes in gene expression caused by low water potential in potato (*Solanum tuberosum*) cell-suspension cultures. *Plant Physiology* **106**: 703–712.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R. & Lamb C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583–593.
- Levy D. (1992). The response of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) to salinity: plant growth and tuber yields in the arid desert of Israel. *Annals of Applied Biology* **120**: 547–555.
- Levy D., Fogelman E. & Itzhak Y. (1988). The effect of water salinity on potatoes (*Solanum tuberosum* L.): Physiological indices and yielding capacity. *Potato Research* **31**: 601–610.
- Levy D., Fogelman E. & Itzhak Y. (1993). Influence of water and soil salinity on emergence and early development of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars and effect of physiological age of seed tubers. *Potato Research* **36**: 335–340.
- Li H., Goodwin P.H., Han Q., Huang L. & Kang Z. (2011). Microscopy and proteomic analysis of the non-host resistance of *Oryza sativa* to the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina* f. sp. *tritici*. *Plant Cell Reports*.
- Li X., Yu X., Wang N., Feng Q., Dong Z., Liu L., Shen J. & Liu B. (2007). Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **90**: 153–168.
- Lin C.C. & Kao C.H. (2000). Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation* **30**: 151–155.
- Lin K.-H.R., Weng C.-C., Lo H.-F. & Chen J.-T. (2004). Study of the root antioxidative system of tomatoes and eggplants under waterlogged conditions. *Plant Science* **167**: 355–365.
- Liu J. & Zhu J.-K. (1997). An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 14960–14964.
- Liu J. & Zhu J.-K. (1998). A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* **280**: 1943–1945.
- Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C.-S. & Zhu J.-K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 3730–3734.
- Liu W., Li P.J., Qi X.M., Zhou Q.X., Zheng L., Sun T.H. & Yang Y.S. (2005). DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere* **61**: 158–167.
- Liu W., Yang Y.S., Li P.J., Zhou Q.X., Xie L.J. & Han Y.P. (2009). Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. *Journal of Hazardous Materials* **161**: 878–883.
- Locato V., Gadaleta C., Gara L. & Pinto M.C. (2008). Production of reactive species and modulation of antioxidant network in response to heat shock: a critical balance for cell fate. *Plant, Cell and Environment* **31**: 1606–1619.
- Locato V., Pinto M.C. & Gara L. (2009). Different involvement of the mitochondrial, plastidial and cytosolic ascorbate-glutathione redox enzymes in heat shock responses. *Physiologia Plantarum* **135**: 296–306.
- Longstreth D.J., Burow G.B. & Yu G. (2004). Solutes involved in osmotic adjustment to increasing salinity in suspension cells of *Alternanthera philoxeroides* Griseb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **78**: 225–230.
- Lopez-Delgado H., Dat J.F., Foyer C.H. & Scott I.M. (1998). Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *Journal of Experimental Botany* **49**: 713–720.
- Lopez-Huertas E., Charlton W.L., Johnson B., Graham I.A. & Baker A. (2000). Stress induces peroxisome biogenesis genes. *The EMBO Journal* **19**: 6770–6777.

- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 265–275.
- Lutts S., Kinet J.M. & Bouharmont J. (1995). Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany* **46**: 1843–1852.
- Lutts S., Kinet J.M. & Bouharmont J. (1996a). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany* **78**: 389–398.
- Lutts S., Kinet J.M. & Bouharmont J. (1996b). Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Plant Growth Regulation* **19**: 207–218.
- Lutts S., Kinet J.M. & Bouharmont J. (1996c). Effects of various salts and of mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) callus cultures. *Journal of Plant Physiology* **149**: 186–195.
- Lutts S., Almansouri M. & Kinet J.M. (2004). 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.
- Ma S., Gong Q. & Bohnert H.J. (2006). Dissecting salt stress pathways. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1097–1107.
- Ma T., Liu Q., Li Z. & Zhang X. (2002). Tonoplast H⁺-ATPase in response to salt stress in *Populus euphratica* cell suspensions. *Plant Science* **163**: 499–505.
- Maathuis F.J.M. (2006). cGMP modulates gene transcription and cation transport in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* **45**: 700–711.
- Maathuis F.J.M. & Amtmann A. (1999). K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Annals of Botany* **84**: 123–133.
- Madan S., Nainawatee H.S., Jain R.K. & Chowdhury J.B. (1995). Proline and proline metabolising enzymes in *in-vitro* selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. *Annals of Botany* **76**: 51–57.
- Maeshima M. (2000). Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 37–51.
- Maeshima M. (2001). Tonoplast transporters: organization and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 469–497.
- Maeshima M. & Yoshida S. (1989). Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 20068–20073.
- Mahajan S. & Tuteja N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**: 139–158.
- Mahajan S., Pandey G.K. & Tuteja N. (2008). Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **471**: 146–158.
- Manaa A., Ahmed H.B., Valot B., Bouchet J.-P., Aschi-Smiti S., Causse M. & Faurobert M. (2011). Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2797–2813.
- Manchanda G. & Garg N. (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**: 595–618.
- Mano J., Ohno C., Domae Y. & Asada K. (2001). Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photo-oxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate radical detected with *in vivo* ESR. *Biochimica et Biophysica Acta* **1504**: 275–287.
- Manosalva P.M., Davidson R.M., Liu B., Zhu X., Hulbert S.H., Leung H. & Leach J.E. (2009). A Germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. *Plant Physiology* **149**: 286–296.
- Mansour M.M.F. & Salama K.H.A. (2004). Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany* **52**: 113–122.
- Marschner H. (1995). Adaptation of plants to adverse chemical soil conditions. In: *Mineral nutrition of higher plants*. 2^a Ed. Academic Press Inc, London: 596–680.
- Marschner H., Kylin A., Kuiper P.J.C. (1981). Differences in salt tolerance of three sugar beet genotypes. *Physiologia Plantarum* **51**: 234–238.
- Mass E.V. & Hoffman G.K.J. (1977). Crop salt tolerance-current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division* **103**: 115–134.

- Miyake H., Mitsuya S. & Rahman M.S. (2006). Ultrastructural effects of salinity stress in higher plants. In: *Abiotic stress tolerance in plants*, A.K. Rai & T. Tabake (Eds.). Springer, Netherlands: 215–226.
- Martin G.B., Williams J.G. & Tanksley S.D. (1991). Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**: 2336–2340.
- Martinez C.A., Maestria M. & Lani E.G. (1996). *In vitro* salt tolerance and proline accumulation in Andean potato (*Solanum* spp.) differing in frost resistance. *Plant Science* **116**: 177–184.
- Martinez C.A., Loureiro M.E., Oliva M.A. & Maestri M. (2001). Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Science* **160**: 505–515.
- Martinoia E., Maeshima M. & Neuhaus H.E. (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of Experimental Botany* **58**: 83–102.
- Martins M., Sarmiento D. & Oliveira M.M. (2004). Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports* **23**: 492–496.
- Martins P.F., Carvalho G., Gratão P.L., Dourado M.N., Pileggi M., Araújo W.L. & Azevedo R.A. (2011). Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. *Process Biochemistry* **46**: 1186–1195.
- May M.J. & Leaver C.J. (1993). Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiology* **103**: 621–627.
- McCann M.C., Shi J., Roberts K. & Carpita N.C. (1994). Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. *The Plant Journal* **5**: 773–785.
- Mehlenbacher S.A., Brown R.N., Nouhra E.R., Gökirmak T., Bassil N.V. & Kubisiak T.L. (2006). A genetic linkage map for hazelnut (*Corylus avellana* L.) based on RAPD and SSR markers. *Genome* **49**: 122–133.
- Meloni D.A., Oliva M.A., Martinez C.A. & Cambraia J. (2003). Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* **49**: 69–76.
- Meneguzzo S., Sgherri C.L.M., Navari-Izzo F. & Izzo R. (1998). Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in NaCl-treated wheat. *Physiologia Plantarum* **104**: 735–740.
- Menezes-Benavente L., Teixeira F.K., Kamei C.L.A. & Margis-Pinheiro M. (2004). Salt stress induces altered expression of genes encoding antioxidant enzymes in seedlings of a Brazilian *indica* rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* **166**: 323–331.
- Meyer A.J. (2008). The integration of glutathione homeostasis and redox signalling. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1390–1403.
- Mhadhbi H., Fotopoulos V., Mylona P.V., Jebara M., Aouani M.E & Polidoros A.N. (2011). Antioxidant gene-enzyme responses in *Medicago truncatula* genotypes with different degree of sensitivity to salinity. *Physiologia Plantarum* **141**: 201–214.
- Miki Y., Hashiba M. & Hisajima S. (2001). Establishment of salt stress tolerant rice plants through step up NaCl treatment *in vitro*. *Biologia Plantarum* **44**: 391–395.
- Miller G., Shulaev V. & Mittler R. (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum* **133**: 481–489.
- Miller G., Suzuki M., Ciftci-Yilmaz S. & Mittler R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell and Environment* **33**: 453–467.
- Mitsuya S., Takeoka Y. & Miyake H. (2000). Effects of sodium chloride on foliar ultrastructure of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) plantlets grown under light and dark conditions *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* **157**: 661–667.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405–410.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. & Van Breusegem F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490–498.
- Mittler R. & Zilinskas B.A. (1993). Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical Biochemistry* **212**: 540–546.
- Mitova V., Tal M., Volokita M. & Guy M. (2002). Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum* **115**: 393–400.

- Mittova V., Theodoulou F.L., Kiddle G., Gómez L., Volokita M., Tal M., Foyer C.H. & Guy M. (2003). Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. *FEBS Letters* **554**: 417–421.
- Mittova V., Guy M., Tal M. & Volokita M. (2004). Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1105–1113.
- Miyake H., Mitsuya S. & Rahman M.S. (2006). Ultrastructural effects of salinity stress in higher plants. In: *Abiotic stress tolerance in plants*, A.K. Rai & T. Tabake (Eds.). Springer, Netherlands: 215–226.
- Mohamed M.A.-H., Harris P.J.C. & Henderson J. (2000). *In vitro* selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. *Plant Science* **159**: 213–222.
- Molinari H.B.C., Marur C.J., Daros E., Campos M.K.F., Carvalho J.F.R.P., Filho J.C.B., Pereira L.F.P. & Vieira L.G.E. (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiologia Plantarum* **130**: 218–229.
- Møller I.M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 561–591.
- Montillet J.-L., Chamnongpol S., Rustérucci C., Dat J., van de Cotte B., Agnel J.-P., Battesti C., Inzé D., Van Breusegem F. & Triantaphylidès C. (2005). Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* **138**: 1516–1526.
- Moon B.C., Choo B.K., Cheon M.S., Yoon T., Ji Y., Kim B.B., Lee A.Y. & Kim H.K. (2010). Rapid molecular authentication of three medicinal plant species, *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum*, and *Polygonum multiflorum* (*Fallopia multiflorum*), by the development of RAPD-derived SCAR markers and multiplex-PCR. *Plant Biotechnology Reports* **4**: 1–7.
- Morell S., Follmann H., De Tullio M. & Häberlein I. (1997). Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Letters* **414**: 567–570.
- Morita S., Kaminaka H., Masumura T. & Tanaka K. (1999). Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. *Plant and Cell Physiology* **40**: 417–422.
- Mullins E., Milbourne D., Petti C., Doyle-Prestwich B.M. & Meade C. (2006). Potato in the age of biotechnology. *Trends in Plant Science* **11**: 254–260.
- Munné-Bosch S. (2005). The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* **162**: 743–748.
- Munné-Bosch S. & Alegre L. (2000a). The significance of β -carotene, α -tocopherol and the xanthophyll cycle in droughted *Melissa officinalis* plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 139–146.
- Munné-Bosch S. & Alegre L. (2000b). Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* **210**: 925–931.
- Munné-Bosch S. & Alegre L. (2002a). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**: 31–57.
- Munné-Bosch S. & Alegre L. (2002b). Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants. *FEBS Letters* **524**: 145–148.
- Munné-Bosch S. & Alegre L. (2003). Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiology* **131**: 1816–1825.
- Munné-Bosch S. & Peñuelas J. (2003). Photo- and antioxidative protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under mediterranean field conditions. *Annals of Botany* **92**: 385–391.
- Munné-Bosch S., Schwarz K. & Alegre L. (2001). Water deficit in combination with high solar radiation leads to midday depression of α -tocopherol in field-grown lavender (*Lavendula stoechas*) plants. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 315–321.
- Munns R. (1985). Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in xylem sap flowing to shoots of NaCl-treated barley. *Journal of Experimental Botany* **36**: 1032–1042.
- Munns R. (1988). Effect of high external NaCl concentrations on ion transport within the shoot of *Lupinus albus*. I. Ions in xylem sap. *Plant, Cell and Environment* **11**: 283–289.
- Munns R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant, Cell and Environment* **16**: 15–24.

- Munns R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* **25**: 239–250.
- Munns R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* **167**: 645–663.
- Munns R. & James R.A. (2003). Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant and Soil* **253**: 201–218.
- Munns R. & Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 651–681.
- Munns R., Fisher D.B. & Tonnet M.L. (1986). Na⁺ and Cl⁻ transport in the phloem from leaves of NaCl-treated barley. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**: 757–766.
- Munns R., Husain S., Rivelli A.R., James R.A., Condon A.G., Lindsay M.P., Lagudah E.S., Schachtman D.P. & Hare R.A. (2002). Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant and Soil* **247**: 93–105.
- Munns R., Rebetzke G.J., Husain S., James R.A. & Hare R.A. (2003). Genetic control of sodium exclusion in durum wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* **54**: 627–635.
- Munns R., James R.A. & Läuchli A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1025–1043.
- Nabors M.W., Gibbs S., Bernstein C. & Meiss M. (1980). NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. Pflanzenphysiol* **97**: 13–17.
- Nadler A. & Heuer B. (1995). Effect of saline irrigation and water deficit on tuber quality. *Potato Research* **38**: 119–123.
- Nagamiya K., Motohashi T., Nakao K., Prodhan S.H., Hattori E., Hirose S., Ozawa K., Ohkawa Y., Takabe T., Takabe T. & Komamine A. (2007). Enhancement of salt tolerance in transgenic rice expressing an *Escherichia coli* catalase gene, katE. *Plant Biotechnology Report* **1**: 49–55.
- Naidoo G., Tuffers A.V. & von Willert D.J. (2002). Changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence characteristics of two mangroves and a mangrove associate in response to salinity in the natural environment. *Trees - Structure and Function* **16**: 140–146.
- Naik P.S. & Widholm J.M. (1993). Comparison of tissue culture and whole plant responses to salinity in potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **33**: 273–280.
- Nakanishi Y. & Maeshima M. (1998). Molecular cloning of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean. *Plant Physiology* **116**: 589–597.
- Nakano Y. & Asada K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **22**: 867–880.
- Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E. & Jacquot J.-P. (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* **129**: 185–195.
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hurst R.D. & Hancock J.T. (2002a). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1237–1247.
- Neill S.J., Desikan R. & Hancock J. (2002b). Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 388–395.
- Neto A.D.A., Prisco J.T., Enéas-Filho J., Braga de Abreu C.E. & Gomes-Filho E. (2006). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany* **56**: 87–94.
- Neuhaus H.E. (2007). Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. *FEBS Letters* **581**: 2223–2226
- Neumann P.M., Van Volkenburgh E. & Cleland R.E. (1988). Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Plant Physiology* **88**: 233–237.
- Nguyen N.T., Moghaieb R.E.A., Saneoka H. & Fujita K. (2004). RAPD markers associated with salt tolerance in *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium*. *Plant Science* **167**: 797–805.
- Niknam V., Meratan A.A. & Ghaffari S.M. (2011). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidative enzymes in callus of two *Acanthophyllum* species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **47**: 297–308.
- Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. & Murata N. (2011). Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiologia Plantarum* **142**: 35–46.
- Nito K., Yamaguchi K., Kondo M., Hayashi M. & Nishimura M. (2001). Pumpkin peroxisomal ascorbate peroxidase is localized on peroxisomal membranes and unknown membranous structures. *Plant and Cell Physiology* **42**: 20–27.

- Niu X., Bressan R.A., Hasegawa P.M. & Pardo J.M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology* **109**: 735–742.
- Niu X., Damsz B., Kononowicz A.K., Bressan R.A. & Hasegawa P.M. (1996). NaCl-induced alterations in both cell structure and tissue-specific plasma membrane H⁺-ATPase gene expression. *Plant Physiology* **111**: 679–686.
- Noctor G. (2006). Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment* **29**: 409–425.
- Noctor G. & Foyer C. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249–279.
- Noctor G., Arisi A.-C.M., Jouanin L., Kunert K.J., Rennenberg H. & Foyer C.H. (1998). Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* **49**: 623–647.
- Noctor G., Gómez L., Vanacker H. & Foyer C.H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1283–1304.
- Noreen Z. & Ashraf M. (2009). Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. *Journal of Plant Physiology* **116**: 1764–1774.
- Norman C., Howell K.A., Millar A.H., Whelan J.M. & Day D.A. (2004). Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiology* **134**: 492–501.
- Ochatt S.J., Marconi P.L., Radice S., Arnoz P.A. & Caso O.H. (1999). *In vitro* recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **55**: 1–8.
- Okuma E., Murakami Y., Shimoishi Y., Tada M. & Murata Y. (2000). Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. *Soil Science & Plant Nutrition* **46**: 257–263.
- Okuma E., Murakami Y., Shimoishi Y., Tada M. & Murata Y. (2004). Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Science & Plant Nutrition* **50**: 1301–1305.
- Olías R., Eljakaoui Z., Li J., De Morales P.A., Marín-Manzano M.C., Pardo J.M. & Bover A. (2009). The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na⁺ between plant organs. *Plant, Cell and Environment* **32**: 904–916.
- Oliveira M.M. (2000). Aplicações e Avanços na Área da Biotecnologia Vegetal. *Boletim de Biotecnologia* **66**: 22–27.
- Olmos E. & Hellín E. (1996). Mechanisms of salt tolerance in a cell line of *Pisum sativum*: biochemical and physiological aspects. *Plant Science* **120**: 37–45.
- ONU (2011). United Nations Population Fund (UNFPA). <http://www.unfpa.org/pds/trends.htm>. Acedido em Dezembro de 2011.
- Otoch M.L.O., Sobreira A.C.M., Aragão M.E.F., Orellano E.G., Lima M.G.S. & de Melo D.F. (2001). Salt modulation of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities in *Vigna unguiculata*. *Journal of Plant Physiology* **158**: 545–551.
- Ottow E.A., Brinker M., Teichmann T., Fritz E., Kaiser W., Brosché M, Kangasjärvi J, Jiang X. & Polle A. (2005). *Populus euphratica* displays apoplastic sodium accumulation, osmotic adjustment by decreases in calcium and soluble carbohydrates, and develops leaf succulence under salt stress. *Plant Physiology* **139**: 1762–1772.
- Pääkkönen E., Holopainen T. & Kärenlampi L. (1995). Ageing-related anatomical and ultrastructural changes in leaves of Birch (*Betula pendula* Roth.) clones as affected by low ozone exposure. *Annals of Botany* **75**: 285–294.
- Panda S.K. & Khan M.H. (2009). Growth, oxidative damage and antioxidant responses in greengram (*Vigna radiata* L.) under short-term salinity stress and its recovery. *Journal of Agronomy and Crop Science* **195**: 442–454.
- Paran I. & Michelmore R.W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics* **85**: 985–993.
- Pareek A., Singla S.L. & Grover A. (1997). Short-term salinity and high temperature stress-associated ultrastructural alterations in young leaf cells of *Oryza sativa* L. *Annals of Botany* **80**: 629–639.

- Parida A.K. & Das A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60**: 324–349.
- Parida A.K., Das A.B. & Mohanty P. (2004). Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. *Journal of Plant Physiology* **161**: 531–542.
- Parker R., Flowers T.J., Moore A.L. & Harpham N.V.J. (2006). An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1109–1118.
- Parks G.E., Dietrich M.A. & Schumaker K.S. (2002). Increased vacuolar Na⁺/H⁺ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1055–1065.
- Passioura J.B. & Munns R. (2000). Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**: 941–948.
- Pastore D., Trono D., Laus M.N., Di Fonzo N. & Flagella Z. (2007). Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria. *Journal of Experimental Botany* **58**: 195–210.
- Pastori G., Foyer C.H. & Mullineaux P. (2000). Low temperature induces changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidants between the bundle sheath and mesophyll cells of maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **51**: 107–113.
- Peixoto F., Vicente J., Madeira V.M.C. (2004). A comparative study of plant and animal mitochondria exposed to paraquat reveals that hydrogen peroxide is not related to the observed toxicity. *Toxicology in Vitro* **18**: 733–739.
- Pekker I., Tel-Or E. & Mittler R. (2002). Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean. *Plant Molecular Biology* **49**: 429–438.
- Pelloux J., Rustérucci C. & Mellerowicz E.J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* **12**: 267–277.
- Perl A., Perl-Treves R., Galili S., Aviv D., Shalgi E., Malkin S. & Galun E. (1993). Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu,Zn superoxide dismutases. *Theoretical and Applied Genetics* **85**: 568–576.
- Perl-Treves R. & Galun E. (1991). The tomato Cu,Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Molecular Biology* **17**: 745–760.
- Perez-Alfocea F., Guerrier G., Estañ M.T. & Bolarin M.C. (1994). Comparative salt responses at cell and whole-plant levels of cultivated and wild tomato species and their hybrid. *Journal of Horticultural Science* **69**: 639–644.
- Perez-Alfocea F., Balibrea M.E., Alarcon J.J. & Bolarin M.C. (2000). Composition of xylem and phloem exudates in relation to the salt-tolerance of domestic and wild tomato species. *Journal of Plant Physiology* **156**: 367–374.
- Pérez-López U., Robredo A., Lacuesta M., Sgherri C., Muñoz-Rueda A., Navari-Izzo F. & Mena-Petite A. (2009). The oxidative stress caused by salinity in two barley cultivars is mitigated by elevated CO₂. *Physiologia Plantarum* **135**: 29–42.
- Pérez-López U., Robredo A., Lacuesta M., Sgherri C., Mena-Petite A., Navari-Izzo F. & Muñoz-Rueda A. (2010). Lipoic acid and redox status in barley plants subjected to salinity and elevated CO₂. *Physiologia Plantarum* **139**: 256–268.
- Pillai M.A., Lihuang Z. & Akiyama T. (2002). Molecular cloning, characterization, expression and chromosomal location of OsGAPDH, a submergence responsive gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **105**: 34–42.
- Pinheiro C., Kehr J. & Ricardo C.P. (2005). Effect of water stress on lupin stem protein analysed by two-dimensional gel electrophoresis. *Planta* **221**: 716–728.
- Piqueras A., Hernández J.A., Olmos E., Hellín E. & Sevilla F. (1996). Changes in antioxidant enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **45**: 53–60.
- Plett D.C. & Møller I.S. (2010). Na⁺ transport in glycophytic plants: what we know and would like to know. *Plant, Cell and Environment* **33**: 612–626.
- Pnueli L., Hallak-Herr E., Rozenberg M., Cohen M., Goloubinoff P., Kaplan A. & Mittler R. (2002). Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*. *The Plant Journal* **31**: 319–330.

- Polidoros A.N. & Scandalios J.G. (1999). Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione *S*-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum* **106**: 112–120.
- Polle A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* **126**: 445–462.
- Potters G., De Gara L., Asard H. & Horemans N. (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 537–548.
- Potters G., Jansen M.A.K., Horemans N., Guisez Y. & Pasternak T. (2010). Dehydroascorbate and glutathione regulate the cellular development of *Nicotiana tabacum* L. SR-1 protoplasts. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **46**: 289–297.
- Prasad T.K., Anderson M.D., Martin B.A. & Stewart C.R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell* **6**: 65–74.
- Pruvot G., Massimino J., Peltier G. & Rey P. (1996). Effects of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced proteins in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum* **97**: 123–131.
- Pukacka S. & Ratajczak E. (2007). Ascorbate and glutathione metabolism during development and desiccation of orthodox and recalcitrant seeds of the genus *Acer*. *Functional Plant Biology* **34**: 601–613.
- Pukacka S. & Ratajczak E. (2010). Ascorbate and glutathione metabolism during development and desiccation of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Plant Growth Regulation* **62**: 77–83.
- Qadir M. & Oster J.D. (2004). Crop and irrigation management strategies for saline-sodic soils and waters aimed at environmentally sustainable agriculture. *Science of the Total Environment* **323**: 1–19.
- Quintero J.M., Fournier J.M., Benlloch M. & Rodríguez-Navarro A. (2008). Na⁺ accumulation in root symplast of sunflower plants exposed to moderate salinity is transpiration-dependent. *Journal of Plant Physiology* **165**: 1248–1254.
- Qiu N., Chen M., Guo J., Bao H., Ma X. & Wang B. (2007). Coordinate up-regulation of V-H⁺-ATPase and vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter as a response to NaCl treatment in a C₃ halophyte *Sueda salsa*. *Plant Science* **172**: 1218–1225.
- Qiu Q.-S., Barkla B.J., Vera-Estrella R., Zhu J.-K. & Schumaker K.S. (2003). Na⁺/H⁺ exchange activity in the plasma membrane of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**: 1041–1052.
- Qiu Q.-S., Guo Y., Quintero F.J., Pardo J.M., Schumaker K.S. & Zhu J.-K. (2004). Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 207–215.
- Queirós F. (2001). Seleção *in vitro* de linhas celulares de batateira (*Solanum tuberosum* L.) tolerantes a NaCl. Estudo de parâmetros bioquímicos associados à tolerância salinidade. Tese de mestrado. Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. 139 pp.
- Queirós F., Fidalgo F., Santos I. & Salema R. (2007). *In vitro* selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. *Biologia Plantarum* **51**: 728–734.
- Queirós F., Fontes N., Silva P., Almeida D., Maeshima M., Gerós H. & Fidalgo F. (2009). Activity of tonoplast proton pumps and Na⁺/H⁺ exchange in potato cell cultures is modulated by salt. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1363–1374.
- Qureshi M.I., Qadir S. & Zolla L. (2007). Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology* **164**: 1239–1260.
- Rahman Md.S., Miyake H. & Takeoka Y. (2002). Effects of exogenous glycinebetaine on growth and ultrastructure of salt-stressed rice seedlings (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science* **5**: 33–44.
- Rahman M.H., Islam R., Hossain M. & Haider S.A. (2008). Differential response of potato under sodium chloride stress conditions *in vitro*. *Journal of Bio-Science* **16**: 79–83.
- Rahnama H. & Ebrahimzadeh H. (2004). The effect of NaCl on proline accumulation in potato seedlings and calli. *Acta Physiologiae Plantarum* **26**: 263–270.
- Rahnama H. & Ebrahimzadeh H. (2005). The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedlings. *Biologia Plantarum* **49**: 93–97.
- Rahnama H. & Ebrahimzadeh H. (2006). Antioxidant isozymes activities in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress. *Journal of Sciences Islamic Republic of Iran* **17**: 225–230.

- Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P. & Dhawan A.K. (2011). Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection—An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* **71**: 89–98.
- Rajendran K., Tester M. & Roy S.J. (2009). Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, Cell and Environment Biology* **32**: 237–249.
- Ramagli L.S. (1999). Quantifying protein in 2-D PAGE solubilization buffers. In: *Methods in Molecular Biology, Vol. 112: 2-D Proteome Analysis Protocols*, A.J. Link (Eds.). Humana Press Inc., Totowa, NJ: 99–103.
- Rao M.V., Paliyath G. & Ormrod D.P. (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **110**: 125–136.
- Rashid A., Qureshi R.H., Hollington P.A. & Wyn Jones R.G. (1999). Comparative responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to salinity at the seedling stage. *Journal of Agronomy and Crop Science* **182**: 199–208.
- Raychaudhuri S.S. & Deng X.W. (2000). The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *The Botanical Review* **66**: 89–98.
- Rea P.A. & Sanders D. (1987). Tonoplast energization: two H⁺ pumps, one membrane. *Physiologia Plantarum* **71**: 131–141.
- Rea P.A. & Poole R.J. (1993). Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 157–180.
- Rellán-Álvarez R., Hernández L.E., Abadía J. & Álvarez-Fernández A. (2006). Direct and simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione and homoglutathione by liquid chromatography–electrospray/mass spectrometry in plant tissue extracts. *Analytical Biochemistry* **356**: 254–264.
- Rengasamy P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1017–1023.
- Rengasamy P. (2010). Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. *Functional Plant Biology* **37**: 613–620.
- Rengel Z. (1992). The role of calcium in salt toxicity. *Plant, Cell and Environment* **15**: 625–632.
- Rensink W.A., Iobst S., Hart A., Stegalkina S., Liu J. & Buell C.R. (2005). Gene expression profiling of potato responses to cold, heat, and salt stress. *Functional & Integrative Genomics* **5**: 201–207.
- Rentel M.C. & Knight M.R. (2004). Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **5**: 1471–1479.
- Reuveni M., Bennett A.B., Bressan R.A. & Hasegawa P.M. (1990). Enhanced H⁺ transport capacity and ATP hydrolysis activity of the tonoplast H⁺-ATPase after NaCl adaptation. *Plant Physiology* **94**: 524–530.
- Reynolds E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* **17**: 208–212.
- Richards R.A. (1996). Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Regulation* **20**: 157–166.
- Rietveld R.C., Hasegawa P.M. & Bressan R.A. (1987). Genetic variability in tuber disc-derived potato plants. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 3, Y.P.S. Bajaj (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 392–407.
- Rietveld R.C., Hasegawa P.M. & Bressan R.A. (1991). Somaclonal variation in tuber disc-derived populations of potato. *Theoretical and Applied Genetics* **82**: 430–440.
- Rios D., Ghislain M., Rodriguez F. & Spooner D. (2007). What is the origin of the European potato? Evidence from Canary Island landraces. *Crop Science* **47**: 1271–1280.
- Rhodes D. & Hanson A.D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 357–384.
- Rodrigues J.A. (1998). Análise voltamétrica, após derivatização, de compostos passíveis de condensação cíclica. Análise em alimentos. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto. 352 pp.
- Rodrigues J.A., Valente I.M., Gonçalves L.M., Pacheco J.G. & Barros A.A. (2010). Polarographic determination of vitamin C after derivatization with *o*-phenylenediamine. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **75**: 731–741.
- Rodríguez-Navarro A. & Rubio F. (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1149–1160.

- Rodríguez-Rosales M.P., Kerkeb L., Bueno P. & Donaire J.P. (1999). Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H⁺-ATPase and antioxidant enzyme activities of tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill) calli. *Plant Science* **143**: 143–150.
- Romero-Aranda R., Moya J.L., Tadeo F.R., Legaz F., Primo-Millo E. & Talon M. (1998). Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. *Plant, Cell and Environment* **21**: 1243–1253.
- Romero-Puertas M.C., Corpas F.J., Sandalio L.M., Leterrier M., Rodríguez-Serrano M., del Río L.A. & Palma J.M. (2006). Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytologist* **170**: 43–52.
- Roosens N.H., Bitar F.A., Loenders K., Angenon G. & Jacobs M. (2002). Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Molecular Breeding* **9**: 73–80.
- Rout G.R. & Sahoo S. (2007). *In vitro* selection and plant regeneration of copper-tolerant plants from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. cv. 'Xanthi'. *Plant Breeding* **126**: 403–409.
- Rout G.R., Samantaray S. & Das P. (1999). *In vitro* selection and biochemical characterisation of zinc and manganese adapted callus lines in *Brassica* spp. *Plant Science* **146**: 89–100.
- Roychoudhury A., Basu S., Sarkar S.N. & Sengupta D.N. (2008). Comparative physiological and molecular responses of a common aromatic indica rice cultivar to high salinity with non-aromatic indica rice cultivars. *Plant Cell Reports* **27**: 1395–1410.
- Rus A.M., Panoff M., Perez-Alfocea F. & Bolarin M.C. (1999). NaCl responses in tomato calli and whole plants. *Journal of Plant Physiology* **155**: 727–733.
- Sacher R.F. & Staples R.C. (1985). Inositol and sugars in adaptation of tomato to salt. *Plant Physiology* **77**: 206–210.
- Sairam R.K. & Srivastava G.C. (2002). Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science* **162**: 897–904.
- Sairam R.K. & Tyagi A. (2004). Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* **86**: 407–412.
- Sairam R.K., Srivastava G.C., Agarwal S. & Meena R.C. (2005). Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum* **49**: 85–91.
- Salama S., Trivedi S., Busheva M., Arafa A.A., Garab G. & Erdei L. (1994). Effects of NaCl salinity on growth, cation accumulation, chloroplast structure and function in wheat cultivars differing in salt tolerance. *Journal of Plant Physiology* **144**: 241–247.
- Salekdeh G.H. & Komatsu S. (2007). Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. *Proteomics* **7**: 2976–2996.
- Samantaray S., Rout G.R. & Das P. (2001). Induction, selection and characterization of Cr and Ni-tolerant cell lines of *Echinochloa colona* (L.) Link *in vitro*. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1281–1290.
- Sandalio L.M., Palma J.M. & del Río L.A. (1987). Localization of manganese superoxide dismutase in peroxisomes isolated from *Pisum sativum* L. *Plant Science* **51**: 1–8.
- Santos C.L.V. (1997). Estudo de alguns mecanismos de regulação osmótica e da expressão da glutamina sintetase em células de *Helianthus annuus* L. sujeitas a stress salino: selecção de células tolerantes a NaCl. Tese de doutoramento. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro. 168 pp.
- Santos C.L.V. & Caldeira G. (1999). Comparative responses of *Helianthus annuus* plants and calli exposed to NaCl: I. Growth rate and osmotic regulation in intact plants and calli. *Journal of Plant Physiology* **155**: 769–777.
- Santos C.L.V., Gomes S. & Caldeira G. (2000). Comparative responses of *Helianthus annuus* plants and calli exposed to NaCl: II. Selection of stable salt tolerant calli cell lines and evaluation of osmotic adjustment and morphogenic capacity. *Journal of Plant Physiology* **156**: 68–74.
- Santos I. & Salema R. (1983). Stereological study of the variation of chloroplast tubules and volume in the CAM plant *Sedum telephium*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **113**: 29–37.
- Santos I., Almeida J.M. & Salema R. (1999). The influence of UV-B radiation on the superoxide dismutase of maize, potato, sorghum, and wheat leaves. *Canadian Journal of Botany* **77**: 70–76.
- Santos I., Fidalgo F., Almeida J.M. & Salema R. (2004). Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. *Plant Science* **167**: 925–935.
- Santos I., Pires H., Almeida J.M., Fidalgo F., Confraria A., Duarte M., Borlido J. & Salema R. (2006). Phylogenetic relationship of potato *CAT1* and *CAT2* genes, their differential expression in non-

- photosynthetic organs and during leaf development, and their association with different cellular processes. *Functional Plant Biology* **33**: 639–651.
- Santos M.I., Franco A.C. & Sousa P.L. (2003). Avaliação da qualidade da água para a rega na Lezíria Grande de Vila Franca de Xira. Relatório do Projecto AGRO 113 “Gestão integrada do solo e da água para a Lezíria Grande de Vila Franca de Xira”. 13 pp.
- Santos P.M., Benndorf D. & Sá-Correia I. (2004). Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *Proteomics* **4**: 2640–2652.
- Saqib M., Zörb C., Rengel Z. & Schubert S. (2005). The expression of the endogenous vacuolar Na⁺/H⁺ antiporters in roots and shoots correlates positively with the salt resistance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* **169**: 959–965.
- Savouré A., Thorin D., Davey M., Hua X.-J., Mauro S., Montagu M.V., Inzé D. & Verbruggen N. (1999). NaCl and CuSO₄ treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant, Cell and Environment* **22**: 387–396.
- Scandalios J.G. (1990). Targeting, import, and processing of nuclear gene-encoded proteins into mitochondria and peroxisomes. *Progress in Clinical Biological Research* **344**: 515–544.
- Scandalios J.G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* **101**: 7–12.
- Scandalios J.G. (1997). Molecular genetics of superoxide dismutases in plants. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, J.G. Scandalios (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 527–568.
- Scandalios J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**: 995–1014.
- Scandalios J.G., Guan L. & Polidoros A.N. (1997). Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, J.G. Scandalios (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 343–406.
- Schafer F.Q. & Buettner G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine* **30**: 1191–1212.
- Schiliro E., Predieri S. & Bertaccini A. (2001). Use of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic variation in *Pyrus* species. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**: 271a–h.
- Schmohl N. & Horst W.J. (2000). Cell wall pectin content modulates aluminium sensitivity of *Zea mays* (L.) cells grown in suspension culture. *Plant, Cell and Environment* **23**: 735–742.
- Schmohl N., Pilling J., Fisahn J. & Horst W.J. (2000). Pectin methylesterase modulates aluminium sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum* **109**: 419–427.
- Sekmen A.H., Türkan I. & Takio S. (2007). Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum* **131**: 399–411.
- Semane B., Cuypers A., Smeets K., Van Bellegem F., Horemans N., Schat H. & Vangronsveld J. (2007). Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum* **129**: 519–528.
- Sengupta S. & Majumder A.L. (2010). *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a wild rice: a potential model for studying salt-stress biology in rice. *Plant, Cell and Environment* **33**: 526–542.
- Shabala S. (2003). Regulation of potassium transport in leaves: from molecular to tissue level. *Annals of Botany* **92**: 627–634.
- Shabala S. & Cuin T.A. (2008). Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* **133**: 651–669.
- Shabala S., Shabala L. & Volkenburgh E.V. (2003). Effect of calcium on root development and root ion fluxes in salinised barley seedlings. *Functional Plant Biology* **30**: 507–514.
- Shabala L., Cuin T.A., Newman I.A. & Shabala S. (2005a). Salinity-induced ion flux patterns from the excised roots of *Arabidopsis sos* mutants. *Planta* **222**: 1041–1050.
- Shabala S., Shabala L., Volkenburgh E.V. & Newman I. (2005b). Effect of divalent cations on ion fluxes and leaf photochemistry in salinized barley leaves. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1369–1378.
- Shabala S., Demidchik V., Shabala L., Cuin T.A., Smith S.J., Miller A.J., Davies J.M. & Newman I.A. (2006). Extracellular Ca²⁺ ameliorates NaCl-induced K⁺ loss from *Arabidopsis* root and leaf cells by controlling plasma membrane K⁺-permeable channels. *Plant Physiology* **141**: 1653–1665.
- Shabala S., Cuin T.A. & Pottosin I. (2007). Polyamines prevent NaCl-induced K⁺ efflux from pea mesophyll by blocking non-selective cation channels. *FEBS Letters* **581**: 1993–1999.

- Shabala S., Shabala S., Cuin T.A., Pang J., Percey W., Chen Z., Conn S., Eing C. & Wegner L.H. (2010). Xylem ionic relations and salinity tolerance in barley. *The Plant Journal* **61**: 839–853.
- Shalata A. & Tal M. (1998). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum* **104**: 169–174.
- Shalata A. & Neumann P.M. (2001). Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2207–2211.
- Shalata A., Mittova V., Volokita M., Guy M. & Tal M. (2001). Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. *Physiologia Plantarum* **112**: 487–494.
- Shankhdhar D., Shankhdhar S.C., Mani S.C. & Pant R.C. (2000). *In vitro* selection for salt tolerance in rice. *Biologia Plantarum* **43**: 477–480.
- Shannon M.C. & Grieve C.M. (1999). Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae* **78**: 5–38.
- Shao H.-B., Chu L.-Y., Lu Z.-H. & Kang C.-M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences* **4**: 8–14.
- Sharry S.E. & Silva J.A.T. (2006). Effective organogenesis, somatic embryogenesis and salt tolerance induction *in vitro* in the persian lilac tree (*Melia azedarach* L.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* **II**: 317–324.
- Shaterian J., Waterer D., De Jong H., Tanino K.K. (2005). Differential stress responses to NaCl salt application in early- and late-maturing diploid potato (*Solanum* sp.) clones. *Environmental and Experimental Botany* **54**: 202–212.
- Shi H., Ishitani M., Kim C.-S. & Zhu J.-K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 6896–6901.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y. & Yoshimura K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1305–1319.
- Shimaoka T., Miyake C. & Yokota A. (2003). Mechanism of the reaction catalyzed by dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts. *European Journal of Biochemistry* **270**: 921–928.
- Shiratake K., Kanayama Y., Maeshima M. & Yamaki S. (1997). Changes in H⁺-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. *Plant Cell Physiology* **38**: 1039–1045.
- Shulaev V. & Oliver D.J. (2006). Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiology* **141**: 367–372.
- Sibole J.V., Cabot C., Michalke W., Poschenrieder C. & Barceló J. (2005). Relationship between expression of the PM H⁺-ATPase, growth and ion partitioning in the leaves of salt-treated *Medicago* species. *Planta* **221**: 557–566.
- Silva P. & Gerós H. (2009). Regulation by salt of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange. *Plant Signaling & Behavior* **4**: 718–726.
- Silva P., Façanha A.R., Tavares R.M. & Gerós H. (2010). Role of tonoplast proton pumps and Na⁺/H⁺ antiport system in salt tolerance of *Populus euphratica* Oliv. *Journal of Plant Growth Regulation* **29**: 23–34.
- Silveira J.A.G, Melo A.R.B, Viégas R.A & Oliveira J.T.A. (2001). Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. *Environmental and Experimental Botany* **46**: 171–179.
- Singh K.N. & Chatrath R. (2001). Salinity tolerance. In: *Application of physiology in wheat breeding*. A.M.P. Reynolds, J.J. Ortiz-Monasterio & A. McNab (Eds.): 101–110.
- Singh A.K., Singh M., Singh A.K., Singh R., Kumar S. & Kalloo G. (2006). Genetic diversity within the genus *Solanum* (Solanaceae) as revealed by RAPD markers. *Current Science* **90**: 711–716.
- Singh M.P., Singh D.K. & Rai M. (2007). Assessment of growth, physiological and biochemical parameters and activities of antioxidative enzymes in salinity tolerant and sensitive basmati rice varieties. *Journal of Agronomy and Crop Science* **193**: 398–412.
- Singh N.K., Handa A.K., Hasegawa P.M. & Bressan R.A. (1985). Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiology* **79**: 126–137.

- Singh N.K., Bracker C.A., Hasegawa P.M., Handa A.K., Buckel S., Hermodson M.A., Pfankoch Ed, Regnier F.E. & Bressan R.A. (1987). Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiology* **85**: 529–536.
- Singh N.K., Nelson D.E., Kuhn D., Hasegawa P.M. & Bressan R.A. (1989). Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. *Plant Physiology* **90**: 1096–1101.
- Skriver K. & Mundy J. (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell* **2**: 502–512.
- Smethurst C.F., Rix K., Garnett T., Auricht G., Bayart A., Lane P., Wilson S.J. & Shabala S. (2008). Multiple traits associated with salt tolerance in lucerne: revealing the underlying cellular mechanisms. *Functional Plant Biology* **35**: 640–650.
- Smirnoff N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* **125**: 27–58.
- Smirnoff N. (1995). Antioxidant systems and plant response to the environment In: *Environment and plant metabolism. Flexibility and acclimation*. N. Smirnoff (Eds.). Bios Scientific Publishers, Oxford: 217–243.
- Smirnoff N. (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* **78**: 661–669.
- Smirnoff N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* **9**: 214–219.
- Smirnoff N. (2000). Ascorbate biosynthesis in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* **355**: 1455–1464.
- Smirnoff N. & Wheeler G.L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **35**: 291–314.
- Smirnoff N., Conklin P.L. & Loewus F.A. (2001). Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 437–467.
- Smith M.K. & McComb J.A. (1981). Effect of NaCl on the growth of whole plants and their corresponding callus cultures. *Australian Journal of Plant Physiology* **8**: 267–275.
- SoCo (2009). SoCo Project. Sustainable Agriculture and Soil Conservation. European Commission, Joint Research Centre. Institute for Prospective Technological Studies. <http://soco.jrc.ec.europa.eu/>. Acedido em Fevereiro de 2011.
- Soneji J.R., Rao P.S. & Mhatre M. (2002). Suitability of RAPD for analyzing spined and spineless variant regenerants of pineapple (*Ananas comosus* L., Merr.). *Plant Molecular Biology Reporter* **20**: 307a–307i.
- Sreenivasulu N., Grimm B., Wobus U. & Weschke W. (2000). Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiologia Plantarum* **109**: 435–442.
- Srivastava P., Pandey A. & Sinha D.P. (2011). Genetic diversity analysis in different varieties of black gram using RAPD markers. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* **3**: 53–59.
- Srivastava S., Fristensky B. & Kav N.N. (2004). Constitutive expression of a PR10 protein enhances the germination of *Brassica napus* under saline conditions. *Plant and Cell Physiology* **45**: 1320–1324.
- Staal M., Maathuis F.J.M., Elzenga J.T.M., Overbeek J.H.M. & Prins H.B.A. (1991). Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum* **82**: 179–184.
- Steiger H.M., Beck E. & Beck R. (1977). Oxygen concentration in isolated chloroplasts during photosynthesis. *Plant Physiology* **60**: 903–906.
- Storey R., Pitman M.G., Stelzer R. & Carter C. (1983). X-ray micro-analysis of cells and cell compartments of *Atriplex spongiosa*. I. Leaves. *Journal of Experimental Botany* **34**: 778–794.
- Subbarao G.V., Ito O., Berry W.L. & Wheeler R.M. (2003). Sodium—A functional plant nutrient. *Critical Reviews in Plant Sciences* **22**: 391–416.
- Sucher N.J. & Carles M.C. (2008). Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. *Planta Medica* **74**: 603–623.
- Sultana N., Ikeda T. & Itoh R. (1999). Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environmental and Experimental Botany* **42**: 211–220.
- Sun R.-L., Zhou Q.-X., Sun F.-H. & Jin C.-X. (2007). Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 468–476.
- Sun X. & Lin H.-H. (2010). Role of plant dehydrins in antioxidation mechanisms. *Biologia* **65**: 755–759.

- Swanson S. & Gilroy S. (2010). ROS in plant development. *Physiologia Plantarum* **138**: 384–392.
- Szabados L. & Savouré A. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* **15**: 89–97.
- Szalai G., Kellós T., Galiba G. & Kocsy G. (2009). Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**: 66–80.
- Tal M. (1994). *In vitro* selection for salt tolerance in crop plants: theoretical and practical considerations. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **30**: 175–180.
- Tang M., Kwon S.-Y., Kim S.-H., Kim J.-S., Choi J.S., Cho K.Y., Sung C.K., Kwak S.-S. & Lee H.-S. (2006). Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Reports* **25**: 1380–1386.
- Tausz M., Šircelj H. & Grill D. (2004). The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany* **55**: 1955–1962.
- Teakle N.L. & Tyerman S.D. (2010). Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant, Cell and Environment* **33**: 566–589.
- Teakle N., Flowers T., Real D. & Colmer T. (2007). *Lotus tenuis* tolerates the interactive effects of salinity and waterlogging by ‘excluding’ Na⁺ and Cl⁻ from the xylem. *Journal of Experimental Botany* **58**: 2169–2180.
- Teixeira J. & Pereira S. (2007). High salinity and drought act on an organ-dependent manner on potato glutamine synthetase expression and accumulation. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 121–126.
- Tester M. & Davenport R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* **91**: 503–527.
- Tezara W., Mitchell V., Driscoll S.P. & Lawlor D.W. (2002). Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1781–1791.
- Thiyagarajah M., Fry S.C. & Yeo A.R. (1996). *In vitro* salt tolerance of cell wall enzymes from halophytes and glycophytes. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1717–1724.
- Tilman D., Cassman K.G., Matson P.A., Naylor R. & Polasky S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**: 671–677.
- Timperio A.M., Egidi M.G. & Zolla L. (2008). Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics* **71**: 391–411.
- Tingey S.V. & del Tufo J.P. (1993). Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiology* **101**: 349–352.
- Torres M.A. & Dangl J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 397–403.
- Tregeagle J.M., Tisdall J.M., Tester M. & Walker R.R. (2010). Cl⁻ uptake, transport and accumulation in grapevine rootstocks of differing capacity for Cl⁻-exclusion. *Functional Plant Biology* **37**: 665–673.
- Tsang E.W.T., Bowler C., Hérouart D., Van Camp W., Villarroel R., Genetello C., Van Montagu M. & Inzé D. (1991). Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell* **3**: 783–792.
- Türkan I., Bor M., Ozdemir F. & Koca H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* **168**: 223–231.
- Türkan I. & Demiral T. (2009). Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany* **67**: 2–9.
- UNEP (2009). United Nations Environment Programme. <http://www.unep.org/climatechange/>. Acedido em Fevereiro de 2011.
- Upadhyaya H., Panda S.K. & Dutta B.K. (2008). Variation of physiological and antioxidative responses in tea cultivars subjected to elevated water stress followed by rehydration recovery. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**: 457–468.
- Ushimaru T., Nakagawa T., Fujioka Y., Daicho K., Naito M., Yamauchi Y., Nonaka H., Amako K., Yamawaki K. & Murata N. (2006). Transgenic Arabidopsis plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *Journal of Plant Physiology* **163**: 1179–1184.

- Van Camp W., Capiou K., Van Montagu M., Inzé D. & Slooten L. (1996). Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology* **112**: 1703–1714.
- Vanacker H., Carver T.L.W. & Foyer C.H. (2000). Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology* **123**: 1289–1300.
- Veilleux R.E., Shen L.Y. & Paz M.M. (1995). Analysis of the genetic composition of anther-derived potato by randomly amplified polymorphic DNA and simple sequence repeats. *Genome* **38**: 1153–1162.
- Venema K., Quintero F.J., Pardo J.M. & Donaire J.P. (2002). The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 2413–2418.
- Venkatachalam L., Sreedhar R.V. & Bhagyalakshmi N. (2007). Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **43**: 267–274.
- Vera-Estrella R., Barkla B.J., Bohnert H.J. & Pantoja O. (1999). Salt stress in *Mesembryanthemum crystallinum* L. cell suspensions activates adaptive mechanisms similar to those observed in the whole plant. *Planta* **207**: 426–435.
- Verma S. & Dubey R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* **164**: 645–655.
- Verslues P.E., Batelli G., Grillo S., Agius F., Kim Y.-S., Zhu J., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S. & Zhu J.-K. (2007). Interaction of SOS2 with nucleoside diphosphate kinase 2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H₂O₂ signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Biology* **27**: 7771–7780.
- Vijayan K., Chakraborti S.P. & Ghosh P.D. (2003). *In vitro* screening of mulberry (*Morus* spp.) for salinity tolerance. *Plant Cell Reports* **22**: 350–357.
- Vincent D. & Zivy M. (2007). Plant proteome responses to abiotic stress. In: *Plant Proteomics*, J. Šamaj & J.J. Thelen (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 346–364.
- Vincent D., Ergül A., Bohlman M.C., Tattersall E.A.R., Tillett R.L., Wheatley M.D., Woolsey R., Quilici D.R., Joets J., Schlauch K., Schooley D.A., Cushman J.C. & Cramer G.R. (2007). Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1873–1892.
- Vranová E., Inzé D. & Van Breusegem F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1227–1236.
- Vyas D. & Kumar S. (2005). Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) clone with lower period of winter dormancy exhibits lesser cellular damage in response to low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 383–388.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M. & Foolad M.R. (2003). Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany* **61**: 199–223.
- Walker D.J., Leigh R.A. & Miller A.J. (1996). Potassium homeostasis in vacuole plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 10510–10514.
- Wang B., Lüttge U. & Ratajczak R. (2001). Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2355–2365.
- Wang G.P., Zhang X.Y., Li F., Luo Y. & Wang W. (2010b). Overaccumulation of glycine betaine enhances tolerance to drought and heat stress in wheat leaves in the protection of photosynthesis. *Photosynthetica* **48**: 117–126.
- Wang H., Qi Q., Schorr P., Cutler A.J., Crosby W.L. & Fowke L.C. (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana*, interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *The Plant Journal* **15**: 501–510.
- Wang J., Zhang H. & Allen R.D. (1999). Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant and Cell Physiology* **40**: 725–732.
- Wang W., Vinocur B. & Altman A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1–14.
- Wang Y., Ying Y., Chen J. & Wang X. (2004). Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Science* **167**: 671–677.

- Wang Y.C., Qu G.Z., Li H.Y., Wu Y.J., Wang C., Liu G.F. & Yang C.P. (2010a). Enhanced salt tolerance of transgenic poplar plants expressing a manganese superoxide dismutase from *Tamarix androssowii*. *Molecular Biology Reports* **37**: 1119–1124.
- Watad A.-E.A., Reinhold L. & Lerner H.R. (1983). Comparison between a stable NaCl-selected *Nicotiana* cell line and the wild type. K^+ , Na^+ , and proline pools as a function of salinity. *Plant Physiology* **73**: 624–629.
- Watad A.-E.A., Reuveni M., Bressan R.A. & Hasegawa P.M. (1991). Enhanced net K^+ uptake capacity of NaCl-adapted cells. *Plant Physiology* **95**: 1265–1269.
- Watanabe S., Kojima K., Ide Y. & Sasaki S. (2000). Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **63**: 199–206.
- Westermeier R. & Naven T. (2002). Proteomics technology. In: *Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis*. 3^a Ed. Wiley-VCH, Weinheim: 1–160.
- Westphal S., Soll J. & Vothknecht U.C. (2001). A vesicle transport system inside chloroplasts. *FEBS Letters* **506**: 257–261.
- Wheeler G.L., Jones M.A. & Smirnoff N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365–369.
- White P.J. & Broadley M.R. (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany* **88**: 967–988.
- Widodo, Patterson J.H., Newbiggin Ed, Tester M., Bacic A. & Roessner U. (2009). Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany* **60**: 4089–4103.
- Wild A. (2003). Soils, land and food: managing the land during the twenty-first century. Cambridge University Press, Cambridge UK: 247 pp.
- Willekens H., Langebartels C., Tiré C., Van Montagu M., Inzé D. & Van Camp W. (1994). Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 10450–10454.
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D. & Van Camp W. (1997). Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C_3 plants. *The EMBO Journal* **16**: 4806–4816.
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. & Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**: 6531–6535.
- Wilson C. & Shannon M.C. (1995). Salt-induced Na^+/H^+ antiporter in root plasma membrane of a glycophytic and halophytic species of tomato. *Plant Science* **107**: 147–157.
- Winicov I. (1991). Characterization of salt tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants regenerated from salt tolerant cell lines. *Plant Cell Reports* **10**: 561–564.
- Winicov I. (1996). Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines. *Plant Science* **113**: 105–111.
- Winicov I. (1998). New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. *Annals of Botany* **82**: 703–710.
- Wise M.J. (2003). LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics* **4**: 52–71.
- Wise R.R. & Naylor A.W. (1987). Chilling-enhanced photooxidation. The peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. *Plant Physiology* **83**: 272–277.
- Wrzaczek M., Brosché M., Salojärvi J., Kangasjärvi S., Idänheimo N., Mersmann S., Robatzek S., Karpiński S., Barbara Karpińska B. & Kangasjärvi J. (2010). Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **10**: 95–103.
- Wu Y.Y., Chen G.D., Meng Q.W. & Zheng C.C. (2004). The cotton *GhNHX1* gene encoding a novel putative tonoplast Na^+/H^+ antiporter plays an important role in salt stress. *Plant and Cell Physiology* **45**: 600–607.
- Wu Z., Chen L.J. & Long Y.J. (2009). Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* **45**: 483–490.
- Xia T., Apse M.P., Aharon G.S. & Blumwald E. (2002). Identification and characterization of a NaCl-inducible vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Beta vulgaris*. *Physiologia Plantarum* **116**: 206–212.

- Xiang C., Werner B.L., Christensen E.M. & Oliver D.J. (2001). The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiology* **126**: 564–574.
- Xiao X., Yang F., Zhang S., Korpelainen H. & Li C. (2009). Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiologia Plantarum* **136**: 150–168.
- Xiong L. & Zhu J.-K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* **25**: 131–139.
- Xiong L., Schumaker K.S. & Zhu J.-K. (2002). Cell signalling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*: S165–S183.
- Xu C. & Huang B. (2008). Root proteomic responses to heat stress in two *Agrostis grass* species contrasting in heat tolerance. *Journal of Experimental Botany* **59**: 4183–4194.
- Xu C. & Huang B. (2010). Differential proteomic responses to water stress induced by PEG in two creeping bentgrass cultivars differing in stress tolerance. *Journal of Plant Physiology* **167**: 1477–1485.
- Xu G., Magen H., Tarchitzky J. & Kafkafi U. (2000). Advances in chloride nutrition. *Advances in Agronomy* **68**: 96–150.
- Xu P.-L., Guo Y.-K., Bai J.-G., Shang L. & Wang X.-J. (2008). Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Physiologia Plantarum* **132**: 467–478.
- Yamaguchi T. & Blumwald E. (2005). Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends in Plant Science* **10**: 615–620.
- Yamane K., Kawasakia M., Taniguchia M. & Miyake H. (2003). Differential effect of NaCl and polyethylene glycol on the ultrastructure of chloroplasts in rice seedlings. *Journal of Plant Physiology* **160**: 573–575.
- Yan S., Tang Z., Su W. & Sun W. (2005). Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics* **5**: 235–244.
- Yang J.L., Zhu X.F., Zheng C., Zhang Y.J. & Zheng S.J. (2011). Genotypic differences in Al resistance and the role of cell-wall pectin in Al exclusion from the root apex in *Fagopyrum tataricum*. *Annals of Botany* **107**: 371–378.
- Yang X. & Lu C. (2005). Photosynthesis is improved by exogenous glycinebetaine in salt-stressed maize plants. *Physiologia Plantarum* **124**: 343–352.
- Yang Y., Han C., Liu Q., Lin B. & Wang J. (2008). Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**: 433–440.
- Yang Y.L., Guo J.K., Zhang F., Zhao L.Q. & Zhang L.X. (2004). NaCl induced changes of the H⁺-ATPase in root plasma membrane of two wheat cultivars. *Plant Science* **166**: 913–918.
- Yang Y.W., Newton R.J. & Miller F.R. (1990). Salinity tolerance in sorghum. I. Whole plant response to sodium chloride in *S. bicolor* and *S. halepense*. *Crop Science* **30**: 775–781.
- Yannarelli G.G., Fernández-Alvarez A.J., Santa-Cruz D.M., Tomaro M.L. (2007). Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* **68**: 505–512.
- Yazici I., Türkan I., Sekmen A.H. & Demiral T. (2007). Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environmental and Experimental Botany* **61**: 49–57.
- Ye C.-Y., Zhang H.C., Chen J.H., Xia X.L. & Yin W.L. (2009). Molecular characterization of putative vacuolar NHX-type Na⁺/H⁺ exchanger genes from the salt-resistant tree *Populus euphratica*. *Physiologia Plantarum* **137**: 166–174.
- Yeo A. (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany* **49**: 915–929.
- Yeo A.R., Lee λ.-S., Izard P., Boursier P.J. & Flowers T.J. (1991). Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **42**: 881–889.
- Yin L., Wang S., Eltayeb A.E., Uddin M.I., Yamamoto Y., Tsuji W., Takeuchi Y., Tanaka K. (2010). Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to aluminium stress in transgenic tobacco. *Planta* **231**: 609–621.
- Yokoi S., Bressan R.A. & Hasegawa P.M. (2002). Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Report*: 25–33.

- Yoshida S., Tamaoki M., Shikano T., Nakajima N., Ogawa D., Ioki M., Aono M., Kubo A., Kamada H., Inoue Y. & Saji H. (2006). Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for ozone tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**: 304–308.
- Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T. & Shigeoka S. (2000). Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* **123**: 223–234.
- Younis M.E., Hasaneen M.N.A. & Kazamel A.M.S. (2010). Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimental effects of NaCl and mannitol stress in *Vicia faba* seedlings. *Protoplasma* **239**: 39–48.
- Yu Q. & Rengel Z. (1999). Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. *Plant Science* **142**: 1–11.
- Zhang H.X., Hodson J.N., Williams J.P. & Blumwald E. (2001). Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 12832–12836.
- Zhang Y. & Donnelly D.J. (1997). *In vitro* bioassays for salinity tolerance screening of potato. *Potato Research* **38**: 119–123.
- Zhao F.-G. & Qin P. (2005). Protective effects of exogenous fatty acids on root tonoplast function against salt stress in barley seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **53**: 215–223.
- Zhao F.-Y., Zhang X.-J., Li P.-H., Zhao Y.-X. & Zhang H. (2006). Co-expression of the *Suaeda salsa* *SsNHX1* and *Arabidopsis AVP1* confer greater salt tolerance to transgenic rice than the single *SsNHX1*. *Molecular Breeding* **17**: 341–353.
- Zhao Y., Du H., Wang Z. & Huang B. (2011). Identification of proteins associated with water-deficit tolerance in C_4 perennial grass species, *Cynodon dactylon* × *Cynodon transvaalensis* and *Cynodon dactylon*. *Physiologia Plantarum* **141**: 40–55.
- Zhen Y., Qi J.-L., Wang S.-S., Su J., Xu G.-H., Zhang M.S., Miao L., Peng X.-X., Tian D. & Yang Y.-H. (2007). Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiologia Plantarum* **131**: 542–554.
- Zhu B., Chen T.H. & Li P.H. (1995). Expression of three osmotin-like protein genes in response to osmotic stress and fungal infection in potato. *Plant Molecular Biology* **28**: 17–26.
- Zhu D. & Scandalios J.C. (1994). Differential accumulation of manganese-superoxide dismutase transcripts in maize in response to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiology* **106**: 173–178.
- Zhu J.-K., Liu J. & Xiong L. (1998). Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*: evidence for a critical role of potassium nutrition. *The Plant Cell* **10**: 1181–1191.
- Zhu J.-K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* **6**: 66–71.
- Zhu J.-K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 247–273.
- Zhu J.-K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 441–445.
- Zhu J., Chen S., Alvarez S., Asirvatham V.S., Schachtman D.P., Wu Y. & Sharp R.E. (2006). Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. I. Extraction and identification of water-soluble and lightly ionically bound proteins. *Plant Physiology* **140**: 311–325.
- Zhu J., Alvarez S., Marsh E.L., LeNoble M.E., Cho In-J., Sivaguru M., Chen S., Nguyen H.T., Wu Y., Schachtman D.P. & Sharp R.E. (2007). Cell wall proteome in the maize primary root elongation zone. II. Region-specific changes in water soluble and lightly ionically bound proteins under water deficit^{[W][OA]}. *Plant Physiology* **145**: 1533–1548.
- Zimmermann G., Bäumlein H., Mock H.P., Himmelbach A. & Schweizer P. (2006). The multigene family encoding germin-like proteins of barley: regulation and function in basal host resistance. *Plant Physiology* **142**: 181–192.
- Zingarelli L., Anzani P. & Lado P. (1994). Enhanced K^+ -stimulated pyrophosphatase activity in NaCl-adapted cells of *Acer pseudoplatanus*. *Physiologia Plantarum* **91**: 510–516.
- Zörb C., Herbst R., Forreiter C. & Schubert S. (2009). Short-term effects of salt exposure on the maize chloroplast protein pattern. *Proteomics* **9**: 4209–4220.
- Zou J., Liu C. & Chen X. (2011). Proteomics of rice in response to heat stress and advances in genetic engineering for heat tolerance in rice. *Plant Cell Reports* **30**: 2155–2165.