

**ESTRESSE SALINO *IN VITRO* DE CANA-DE-AÇÚCAR:
CRESCIMENTO, PROTEÔMICA E ANÁLISE DE
CARBOIDRATOS E POLIAMINAS**

LUCAS ZANCHETTA PASSAMANI

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL - 2015**

**ESTRESSE SALINO *IN VITRO* DE CANA-DE-AÇÚCAR:
CRESCIMENTO, PROTEÔMICA E ANÁLISE DE
CARBOIDRATOS E POLIAMINAS**

LUCAS ZANCHETTA PASSAMANI

Dissertação apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em Biociências
e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO – 2015

**ESTRESSE SALINO *IN VITRO* DE CANA-DE-AÇÚCAR:
CRESCIMENTO, PROTEÔMICA E ANÁLISE DE
CARBOIDRATOS E POLIAMINAS**

LUCAS ZANCHETTA PASSAMANI

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia
e Biotecnologia.

Aprovado em 2 de Abril de 2015

Comissão Examinadora:

Dr. Eliemar Campostrini – LMGV/CCTA/UENF

Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho – LBT/CBB/UENF

Dr. Marco Antônio Lopes Cruz – UFRJ-Macaé

Dr. Vanildo Silveira – LBT/CBB/UENF - Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me dar sabedoria e força para conquistar meus objetivos.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pelo espaço físico e o ensino gratuito e de qualidade.

Aos órgãos financiadores, CNPq, FAPERJ, que tornaram possível o andamento da pesquisa.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vanildo Silveira por todos os ensinamentos passados.

Aos professores Dr. Carlos Frederico de Menezes Veiga e Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho, pela colaboração nos experimentos realizados.

À aluna de doutorado Roberta Ribeiro Barbosa pela colaboração e auxílio nos experimentos realizados.

Aos meus pais, Osmar e Tânia, por estarem sempre ao meu lado, dando o apoio necessário.

Aos meus irmãos, Paulo e André, pela amizade, cumplicidade e bons conselhos sempre.

À Amanda, pela confiança na minha capacidade e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis me acalmando com as palavras certas.

Ao Grupo de Biotecnologia Vegetal, pela amizade e ajuda durante todos os experimentos.

À todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização da pesquisa.

Sumário

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Aspectos gerais.....	1
1.2. Biotecnologia vegetal	2
1.3. Estresse abiótico	3
1.3.1. Aspectos gerais	3
1.3.2. Mecanismos bioquímicos em resposta ao estresse salino	5
1.4. Proteômica.....	8
1.5. Carboidratos	9
1.6. Poliaminas	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. Material vegetal.....	13
3.2. Exposição das plantas ao estresse salino	13
3.3. Análise dos parâmetros morfológicos	14
3.4. Determinação do conteúdo endógeno de carboidratos.....	14
3.4.1. Quantificação de carboidratos solúveis totais	15
3.4.2. Quantificação de amido	15
3.4.3. Quantificação e identificação de frutose, glicose e sacarose	15
3.5. Determinação do conteúdo endógeno de poliaminas (PAs)	16
3.6. Análise proteômica	17
3.6.1. Extração de proteínas totais.....	17
3.6.2. Quantificação do conteúdo de proteínas totais	17
3.6.3. Análise LC-MS/MS.....	17
3.7. Análise dos dados	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Efeitos morfológicos nas cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino	19
4.2. Avaliação do conteúdo endógeno de carboidratos	22
4.3. Avaliação do conteúdo endógeno de poliaminas.....	25

4.4. Análise proteômica.....	28
5. DISCUSSÃO.....	35
5.1. Aspectos Fisiológicos.....	35
5.2. Carboidratos.....	36
5.3. Poliaminas.....	38
5.4. Proteômica.....	41
5.4.1. Resposta ao estresse.....	43
5.4.2. Metabolismo de proteínas.....	45
5.4.3. Metabolismo energético.....	46
5.4.4. Metabolismo de carboidratos.....	47
5.4.5. Transporte.....	47
5.4.6. Histonas.....	48
5.4.7. Síntese de flavonoides.....	49
5.5. Metabolismo Bioquímico durante o estresse salino em Cana-de-açúcar.....	50
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

RESUMO

O estresse salino é um dos mais frequentes em diversas regiões, que afeta diretamente a produtividade de espécies economicamente importantes, como a cana-de-açúcar. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar alterações bioquímicas em plantas micropropagadas de três cultivares de cana-de-açúcar (CB38-22, RB855536 e RB758540) submetidas ao estresse salino, avaliando o efeito de alta concentração de NaCl no crescimento e desenvolvimento de brotos cultivadas *in vitro*, nos conteúdos endógenos de carboidratos e poliaminas e na expressão diferencial de proteínas. Nas condições experimentais utilizadas, a cultivar RB855536 se mostrou mais tolerante ao estresse salino que os demais cultivares. Entre as alterações bioquímicas identificadas destaca-se principalmente os aumentos do conteúdo de carboidratos solúveis totais, em especial sacarose, e da razão entre Spd+Spm/Put, sugerindo essas alterações como importantes mecanismos de defesa ao estresse salino. Adicionalmente o aumento na expressão de grupos de proteínas relacionadas com a resposta ao estresse abiótico como HSPs, proteínas ribossomais, proteínas induzidas por jasmonato, V-ATPases e enzimas antioxidantes são importantes em processos essenciais na aquisição da tolerância ao estresse salino como a compartimentalização do íon Na⁺ nos vacúolos, diminuição na concentração intracelular de ROS e regulação das vias de sinalização de ABA. Nesse contexto, diante das variações bioquímicas apresentadas nas cultivares submetidos ao estresse salino, sugere-se que essas proteínas regulam possíveis vias bioquímicas importantes para o aumento da tolerância ao estresse salino em cana-de-açúcar. Os resultados obtidos são importantes para o entendimento a respeito dos mecanismos envolvidos na tolerância ao estresse salino, e podem embasar estudos de melhoramento das cultivares e conseqüente aumento na produtividade mesmo sob condições adversas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, NaCl, Proteômica

ABSTRACT

Salt stress is one of the most frequent in many regions, directly affecting the productivity of economically important species such as sugarcane. Thus, the aim of this study was to evaluate biochemical changes in vitro plants of three varieties of sugarcane (CB38-22, RB855536 e RB758540) subjected to salt stress, evaluating the effect of high concentration of NaCl on plant growth and development of shoots in vitro, the endogenous content of carbohydrates and polyamines and differential expression of proteins. Under the experimental conditions used, the cultivar RB855536 was more tolerant to salt stress than the other cultivars. Among the identified biochemical changes stands out mainly increases the content of soluble carbohydrates, especially sucrose, and the ratio of Spd+Spm/Put suggesting these changes as important defense mechanisms to salt stress. Additionally, the increase in the expression of proteins groups related the response to abiotic stress as HSPs, ribosomal proteins, jasmonate-induced proteins, V-ATPases and important antioxidant enzymes are essential processes in the acquisition of tolerance to salt stress as ion Na⁺ compartmentalization in vacuoles, a decrease in the intracellular concentration of ROS and regulation of ABA signaling pathways. In this context, given the biochemical changes mentioned in the cultivars subjected to salt stress, it is suggested that these proteins regulate possible biochemical pathways important for increasing salt tolerance in sugarcane. The results are important for understanding the mechanisms involved in salt tolerance, and to base studies may improving cultivars and consequent increase in productivity even under adverse conditions.

Keywords: Sugarcane, NaCl, Proteomics

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais

O cultivo de cana-de-açúcar é importante economicamente em diversos países, principalmente através da comercialização dos seus principais produtos, etanol e açúcar (ISO, 2012). A maior parte do açúcar produzido e comercializado mundialmente é proveniente da cultura de cana-de-açúcar. O Brasil é o maior produtor com uma produção cerca de 770 milhões de toneladas, seguido pela Índia e China com produções cerca de 342 e 128 milhões de toneladas, respectivamente (FAO, 2012; ISO, 2012).

Segundo a Companhia Nacional do Abastecimento (Conab) a cultura de cana-de-açúcar no Brasil estava em expansão, apresentando na safra 2013/2014 um aumento de 3,8% na área plantada em relação à safra 2012/2013 (ISO, 2012; CONAB, 2013). Além de apresentar um significativo aumento na área cultivada, a produtividade média em relação à safra anterior foi maior em 7,9%, passando de uma média geral de 69.407 kg.ha⁻¹ para 74.891 kg.ha⁻¹ (CONAB, 2013). Em contrapartida, recentes relatórios indicam uma queda em 2,5% na produtividade da safra 2014/2015 em relação à safra anterior. Essa queda na produtividade está principalmente relacionada com as constantes variações ambientais, em especial diferentes níveis de precipitação (UNICA, 2014; CONAB, 2015)

Embora o município de Campos dos Goytacazes seja um produtor tradicional no estado do Rio de Janeiro, a produção apresentada pelo estado do Rio de Janeiro sofreu quedas consideráveis nas últimas safras. Em contrapartida, os demais estados produtores apresentaram elevação nos índices de produção (IBGE, 2013; CONAB, 2015). Diante disso, o desenvolvimento tecnológico da cultura de cana-de-açúcar no Rio de Janeiro é necessário para que possa obter uma elevação nas taxas de produção das safras subsequentes. Nesse contexto, juntamente com uma melhor gestão do agronegócio, a biotecnologia vegetal surge como uma importante ferramenta utilizando as pesquisas aplicadas com principal objetivo de apresentar melhorias na produção de diversas cultivares de interesse econômico para a região (Cidade et al., 2006; Veiga et al., 2006; Ruane e Sonnino, 2011).

1.2. Biotecnologia vegetal

Atualmente, com a preocupação do crescente aumento da população mundial, muitas pesquisas visam o aumento de produção de diversas espécies importantes (Anderson, 2010). Diante disso, técnicas de biotecnologia vegetal, como a transformação genética e cultura de tecidos, surgem como importantes ferramentas para a maior compreensão de processos celulares e, juntamente com diversas outras técnicas, empregadas em programas de melhoramento visando um aumento de produção (Lakshmanan et al., 2005; Vasil, 2008).

A cultura de tecidos é uma técnica biotecnológica na qual estruturas isoladas das plantas são cultivadas em meio artificial sob condições controladas. Essa ciência é composta por diferentes técnicas. A micropropagação é uma das técnicas mais utilizadas onde, dentre outras vantagens, pode-se obter uma alta produção em um espaço físico reduzido e clones totalmente livres de patógenos (George et al., 2008). A micropropagação de cana-de-açúcar é estudada desde a década de 60 por diversos pesquisadores e, diante disso, diferentes protocolos foram estabelecidos e conseqüentemente um avanço na utilização dessa técnica para cana-de-açúcar. O avanço na técnica possibilitou a utilização da micropropagação em conjuntos com outras áreas da biotecnologia vegetal, como a transformação genética (Lakshmanan et al., 2005).

A utilização da micropropagação é importante em estudos de fisiologia do estresse, visto que a utilização dessa técnica permite uma análise mais aprofundada, em ambiente controlado, das alterações bioquímicas relacionadas com o aumento da tolerância ao estresse. Estudos revelam que sob estresse abióticos, as plantas sofrem diversas alterações morfológicas, principalmente alterações na área radicular (Gimeno et al., 2012; Fernández, 2014). A utilização da cultura de tecidos se tornou muito importante sendo possível minimizar os efeitos morfológicos, e com isso evidenciar alterações “secundárias” como as alterações bioquímicas e moleculares de resposta das plantas ao estresse salino. Essa maior identificação a nível bioquímico e molecular permite alcançar importantes resultados principalmente na identificação de genes e proteínas envolvidas na aquisição da tolerância à diferentes estresses abióticos, incluindo o estresse salino (Zhu et al., 2013; Mostek et al., 2015).

A transformação genética, embora ainda muito discutida quanto ao seu emprego em produção em larga escala, desde de 1996 vem sendo utilizada e

resulta no aumento de produção e resistência a herbicidas e insetos em diferentes espécies de importância econômica, como soja, canola, milho, entre outros (Li et al., 2012). Além do aumento de produção e resistência à insetos e herbicidas, a transformação genética foi recentemente utilizada em trabalhos com diferentes espécies inserindo resistência aos diversos tipos de estresses bióticos e abióticos (Gong e Liu, 2012; Bressan et al., 2013). Dessa forma, a elucidação de mecanismos de defesa das plantas a nível de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica são importantes para o fornecimento de informação necessárias para técnicas como transformação genética (Zhang, L. et al., 2012; Kushalappa e Gunnaiah, 2013).

1.3. Estresse abiótico

1.3.1. Aspectos gerais

Plantas são organismos sésseis e por isso estão constantemente sendo submetidas a condições não favoráveis ao seu crescimento e desenvolvimento. Segundo relatório apresentado pela Conab, a influência das mudanças climáticas pode diminuir significativamente a taxa de produção de cana-de-açúcar, principalmente nas regiões norte e nordeste, que sofrem constantemente com estresses abióticos, como déficit hídrico (CONAB, 2013). Visto que constantemente as plantas são submetidas à condições desfavoráveis a seu crescimento e desenvolvimento, algumas espécies adaptam-se à essas condições e adquirem tolerância, devido a cascatas de sinalização regulando ação de hormônios e expressão gênica (Wang et al., 2003).

Dentre os estresses abióticos, o estresse salino é um dos mais estudados devido à preocupação com o constante aumento da taxa de salinidade do solo em diversos países (Wang et al., 2003). No Brasil, a alta concentração de sais nos solos é uma característica comum em diferentes regiões, incluindo a região norte e noroeste fluminense (EMBRAPA, 2014).

O interesse em estudar os mecanismos de tolerância contra estresse salino aumenta diante do fato de que o excesso de sal no solo provoca diversos danos às plantas, que impedem o seu crescimento e desenvolvimento. De acordo com recentes estudos, o excesso de Na^+ é tóxico à planta podendo provocar estresse osmótico, perda das funções fotossintéticas e de forma mais

severa pode causar a morte da planta (Gao et al., 2011; Fatehi et al., 2012; Yokthongwattana et al., 2012; Yan et al., 2013).

Estudos sugerem uma subdivisão dos efeitos causados pelo estresse salino, na qual a alta concentração salina promove um estresse osmótico e, ao mesmo tempo, devido à alta absorção de íons, ocorre um estresse iônico, principalmente pela concentração elevada de Na^+ (Gupta e Huang, 2014). Durante o estresse osmótico, a alta concentração de sal no solo resulta na diminuição da absorção de água pela raiz além de uma maior perda de água nas folhas, causando diversos efeitos fisiológicos como baixa atividade fotossintética e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Munns e Tester, 2008). Já durante o estresse iônico a alta absorção de íons, principalmente Na^+ e Cl^- resulta em danos fisiológicos e bioquímicos. Adicionalmente, a alta concentração de Na^+ intracelular impede a absorção de K^+ que é um elemento essencial em diferentes processos vitais da célula (Munns, 2002). Nesse sentido, os principais mecanismos para a tolerância ao estresse salino visam a menor absorção dos íons pela raiz e a compartimentalização (principalmente vacuolar) dos íons absorvidos. Esses mecanismos impedem o acúmulo de alta concentração citoplasmática e conseqüentemente o desbalanceamento iônico (Munns, 2005).

O estresse salino promove diferentes respostas fisiológicas e bioquímicas diante dos danos causados pelo aumento da concentração salina no solo. De acordo com Zhu (2001), o estresse salino promove inicialmente o estresse iônico e osmótico e de forma secundária pode causar estresse oxidativo. Dessa forma, a aquisição da tolerância ao estresse salino depende de diferentes vias bioquímicas interligadas, visando principalmente sobreviver à condição de estresse (Zhu, 2001). Em um primeiro momento, devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), as plantas necessitam se desintoxicar através da síntese de compostos importantes como os osmólitos e diversas proteínas que são capazes de diminuir a concentração intracelular de ROS durante o estresse salino (Zhao et al., 2013; Puniran-Hartley et al., 2014). Simultaneamente a desintoxicação, as plantas promovem a homeostase iônica principalmente através da compartimentalização dos íons nos vacúolos e a homeostase osmótica principalmente pela ação dos osmólitos (Parida e Das, 2005). Em um segundo momento, devido a regulação na expressão de genes e proteínas

importantes, as plantas são capazes de manter seu crescimento, mesmo que em valores menores que os apresentados em ambientes favoráveis (Zhu, 2001).

Segundo Rodziewicz et al. (2014), a compreensão dos mecanismos de defesa das plantas sob alta concentração salina é necessária para obtenção de novas cultivares que apresentem adaptações para produzirem em condições adversas. Diante disso, as análises de genômica, proteômica e metabolômica são importantes para a compreensão, a nível bioquímico e molecular, dos eventos fisiológicos que ocorrem nas plantas sob estresse salino, como a identificação de genes e proteínas importantes para a tolerância e também da dinâmica de compostos importantes para a adaptação como carboidratos e poliaminas (Janicka-Russak et al., 2010; Yang et al., 2011; Zhang et al., 2011; Boriboonkaset et al., 2013a).

1.3.2. Mecanismos bioquímicos em resposta ao estresse salino

Segundo Barkla et al. (2013), a proteômica se tornou uma importante ferramenta nos estudos de fisiologia de estresses identificando proteínas e vias de sinalização que podem ser utilizados como biomarcadores e em estratégias de transformações genéticas, uma vez que proporciona uma rápida identificação e quantificação das proteínas, bem como interações proteína-proteína e modificações pós-traducionais. Recentes estudos revelam várias proteínas reguladas sob estresse salino, sendo essas proteínas divididas de acordo com suas funções biológicas.

Entre os principais grupos de proteínas expressas diferencialmente em condições de estresse salino são as HSP (heat shock proteins), LEA (late embryogenesis abundant); enzimas de biossíntese de osmólitos; proteínas do metabolismo de carbono; enzimas sequestradoras de espécies reativas de oxigênio (Rodziewicz et al., 2014).

As proteínas HSP são importantes no enovelamento de proteínas e na estabilização de proteínas e membranas e assim podem ser um mecanismo de tolerância das plantas sob condições adversas, sendo que essas proteínas não são expressas somente quando expostas a altas temperaturas, mas também em outras condições como sob estresse salino, osmótico, oxidativo, entre outros (Wang et al., 2004; Rodziewicz et al., 2014). Em plantas, as HSPs são

organizadas em 5 grandes famílias reconhecidas. Essa divisão é feita por meio de características como peso molecular, sequência de aminoácidos e função (Rodziewicz et al., 2014). Estudos demonstram que dentre as famílias de HSP reconhecidas, a HSP70 e HSP90 são descritas como possíveis reguladoras do mecanismo de tolerância das plantas sob estresse salino (Timperio et al., 2008).

As proteínas LEA (late embryogenesis abundant) são acumuladas durante a fase de desenvolvimento da semente e são importantes para evitar a germinação precoce e aumentam a tolerância a dessecação. Embora as proteínas LEA sejam mais relacionadas com o desenvolvimento das sementes, estudos recentes demonstram a participação dessas proteínas na proteção da planta contra diversos estresses abióticos (Reddy et al., 2012; Amara et al., 2013; Rodziewicz et al., 2014). As deidrininas correspondem a um grupo de proteínas LEA, e essas proteínas atuam na defesa contra diversos estresses abióticos, entre o estresse salino (Bray, 1993). Estudos demonstram que, sob estresses abióticos, diferentes espécies apresentam uma superexpressão de deidrininas, sugerindo a participação dessas proteínas na aquisição da tolerância à estresses abióticos (Lopez et al., 2003; Ford et al., 2011).

Os osmólitos são moléculas importantes para a defesa das plantas contra diversos estresses abióticos, devido a capacidade que essas moléculas possuem de manter a integridade de membrana e enzimas e também de regular a pressão osmótica (Rodziewicz et al., 2014). Estudos recentes demonstram que a expressão das enzimas que participam da síntese de osmólitos é alterada sob estresse salino, visto que nessas condições, como mecanismo de defesa da plantas, ocorre um acúmulo de osmólitos (Agarwal et al., 2013). Dentre essas enzimas, a betaína aldeído desidrogenase (BADH) e a delta-1-pirrolina-5-carboxilato (P5CS) que participam da síntese de glicinabetaína e prolina, respectivamente, são moduladas por diferentes estresses abióticos em diferentes espécies, sugerindo a participação dessas moléculas como ferramenta de defesa das plantas em condições adversas (Székely et al., 2008; Verbruggen e Hermans, 2008; Chen e Murata, 2011).

Embora sejam considerados tóxicos em altas concentrações, ROS são importantes moléculas sinalizadoras na ativação dos processos de defesas em plantas, sendo produzidas de diferentes formas nas células (Rodziewicz et al., 2014). Em condições de estresses abióticos é descrito que ocorre um aumento

na produção de ROS gerando uma toxicidade na célula, podendo ativar processos de morte celular programada (Dat et al., 2000). Nesse contexto, enzimas que possuem a capacidade de sequestrar ROS são importantes durante a aquisição de tolerância à estresses abióticos. Dentre essas enzimas, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX), entre outras, são estudadas e identificadas como importantes enzimas no controle de ROS durante estresses abióticos em diferentes espécies (Gill e Tuteja, 2010).

Contrariamente aos demais grupos, as proteínas do metabolismo de carbono sofrem diminuição em suas atividades quando as plantas são expostas à diferentes estresses abióticos, sendo isso prejudicial para o aparato fotossintético e conseqüentemente para a produção de energia (Chaves et al., 2009). Segundo Mittler (2002), o aumento da produção de ROS proveniente da condição estressante, causa danos na maquinaria fotossintética. Recentes estudos demonstram que, sob estresse abiótico, diferentes espécies apresentam uma diminuição significativa na atividade da RUBISCO, e conseqüente danos ao processo fotossintético, visto a importância dessa proteína para o processo de fotossíntese (Flexas et al., 2006; Ashoub et al., 2013).

Além das proteínas, outros compostos também são regulados durante o estresse salino e são importantes para a tolerância da planta ao estresse abiótico. Dentre esses compostos, as poliaminas (PAs) e os carboidratos são fortemente regulados e participam de diferentes vias metabólicas envolvidas na tolerância ao estresse salino (Krasensky e Jonak, 2012).

Segundo Keunen et al. (2013), os principais açúcares envolvidos nas respostas aos estresses abióticos são os dissacarídeos (sacarose, trealose), oligossacarídeos da família rafinose (RFOs) e frutanos. Estudos em *Arabidopsis thaliana* demonstram que a adição exógena de sacarose contribui para a aquisição da tolerância ao estresse salino principalmente por alterações fisiológicas (Qiu et al., 2014), principalmente relacionando a sacarose com a biossíntese de compostos importantes para a tolerância como os frutanos e antocianinas (Van den Ende e El-Esawe, 2014). A formação e acúmulo de RFOs é importante para minimizar os danos causados por estresses abióticos em diferentes espécies (Nishizawa et al., 2008; Keunen et al., 2013). Frutanos são polímeros de frutoses derivadas da sacarose e, para algumas espécies (como

Poaceae) são a principal fonte de reserva de carboidratos. Além disso, são importantes ferramentas das plantas para resistirem sob condições adversas (Hendry, 1993; Albrecht et al., 1997; Valluru e Van den Ende, 2008).

O acúmulo de PAs é demonstrado em diferentes espécies quando submetidos ao estresse salino. Segundo Zhao et al. (2007), o acúmulo de PAs é importante para a regulação iônica em plantas sob estresse salino, demonstrando que as PAs regulam atividades de canais iônicos e regulam principalmente o conteúdo de Na⁺. Adicionalmente as PAs também podem atuar na ativação das principais enzimas sequestradoras de ROS, visando dessa forma tanto a homeostase iônica como a homeostase osmótica (Zhao e Yang, 2008).

1.4. Proteômica

O termo “Proteômica” foi primeiramente utilizado em meados dos anos 90, referindo-se ao conjunto de proteínas de um organismo num determinado momento e numa determinada condição, podendo apresentar informações sobre a quantificação de proteínas de totais, modificações pós-traducionais e interação proteína-proteína (Wilkins et al., 1996; Baginsky, 2009; Vanderschuren et al., 2013). Em plantas, os primeiros estudos envolvendo proteômica apresentavam apenas resultados de análise de perfil em eletroforese bidimensional e dessa forma se tornavam somente contemplativos. Porém, com o avanço da tecnologia, se tornou possível o sequenciamento e identificação das proteínas utilizando espectrometria de massas (MS) e análise em diversos algoritmos, que proporcionam uma análise mais ampla e diminuindo as limitações das técnicas de proteômica (Chen e Harmon, 2006; Oeljeklaus et al., 2009; Vanderschuren et al., 2013).

Diante desses avanços nas técnicas de proteômica, há um aumento constante nos números de estudos realizados analisando alterações no proteoma de diferentes espécies nos mais diversos eventos fisiológicos, como germinação e desenvolvimento de sementes, embriogênese somática, morte celular programada, entre outros (Jorrin-Novo, 2009; Jorrin-Novo et al., 2009). Dentre todos os eventos fisiológicos, a fisiologia do estresse recebeu uma atenção especial, com diversos artigos publicados nos últimos anos (Gao et al., 2011; Zhang et al., 2011; Fatehi et al., 2012; Folgado et al., 2013).

Nos últimos anos, os estudos envolvendo proteômica se tornaram mais aplicados a partir do surgimento de uma subárea, denominada “proteômica translacional” (Agrawal et al., 2012). A proteômica translacional é basicamente composta por três passos: I) identificação de proteínas candidatas; II) validação da função das proteínas candidatas, utilizando técnicas de engenharia genética com plantas modelos; III) identificação das proteínas que apresentam funções importantes, tornando possível a obtenção de cultivares com características desejáveis (Abreu et al., 2013). Diante disso, a proteômica como ferramenta de estudo da fisiologia do estresse se torna mais aplicável e com a possibilidade de produzir cultivares que apresentem tolerância a diversos estresses abióticos, apresentando metabolismo fotossintético não alterado e com isso uma produção alta mesmo em condições adversas ao crescimento (Abreu et al., 2013).

Nesse contexto, através da utilização da proteômica, e principalmente utilizando os princípios estabelecidos pela proteômica translacional, a identificação de proteínas reguladas sob estresse salino se torna importante para a compreensão dos mecanismos de tolerância das plantas fornecendo informações cruciais para a possibilidade de obtenção de cultivares superiores que apresentem resistência aos mais diversos estresses abióticos.

1.5. Carboidratos

Carboidratos são produtos primários durante o processo fotossintético e atuam como substrato do metabolismo do carbono (Gupta e Kaur, 2005). Carboidratos como sacarose, frutose e glicose, são importantes por atuarem em processos vitais do organismo, como no metabolismo respiratório, e ainda atuam como substrato para síntese de compostos de reservas, como amido e celulose (Smeekens, 2000).

Semelhante ao apresentado por diversos hormônios vegetais, os carboidratos apresentam vias de sinalização que regulam expressão gênica e atividade de proteínas, e dessa forma regulam diversos processos biológicos nas plantas (Koch, 1996; Eveland e Jackson, 2012). Segundo Rolland et al. (2002), a elucidação dos mecanismos de sinalização dos carboidratos revelou diferentes rotas que resultam no controle gênico e, diante disso, os açúcares possuem a capacidade de modular diversos processos durante o crescimento e desenvolvimento vegetal, dentre eles a resposta a estresses abióticos. Sugere-

se que o metabolismo de carboidratos é uma importante ferramenta da planta como mecanismo de defesa em ambientes estressantes, como na presença de altas concentrações de sal no solo (Rodziewicz et al., 2014).

Estudos recentes sugerem que, sob estresses abióticos, as plantas promovem um aumento no conteúdo endógeno de carboidratos solúveis como mecanismo de defesa para adquirir tolerância às condições adversas ao crescimento (Oufir et al., 2008; Sperdoui e Moustakas, 2012; Palma et al., 2013).

Segundo Couée et al. (2006), o acúmulo de carboidratos, principalmente sacarose, frutose e glicose, é importante para prevenir danos causados por estresse oxidativo, principalmente pelo acúmulo de ROS. Resultados sugerem que esses açúcares podem participar de vias de captação de ROS em condições de estresse abiótico. Em diferentes espécies é possível observar o aumento no conteúdo endógeno de carboidratos sob estresses abiótico, sugerindo que o metabolismo de carboidratos como mecanismo de tolerância sob estresse abiótico é comum nas plantas (Morsy et al., 2007; Sicher et al., 2012).

Diante disso, a compreensão das alterações no perfil de carboidratos de plantas sob estresse salino, pode fornecer informações importantes sobre mecanismo de tolerância, uma vez que carboidratos solúveis (tais como sacarose, glicose e frutose) apresentam seus perfis alterados quando submetidos às condições adversas, e sendo assim, pode-se identificar rotas de sinalização importantes para o processo de aquisição de tolerância das plantas.

1.6. Poliaminas

As Poliaminas (PAs) podem ser consideradas como uma das mais antigas do grupo de substâncias conhecidas em bioquímica, sendo classificadas como compostos alifáticos, de baixo peso molecular contendo nitrogênio (Alcazar et al., 2010).

Estudos sugerem que as plantas teriam adquirido uma parte da via de biossíntese de PAs a partir de cianobactérias ancestrais dos cloroplastos, sendo assim, sugere-se que a rota das PAs é uma rota metabólica conservada durante a evolução, presente em todos os organismos (Illingworth et al., 2003; Alcazar et al., 2010). A biossíntese das PAs ocorre a partir de reações realizadas em dois aminoácidos, ambas dando origem à Putrescina (Put), a arginina a partir da ação da arginina descarboxilase (ADC) e a ornitina a partir da ação da ornitina

descarboxilase (ODC). A biossíntese de Espermidina (Spd) ocorre através da adição de um grupo aminopropil em uma molécula de Put, enquanto que a biossíntese de Espermina (Spm) ocorre a partir da adição de um grupo aminopropil em uma molécula de Spd. O grupo aminopropil utilizado na biossíntese das PAs é originado a partir da descarboxilação da S-adenosilmetionina (SAM) (Baron e Stasolla, 2008).

As PAs possuem a capacidade de interagir com diversas moléculas celulares importantes (DNA, RNA, proteínas, cromatinas, entre outras), e com isso modulam diversos processos fisiológicos: Divisão e diferenciação celular, embriogênese, germinação de sementes, respostas a estresses abióticos e bióticos, entre outros (Santa-Catarina et al., 2007; Dias et al., 2009; Pieruzzi et al., 2011; Vuosku et al., 2012; Grzesiak et al., 2013).

A identificação das PAs como um dos mecanismos de defesa das plantas sob diversos estresses abióticos é descrito em diferentes espécies, sugerindo que o acúmulo dessas moléculas é importante para aquisição da tolerância (Fariduddin et al., 2013; Gupta et al., 2013). Estudos revelam que as principais enzimas envolvidas na biossíntese de PAs em plantas, principalmente a arginina descarboxilase 2, apresentam suas expressões reguladas por condições ambientais, resultando no acúmulo de PAs sob condições adversas (Perez-Amador et al., 2002; Urano et al., 2003; Hummel et al., 2004; Alcázar et al., 2006).

Dessa forma, estudos que objetivam identificar possíveis alterações nos perfis das diferentes poliaminas sob condições adversas, podem fornecer informação de rotas de sinalização e enzimas importantes durante a aquisição de tolerância ao estresse abiótico, sendo informações fundamentais para produção de cultivares superiores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar alterações bioquímicas em plantas micropropagadas de três cultivares de canas-de-açúcar submetidas ao estresse salino.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o efeito do estresse salino no crescimento e desenvolvimento de brotos de três cultivares de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*;
- Determinar as alterações no conteúdo endógeno de carboidratos solúveis totais e amido, além de quantificar o conteúdo endógeno de frutose, glicose e sacarose, no diferentes cultivares submetidos ao estresse salino.
- Determinar as alterações no conteúdo endógeno de poliaminas em cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino, analisando as alterações no metabolismo dessas moléculas sob estresse salino;
- Avaliar o efeito do estresse salino na expressão diferencial de proteínas;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Para a realização dos experimentos foram utilizadas 3 diferentes cultivares de cana-de-açúcar: I) CB38-22: tolerante ao estresse salino; II) RB855536: susceptível ao estresse salino; III) RB758540: tolerante ao estresse hídrico. Ressalta-se que a classificação a respeito dos níveis de tolerância das cultivares CB38-22 e RB855536, são informações fornecidas por produtores locais, sem nenhuma comprovação científica, sendo apenas para a cultivar RB758540 comprovado sua tolerância ao estresse hídrico por dados científicos (Ridesa, 2010).

Plantas micropropagadas foram utilizadas como explantes para o experimento. As culturas *in vitro* foram obtidas por meio de uma colaboração com o Prof. Dr. Carlos Frederico de Menezes Veiga (UFRRJ) e o Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (UENF).

Em resumo, as culturas foram introduzidas *in vitro* de acordo com a metodologia estabelecida por Lee (1987), utilizando os meristemas como explantes. Os explantes foram submetidos ao processo de assepsia com álcool 70% e hipoclorito 1,25%, e posteriormente mantidos por 7 dias em meio líquido MS (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com 2% de sacarose, 0,2 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,1 mg L⁻¹ de KIN (cinetina), com o pH ajustado para 5,8 e mantidos na ausência de luz. Posteriormente foram transferidos para frascos com tampa ventilada, utilizando os mesmos componentes no meio de cultivo, e mantidos sob fotoperíodo de 16h e temperatura de 20°C. As culturas *in vitro* foram mantidas durante 4 ciclos de repicagens, com intervalo de 15 dias. Após a 4^a repicagem, as culturas foram submetidas aos tratamentos propostos.

3.2. Exposição das plantas ao estresse salino

As cultivares foram submetidas a duas concentrações diferentes de NaCl (0 e 180 mM) no meio líquido MS, suplementado com 2% de sacarose, 0,2 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,1 mg L⁻¹ de KIN (cinetina), com o pH ajustado para 5,8, e mantidos sob fotoperíodo de 16h e temperatura de 20°C durante 20 dias e posteriormente serão coletadas amostras. Para as coletas das

amostras, a parte aérea de cada repetição, individualmente, foi macerada com nitrogênio líquido e o macerado resultante foi armazenado em freezer -20°C em alíquotas de 300 mg e 500 mg para as análises bioquímicas. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 3x2, com quatro repetições, sendo que cada repetição composta por um frasco contendo uma planta em cada.

3.3. Análise dos parâmetros morfológicos

A análise do efeito das diferentes concentrações de NaCl nos diferentes cultivares foi realizada avaliando o crescimento e o número de perfilhos em cada cultivar. Adicionalmente, o peso fresco foi determinado por pesagem das plantas imediatamente após a coleta, enquanto o peso seco foi obtido pela pesagem das mesmas, após um processo de secagem em estufa a 90 °C por 12h. O conteúdo de massa d'água foi determinado através da diferença da biomassa fresca e seca.

3.4. Determinação do conteúdo endógeno de carboidratos

A metodologia usada para a extração de carboidratos foi baseada na metodologia descrita por Vale (2013). Para a extração dos açúcares, As amostras de 300 mg de matéria fresca foram maceradas com 1,0 mL de etanol 80%. O material foi coletado para tubos eppendorfs onde foi vortexado brevemente para homogeneização. Posteriormente, as amostras foram mantidas em banho-maria a 70°C, por 90 minutos, seguido de centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de etanol 80% e centrifugado novamente nas mesmas condições da primeira centrifugação. O sobrenadante proveniente da segunda centrifugação foi unido ao sobrenadante da primeira etapa e foi filtrado em filtro com membrana 0,2 µm para posterior análise de carboidratos solúveis totais e identificação e quantificação por HPLC. O precipitado foi armazenado para a determinação de amido. As amostras foram armazenadas a -20 °C até a determinação dos carboidratos.

3.4.1. Quantificação de carboidratos solúveis totais

A quantificação de carboidratos solúveis totais foi realizada baseada na metodologia descrita por McCready et al. (1950), com modificações.

Foi adicionado 2mL de uma solução 0,2% de antrona-sulfúrica em 1mL da amostra contendo os carboidratos solúveis. As amostras foram mantidas em banho-maria a 100°C por 3min e posteriormente foram incubadas por 5min a temperatura ambiente.

Para a identificação da concentração de carboidratos solúveis totais, as amostras foram injetadas em placas de 96 poços e foi realizada a leitura a 620nm. A concentração dos carboidratos solúveis totais foi avaliada por comparação com uma curva de valores conhecidos de glicose.

3.4.2. Quantificação de amido

A quantificação de amido foi baseada na descrita por McCready et al. (1950), com modificações. Em resumo, o precipitado oriundo da extração dos carboidratos solúveis foi suspenso em ácido perclórico 30%. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado. Posteriormente foi adicionado 2mL de uma solução 0,2% de antrona-sulfúrica em 1mL da amostra contendo amido. As amostras foram mantidas em banho-maria a 100°C por 3min e posteriormente foram incubadas por 5min a temperatura ambiente.

Para a identificação da concentração de amido, as amostras foram injetadas em placas de 96 poços e foi realizada a leitura a 620nm. Os valores obtidos foram multiplicados por 0,9 (taxa de conversão da glicose) e a concentração de amido foi avaliada por comparação com uma curva de valores conhecidos de glicose.

3.4.3. Quantificação e identificação de frutose, glicose e sacarose

Para a identificação de frutose, glicose e sacarose, foi utilizado um detector por espalhamento de luz (ELSD-LT II), com configurações ajustadas para temperatura de 40 °C, pressão de N₂ em 350 kPa, ganho 9 e filtro 4.

Como fase estacionária (FE) foi utilizada uma coluna Prevail Carbohydrate ES 5 µm (250 x 4,6 mm), com uma pré coluna do tipo Prevail

Carbohydrate ES 5 μm (7,5 x 4,6 mm). Sendo a temperatura do forno de colunas mantida a 25°C.

Como solventes, que representam a fase móvel (FM) foram utilizados: Água Milli-Q, como solvente A, e acetonitrila 100%, como solvente B. A mudança na proporção de acetonitrila em relação a proporção de água definiu o gradiente de corrida. O gradiente do solvente B foi ajustado para 80%, durante os primeiros 16 min com posterior redução para 70%, entre 16 e 23 min com fluxo constante de 1 mL min⁻¹. Foram injetados 10 μL a amostra. As áreas e tempos de retenção dos carboidratos glicose, frutose e sacarose foram avaliados por comparação com padrões em diferentes concentrações.

3.5. Determinação do conteúdo endógeno de poliaminas (PAs)

A metodologia para a determinação de PAs livres foi baseada naquela desenvolvida por (Silveira et al., 2004). As amostras de 300 mg foram maceradas com 1,4 mL de ácido perclórico 5% (v/v), e mantidas no gelo por 60 min, sendo posteriormente centrifugadas a 20.000g por 20 min, a 4 °C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado e o sedimento foi ressuspenso em 200 μL de ácido perclórico 5%, centrifugado novamente, e os dois sobrenadantes, que contêm as PAs livres solúveis, foram combinados e homogeneizados.

Na derivatização, 40 μL da amostra contendo PAs foram misturados com 100 μL de cloreto de dansil (5 mg mL⁻¹ em acetona), 50 μL de solução saturada de carbonato de sódio (NaHCO₃) e 20 μL de 1,7-diaminoheptano (DAH) (0.25 mM), que foi utilizado como padrão interno. Após a mistura, as amostras foram incubadas no escuro por 50 min, a 70 °C. O excesso de cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina adicionando-se 25 μL de prolina (100 mg mL⁻¹) com posterior incubação por 30 min no escuro, à temperatura ambiente. Em seguida, as PAs derivatizadas foram particionadas com 200 μL de tolueno, e a fase apolar (tolueno), que contém as PAs, foi coletada (175 μL), seca sob jato de nitrogênio, e ressuspenso em 175 μL de acetonitrila.

A identificação e quantificação das PAs foram realizadas utilizando-se HPLC, com coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Acetonitrila 100% e acetonitrila 10% em água (pH 3,5 ajustado com HCl 1N) foram utilizadas como solventes. A mudança na proporção de acetonitrila 100%

em relação a acetonitrila 10% definirá o gradiente de corrida. O gradiente de acetonitrila 100% foi programado para 60%, durante os primeiros 13 min; de 60 a 100%, entre 13 e 16 min; e 100% até 25 min; com fluxo de 1 mL min⁻¹, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado para excitação de 340 nm e emissão de 510 nm. Foram injetados 20 µL da solução derivatizada com cloreto de dansil. As áreas e tempos de retenção de cada PA Foram avaliados por comparação com as PAs com concentrações conhecidas: Put, Spd, Spm e DAH.

3.6. Análise proteômica

3.6.1. Extração de proteínas totais

As proteínas foram extraídas seguindo a metodologia descrita por Balbuena et al. (2009). Amostras de 500 mg serão maceradas sob nitrogênio líquido. O pó resultante foi colocado em um microtubo de 2ml e em seguida foi adicionado 1ml do tampão de extração TCA/Acetona. As amostras foram incubadas por 60 minutos no gelo e posteriormente foram centrifugadas a 14000g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado 3 vezes em acetona/DTT. Após as lavagens, os pellets foram ressuspensos em 1mL do tampão uréia/tioureia (7M ureia, 2M tioureia, 1% dithiothreitol – DTT, 2% triton-100, 0,5% pharmalyte, 1mM PMSF), e mantidos em agitação por 60min à 4°C para completa homogeneização das amostras. As amostras foram transferidas para o gelo e mantidas por 30 minutos e, posteriormente foram centrifugadas a 14.000g por 10 minutos. O sobrenadante proveniente da centrifugação foi então coletado e armazenado à -20°C.

3.6.2. Quantificação do conteúdo de proteínas totais

Para a quantificação das proteínas totais das amostras, foi utilizado o método 2D-Quant Kit (GE Healthcare) de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante. A leitura da absorbância de cada amostra e da curva padrão foi realizada em 480 nm em leitor de microplacas.

3.6.3. Análise LC-MS/MS

A análise de shotgun foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Liu et al. (2004). Alíquotas contendo 100µg de proteínas foram precipitadas utilizando acetato de amônio, posteriormente foram suspensos em bicarbonato

de amônio 50mM e digeridas com tripsina (50 ng μL^{-1}) (V5111, Promega, Madison, WI, USA). Os peptídeos resultantes foram concentrados e dessalinizados com o uso de ponteiras do tipo Zip Tip C18 (Millipore®) e posteriormente analisada num espectrômetro de massas SYNAPT G2 HDMS Si (nano cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo, em tandem). Um UPLC nanoACQUITY ligado a um espectrômetro de massa SYNAPT G2-Si HDMS (Waters, Manchester, Reino Unido) foi utilizado para análise de LC-ESI-MS / MS. O espectrômetro de massa foi operado em modo de resolução (modo V) e positivo com mobilidade iônica; transferência de energia de colisão de 19 a 45V no modo de alta energia; cone de tensão e capilar de 30v e 2800v, respectivamente, e temperatura da fonte de 70 °C. Para os parâmetros do TOF, o tempo de verificação foi definido para 0.5s, em modo contínuo, e uma faixa de massa de 50 a 2000 Da

O programa MassLinx foi usado na identificação de proteínas. A lista de peptídeos foi contrastada usando as bases de dados de proteína SUCEST (www.sucest-fun.org). Após a identificação, as proteínas foram selecionadas de acordo com o coeficiente de variação e o nível de expressão, sendo então selecionadas as proteínas que apresentaram um coeficiente de variação abaixo de 0,5 e uma diferença de no mínimo duas vezes na expressão. As proteínas selecionadas foram então submetidas a caracterização funcional utilizando o programa Blast2go (www.blast2go.com).

3.7. Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias serão comparadas pelo teste SNK a 5%, utilizando o programa Assistat (Silva e Azevedo, 2002).

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos morfológicos nas cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino

Plantas micropropagadas de cana-de-açúcar das cultivares CB38-22, RB855536 e RB758540 foram submetidas ao estresse salino. Após vinte dias submetidas ao estresse salino, foi possível observar uma diferença nas respostas das cultivares micropropagadas, indicando diferentes níveis de resposta ao NaCl nas cultivares testadas. Todas as cultivares utilizadas no experimento apresentaram danos morfológicos devido à presença do NaCl no meio de cultivo. Dentre os três cultivares, a cultivar CB38-22 apresentou uma menor tolerância ao estresse salino em relação as demais cultivares (Figura 1). Observou-se que quando submetidas à concentração de 180 mM de NaCl as plantas da cultivar CB38-22 apresentam uma queda significativa na formação e comprimento da parte aérea (Figura 1). Em contrapartida nas demais cultivares, especialmente na cultivar RB855536, foi possível observar uma maior tolerância ao estresse salino, apresentando um crescimento mais constante mesmo em condições desfavoráveis ao crescimento e desenvolvimento (Figura 1).

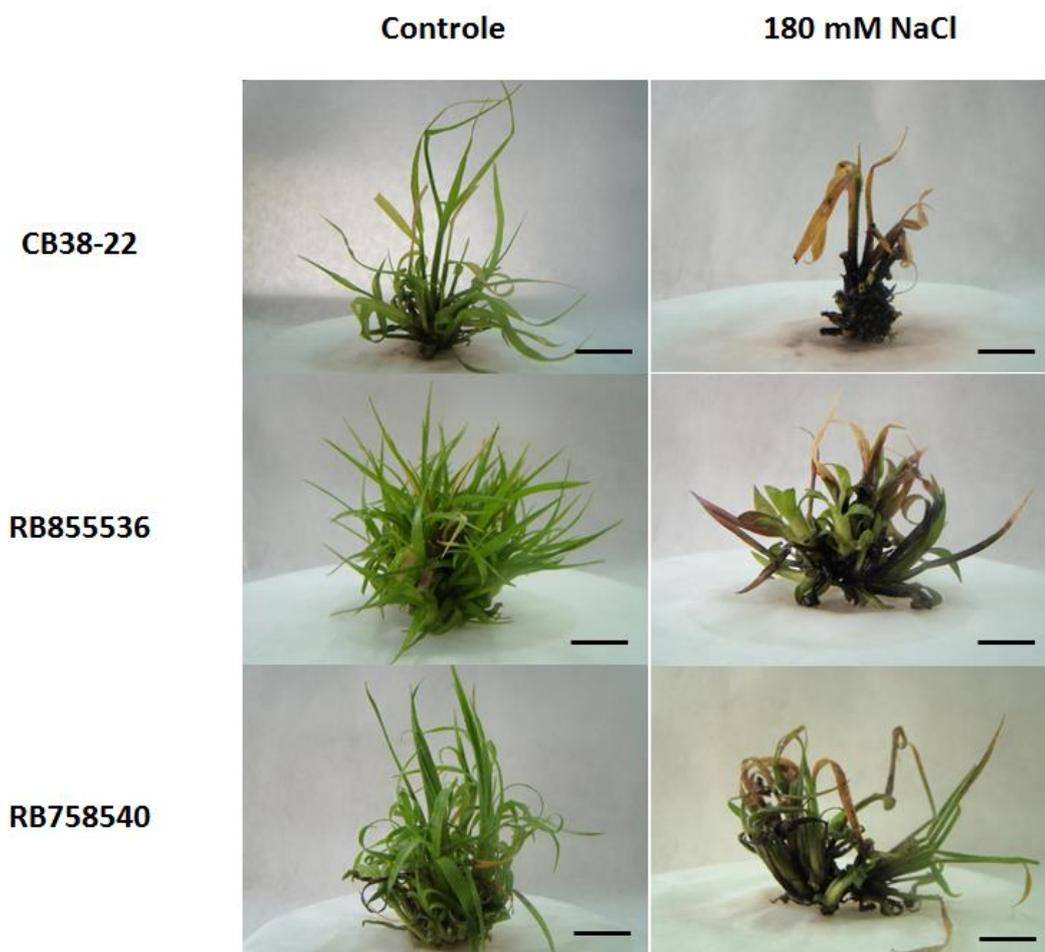


Figura 1: Aspectos morfológicos de plantas micropropagadas de cana de açúcar, das variedades CB38-22, RB855536 e RB758540 multiplicadas em meio líquido MS, submetidas às concentrações de 0 (controle) e 180 mM de NaCl. Barra = 0,75cm.

A alta concentração de NaCl no meio afetou diretamente o crescimento e desenvolvimento das cultivares, principalmente a cultivar CB38-22 que apresentou uma diminuição maior que 50% na biomassa fresca e 28% na biomassa seca, enquanto para as cultivares RB855536 e RB758540 o crescimento foi menos afetado sob estresse salino (Figura 2A e 2B). Adicionalmente, diante da análise da biomassa fresca e biomassa seca, estima-se uma diminuição significativa no teor de água durante o estresse salino em todas as cultivares, sendo essa perda de água mais intenso na cultivar CB38-22 em relação aos demais cultivares, visto que esse cultivar apresentou um decréscimo no teor de água superior a 50% (Figura 2C).

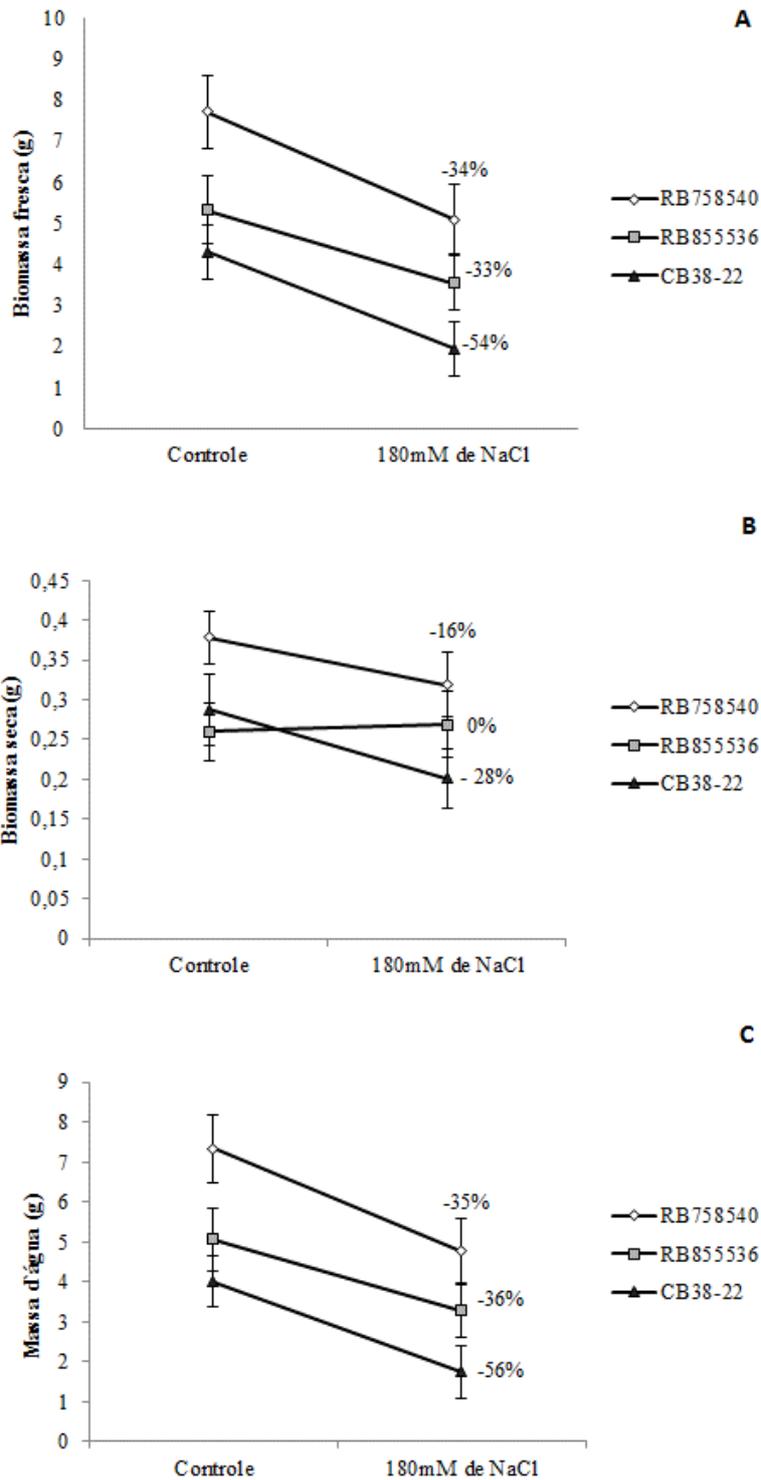
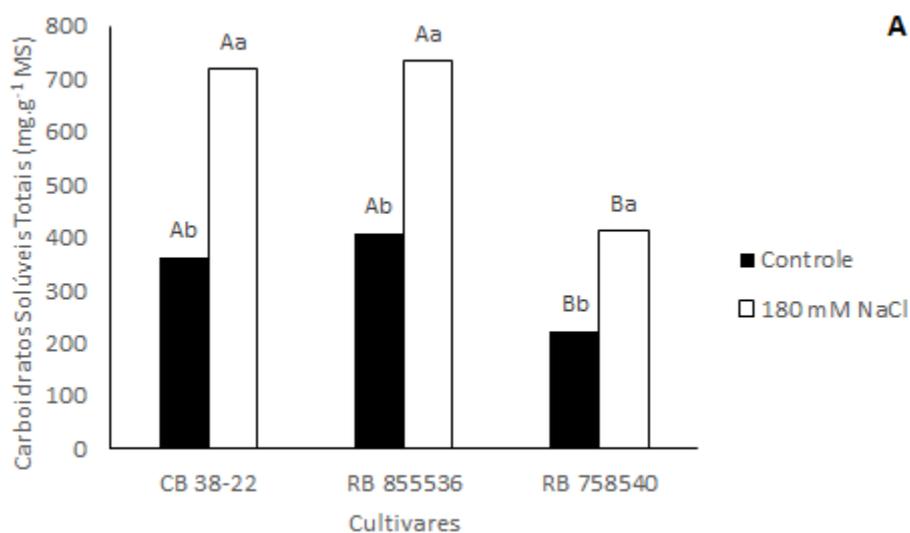


Figura 2: Análise de biomassa fresca (A), biomassa seca (B) e teor de água (C) de plantas micropropagadas de cana de açúcar, das variedades CB38-22, RB855536 e RB758540 multiplicadas em meio líquido MS, submetidas às concentrações de 0 (controle) e 180 mM de NaCl.

4.2. Avaliação do conteúdo endógeno de carboidratos

Após vinte dias submetidas ao estresse salino, foi realizada uma análise quantitativa do conteúdo endógeno de carboidratos. Diante dos experimentos realizados foi possível observar um aumento significativo no conteúdo de carboidratos solúveis totais, em todas as cultivares (Figura 3A). Adicionalmente, o conteúdo de amido foi avaliado nas diferentes cultivares, revelando que nas cultivares CB38-22 e RB758540 a concentração de amido foi superior quando submetidas à 180 mM de NaCl em relação ao tratamento controle. Em contrapartida, a cultivar a RB855536 não apresentou diferenças significativas nos diferentes tratamentos (Figura 3B).



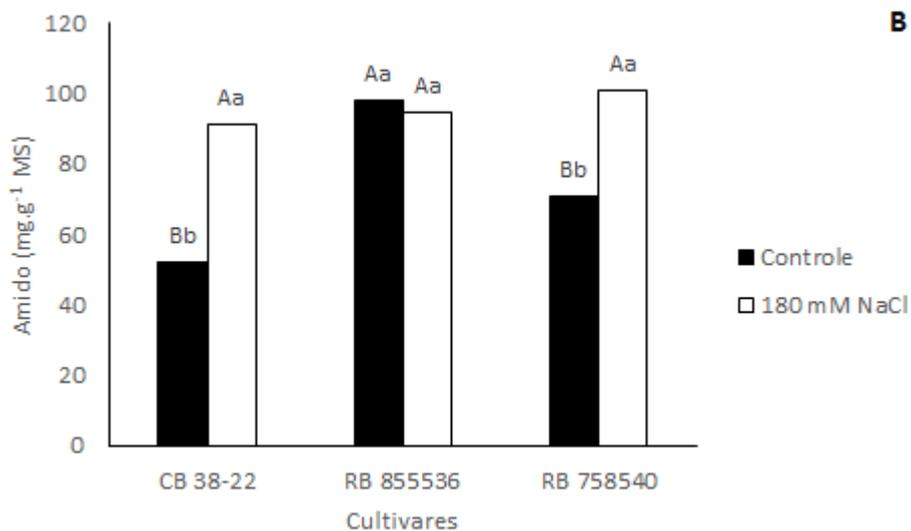


Figura 3: Concentração endógena de carboidratos solúveis totais (A) e amido (B) de plantas micropropagadas de cana de açúcar, das variedades CB38-22, RB855536 e RB758540 multiplicadas em meio líquido MS, submetidas às concentrações de 0 (controle) e 180 mM de NaCl. (Diferentes letras demonstram diferenças significativas pelo teste SNK, $p < 0,05$; Letras maiúsculas representam diferenças entre cultivares e letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos dentro da cultivar; Carboidratos Solúveis Totais: CV: 6,82%; Amido: 18,12%; $n = 4$).

No presente estudo foi possível identificar e quantificar três carboidratos solúveis (Figura 4). Os três cultivares utilizados nos experimentos apresentaram um aumento na concentração de sacarose quando submetidos ao estresse salino (Figura 4C). Em contrapartida, em relação as hexoses, foram observadas diferenças nas respostas entre as cultivares. A cultivar RB855536 não apresentou variação na concentração de glicose e frutose enquanto a cultivar CB38-22 aumentou a concentração dos dois carboidratos no tratamento com 180 mM de NaCl e a cultivar RB758540 aumentou a concentração de frutose quando submetida ao estresse salino (Figuras 4A e 4B). Ressalta-se que, diferentemente do encontrado para frutose, a análise estatística não apresentou interação entre os fatores para glicose e sacarose, sendo assim foi realizado teste média de forma isolada em cada cultivar, para esses dois carboidratos.

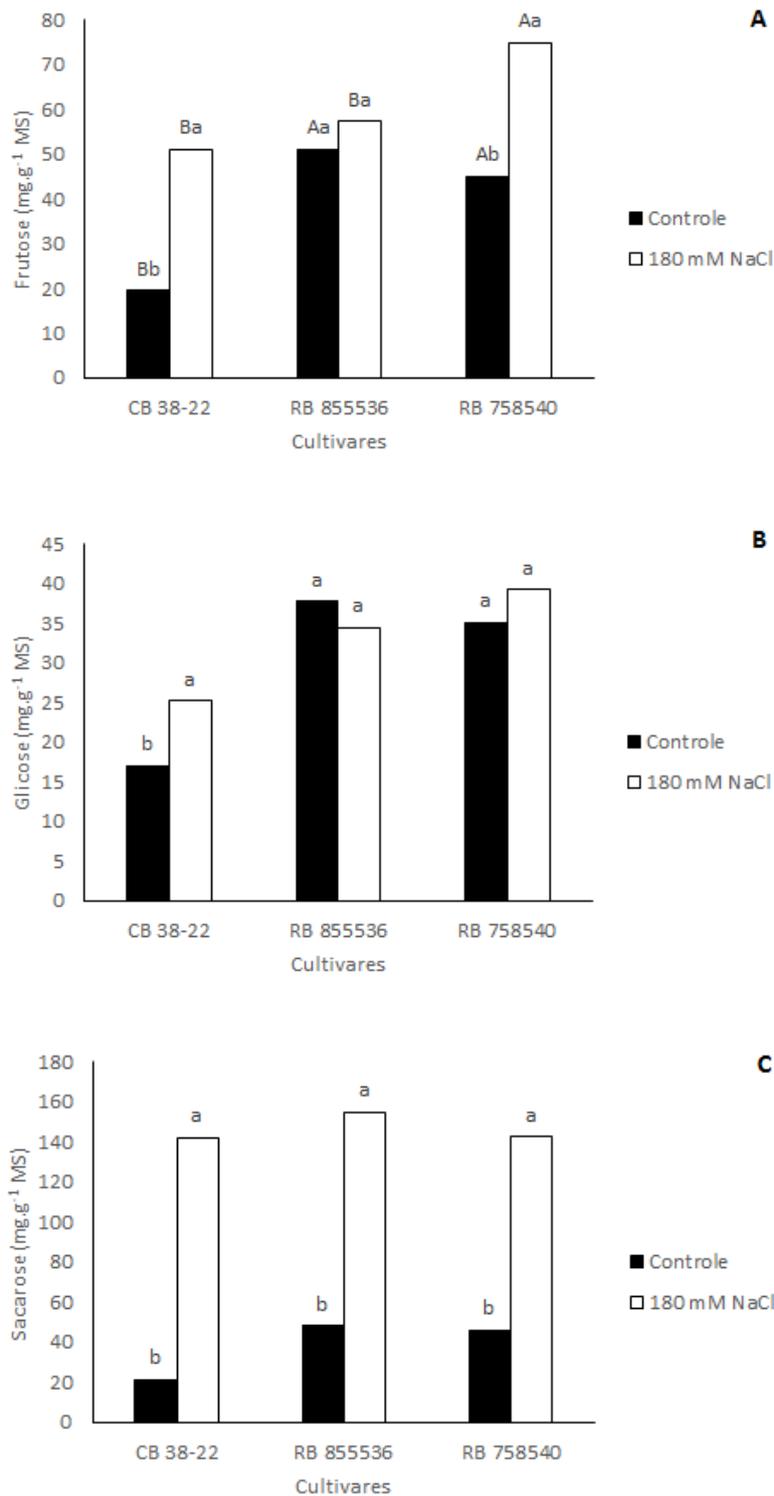


Figura 4: Concentração endógena de carboidratos solúveis, frutose (A), glicose (B) e sacarose (C) (mg.g^{-1}) de plantas micropropagadas de cana de açúcar, das variedades CB38-22, RB855536 e RB758540 multiplicadas em meio líquido MS, submetidas às concentrações de 0 (controle) e 180 mM de NaCl (Diferentes letras demonstram diferenças significativas pelo teste SNK, $p < 0,05$; Letras maiúsculas representam diferenças entre as cultivares e letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos dentro da cultivar; Frutose: CV: 14,03%; Glicose: CV_{CB38-22}: 8,59%; CV_{RB855536}: 14,89%; CV_{RB758540}: 19,15%; Sacarose: CV_{CB38-22}: 28,08%; CV_{RB855536}: 12,70%; CV_{RB758540}: 12,22%; n = 4).

4.3. Avaliação do conteúdo endógeno de poliaminas

Assim como a análises do conteúdo endógeno de carboidratos, as PAs foram identificadas e quantificadas em plantas das três cultivares testadas submetidas ao estresse salino. Diante dos experimentos realizados foi possível observar uma diminuição significativa na concentração das PAs totais nas cultivares CB38-22 e RB758540, em contrapartida a cultivar RB855536 apresentou valores semelhantes em relação ao conteúdo endógeno de PAs totais em ambos os tratamentos (Figura 5).

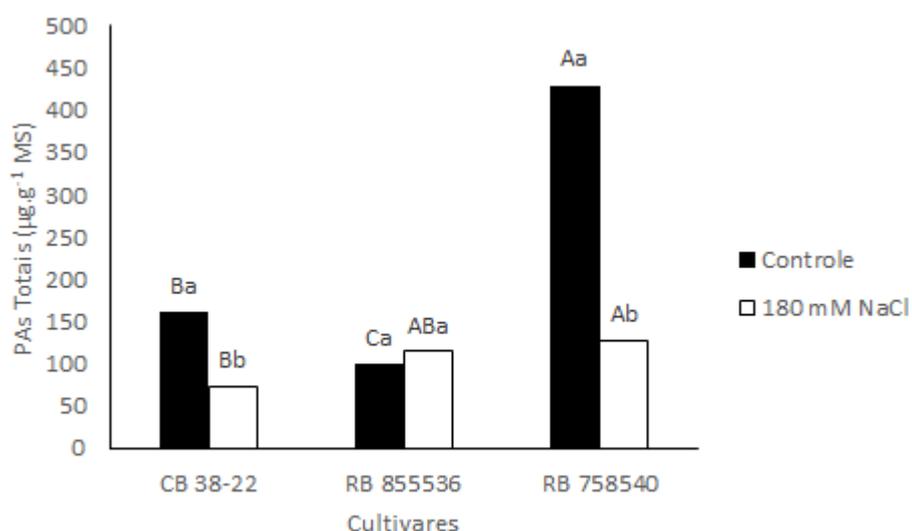
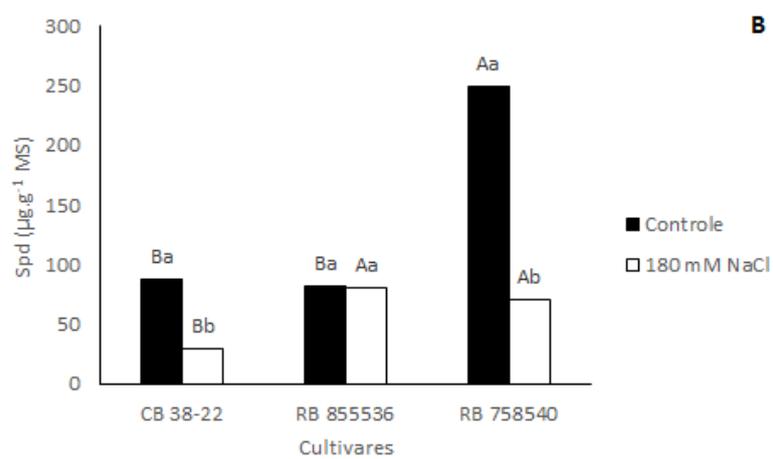
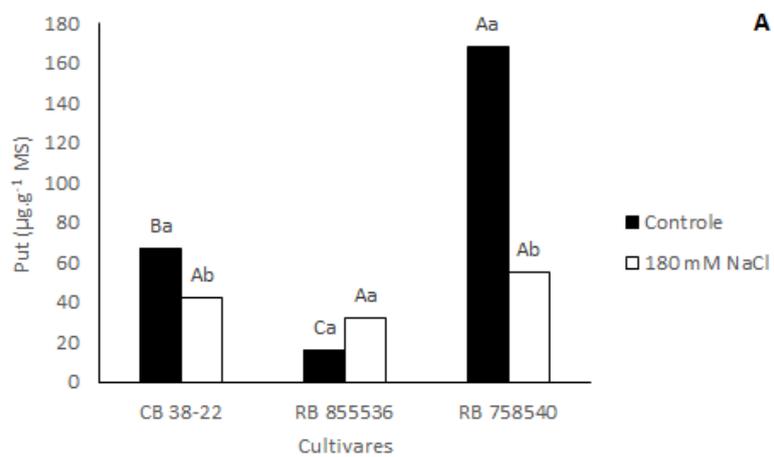


Figura 5: Concentração endógena de PAs totais de plantas micropropagadas de cana de açúcar, das variedades CB38-22, RB855536 e RB758540 multiplicadas em meio líquido MS, submetidas às concentrações de 0 (controle) e 180 mM de NaCl. (Diferentes letras demonstram diferenças significativas pelo teste SNK, $p < 0,05$; Letras maiúsculas representam diferenças entre as cultivares e letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos dentro da cultivar; CV: 17,53%; $n = 4$).

No presente estudo, observou-se que as concentrações das diferentes PAs (Put, Spd e Spm) foram diferentes entre as cultivares. Em relação à cultivar RB855536 as diferentes PAs se mantiverem constantes em ambos os tratamentos (Figuras 6A, 6B e 6C). Em contrapartida nas cultivares CB38-22 e RB758540 observou-se uma diminuição significativa na concentração intracelular em todas as PAs quando submetidas a 180 mM de NaCl (Figuras 6A, 6B e 6C). Adicionalmente foi possível observar que a concentração de Spd,

quando submetidos ao estresse salino, foi maior nas cultivares RB855536 e RB758540 em relação à cultivar CB38-22 (Figura 6B).



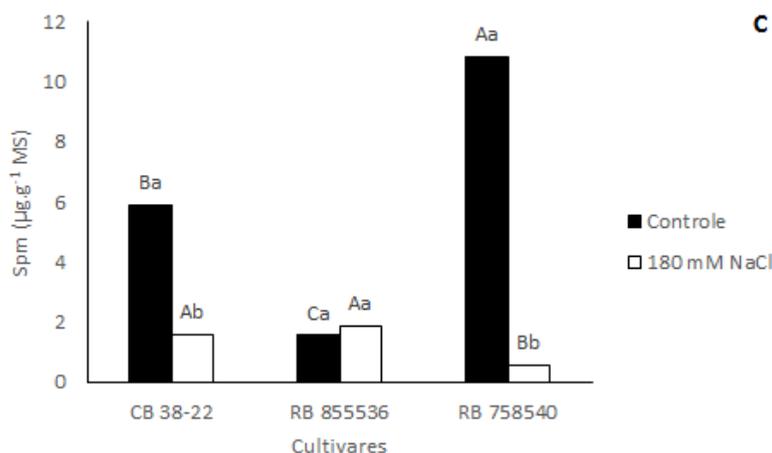
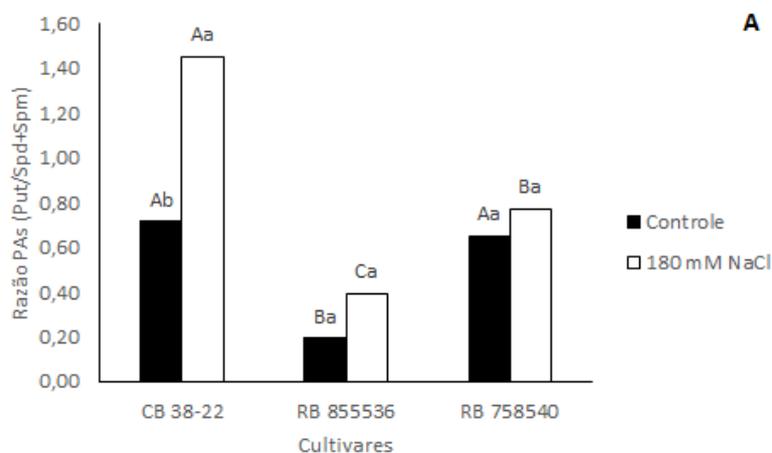


Figura 6: Concentração endógena de Put (A), Spd (B) e Spm (C) de plantas micropropagadas de cana de açúcar, das variedades CB38-22, RB855536 e RB758540 multiplicadas em meio líquido MS, submetidas às concentrações de 0 (controle) e 180 mM de NaCl. (Diferentes letras demonstram diferenças significativas pelo teste SNK, $p < 0,05$; Letras maiúsculas representam diferenças entre as cultivares e letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos dentro da cultivar; Put: CV: 20,89%; Spd: CV: 19,07%; Spm: CV: 17,44%; $n = 4$).

Diante da variação no conteúdo endógeno de cada PA, foi possível observar que a cultivar RB855536 apresentou uma maior concentração de Spd+Spm em relação a Put, em contrapartida a cultivar CB38-22, no tratamento com 180 mM de NaCl, apresentou um acúmulo de Put em relação a Spd e Spm. A cultivar RB758540, assim como a cultivar RB855536, apresentou a razão Spd+Spm/Put semelhante tanto no tratamento controle como sob estresse salino (Figura 7A e 7B).



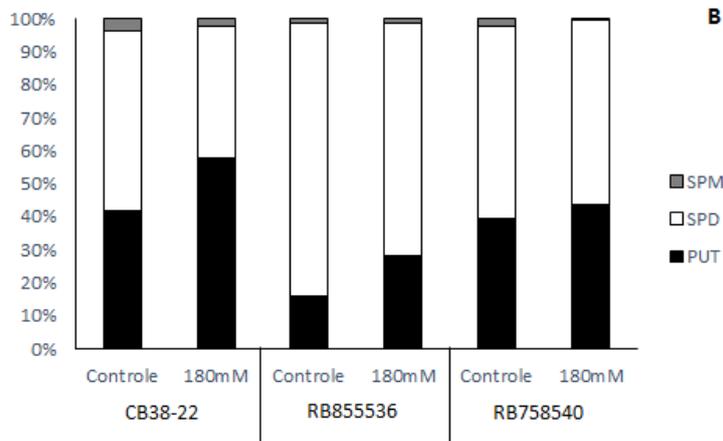


Figura 7: Razão entre Spd+Spm/Put (A) e concentração endógena de Put, Spd e Spm (B) de plantas micropropagadas de cana de açúcar, das variedades CB38-22, RB855536 e RB758540 multiplicadas em meio líquido MS, submetidas às concentrações de 0 (controle) e 180 mM de NaCl. (Diferentes letras demonstram diferenças significativas pelo teste SNK, $p < 0,05$; Letras maiúsculas representam diferenças entre as cultivares e letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos dentro da cultivar; Razão: CV: 24,69%; $n = 4$).

4.4. Análise proteômica

As cultivares de cana-de-açúcar foram submetidas a diferentes concentrações de NaCl e posteriormente foi realizada a análise do proteômica nos dois tratamentos. Em relação a quantificação das proteínas totais observou-se que as cultivares RB855536 e RB758540 apresentaram valores semelhantes em ambos os tratamentos, no entanto a cultivar CB38-22 apresentou uma queda significativa no conteúdo endógeno de proteínas na presença de NaCl (Figura 8). Ressalta-se que a análise estatística não apresentou interação entre os fatores para o conteúdo de proteínas solúveis totais, sendo assim foi realizado teste média de forma isolada em cada cultivar.

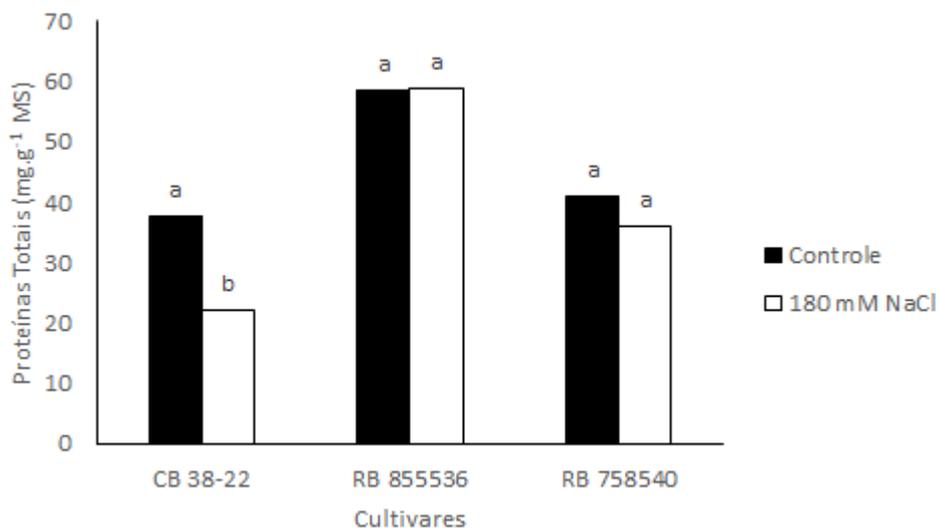


Figura 8: Concentração de proteínas totais (mg.g⁻¹) de plantas micropropagadas de cana de açúcar, das variedades CB38-22, RB855536 e RB758540 multiplicadas em meio líquido MS, submetidas às concentrações de 0 (controle) e 180 mM de NaCl. (Diferentes letras demonstram diferenças significativas pelo teste SNK, $p < 0,05$; Letras maiúsculas representam diferenças entre as cultivares e letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos dentro da cultivar; $CV_{CB38-22}$: 18,24%; $CV_{RB855536}$: 22,27%; $CV_{RB758540}$: 37,73%; $n = 4$).

Para a identificação das proteínas expressas, foram selecionados as cultivares que apresentaram o melhor e o pior desempenho sob estresse salino, o RB855536 e CB38-22 respectivamente. Sendo assim, foi possível identificar em média 1234 proteínas na cultivar CB38-22 e 1107 na cultivar RB855536, sendo que a maioria das proteínas foram expressas tanto no tratamento controle como sob estresse salino em ambas cultivares. As proteínas foram separadas de acordo com a expressão diferencial, em 3 principais grupos: Down-reguladas, expressão inalterada e up-reguladas. Foram consideradas proteínas down-reguladas as proteínas que apresentaram uma expressão igual ou maior que duas vezes no tratamento controle em relação ao tratamento com 180 mM de NaCl, enquanto que as proteínas consideradas up-reguladas foram expressas duas vezes ou mais no tratamento com 180 mM de NaCl em relação ao tratamento controle. Sendo assim as proteínas consideradas down e up reguladas foram então submetidas à análise funcional utilizando a plataforma blast2go. Diante da análise funcional das proteínas identificou-se os principais grupos de proteínas que foram regulados durante o estresse salino em ambas cultivares como proteínas relacionadas com metabolismo primário, metabolismo

de nitrogênio, transporte, resposta à estímulos, entre outros. Ressalta-se que, de acordo com os resultados obtidos, os diferentes cultivares apresentaram uma resposta semelhante quando comparados com os tratamentos controle. (Figura 9).

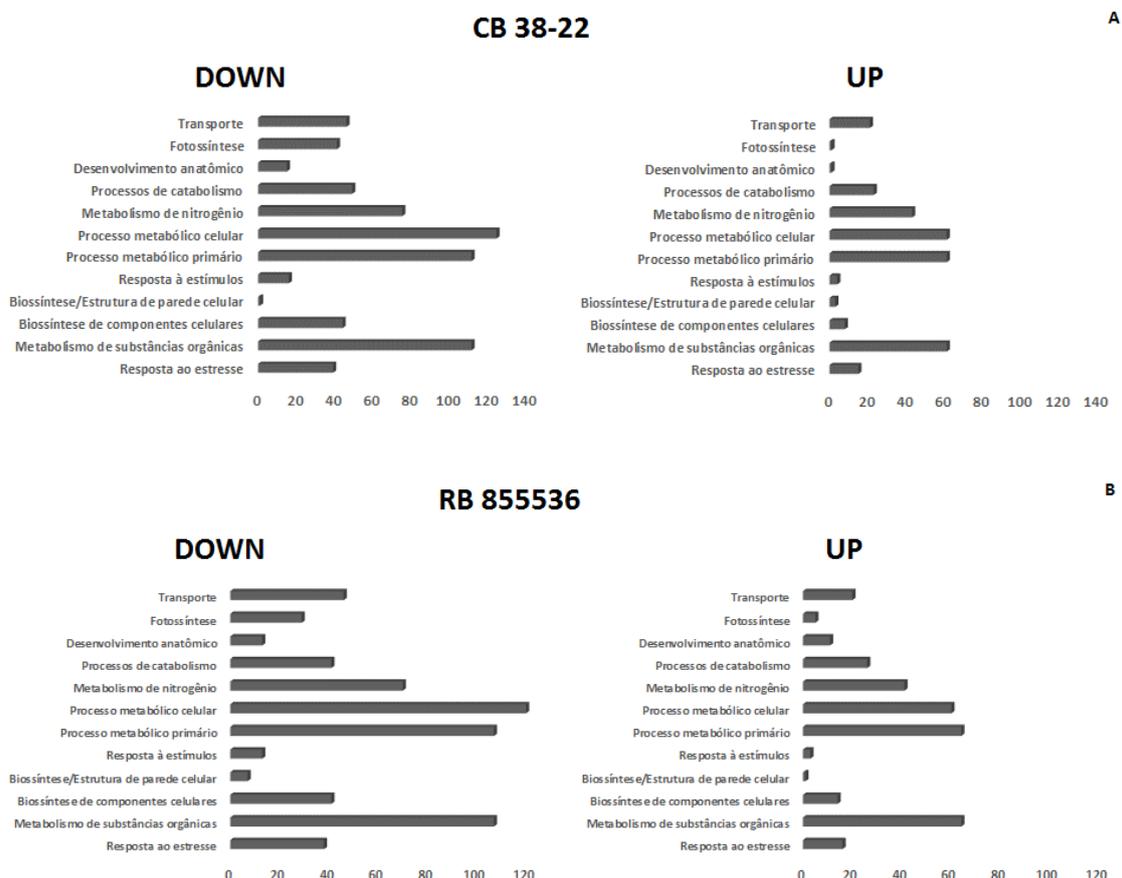


Figura 9: Análise funcional das proteínas identificadas utilizando a plataforma blast2go, indicando os principais grupos de proteínas regulados durante o estresse salino nas cultivares CB38-22 (a) e RB855536 (b). Proteínas down-reguladas: Menos expressas sob estresse salino quando comparado ao controle. Proteínas up-reguladas: Mais expressas sob estresse salino quando comparado ao controle.

Dentre esses grupos mais regulados nas duas cultivares, destaca-se principalmente as proteínas envolvidas no processo fotossintético e proteínas de resposta a estresses, sendo esses dois grupos intimamente relacionados com a resposta a estresses abióticos. As principais proteínas reguladas nesses grupos são discriminadas na tabela 1, o qual demonstra que ocorreu uma diminuição tanto na concentração de proteínas relacionadas com o aparato fotossintético

como nas peroxidases durante o estresse salino quando comprado com o tratamento controle. Em contrapartida as proteínas HSP foram acumuladas quando as cultivares foram submetidos à concentração de 180 mM de NaCl.

Tabela 1: Proteínas relacionadas com a resposta ao estresse abiótico, diferencialmente reguladas entre o tratamento controle e estresse salino.

Acesso	Nome	Condição up-regulada
Fotossíntese		
SCACLR2022A04	Subunidade IV - fotossistema I	Controle
SCSBHR1051G02	Subunidade II - fotossistema I	Controle
SCUTSB1076D12	Proteína 11Kd - fotossistema II	Controle
SCBGST3104H11	Proteína 23Kd - fotossistema II	Controle
SCACLR1129A11	Subunidade n - fotossistema I	Controle
SCCCLR1001F08	Subunidade III - fotossistema I	Controle
Proteínas Heat-Shock		
SCCCLR1079D09	HSP 70	Estresse salino
SCSFAD1108A11	HSP	Estresse salino
SCEZAD1C01H05	HSP - parcial	Estresse salino
SCJFRT2055B05	HSP 90	Estresse salino
Peroxidases		
SCCCT2002H08	apx3 - Peroxissomal Ascorbato Peroxidase	Controle
SCCCCL3002E11	Peroxidase 14 precursor - Classe III	Controle
SCJFLR1035D05	Peroxidase	Controle
SCSGHR1069A02	Peroxidase 70-like	Controle

No presente estudo, as cultivares CB38-22 e RB855536 apresentaram uma resposta semelhante durante o estresse salino quando comparados ao controle, no entanto, o contraste realizado entre os dois cultivares sob estresse salino revelou importantes grupos de proteínas foram regulados, podendo essas proteínas estarem diretamente relacionadas com a maior tolerância ao estresse salino. As proteínas foram separadas de acordo com a expressão diferencial, em 3 principais grupos: Down-reguladas, expressão inalterada e up-reguladas. Foram consideradas proteínas down-reguladas as proteínas que apresentaram uma expressão igual ou maior que duas vezes na cultivar CB38-22 em relação à cultivar RB855536 ambos sob estresse salino, enquanto que as proteínas consideradas up-reguladas foram expressas duas vezes ou mais na cultivar RB855536 em relação à cultivar CB38-22 ambos sob estresse salino. Sendo assim as proteínas consideradas down e up reguladas foram então submetidas à análise funcional utilizando a plataforma blast2go. Diante da análise funcional das proteínas, os principais grupos regulados foram: Resposta ao estresse;

Metabolismo energético; Metabolismo de macromoléculas; Metabolismo de nitrogênio; Metabolismo de carboidratos; Transporte; Metabolismo de pequenas moléculas; Expressão gênica (Figura 10).

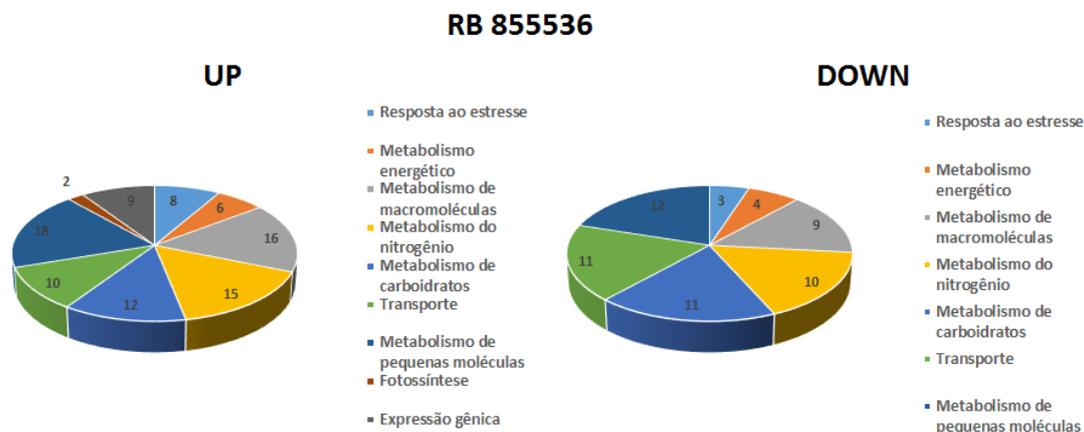


Figura 10: Principais grupos de proteínas regulados entre as cultivares CB38-22 e RB855536 durante o estresse salino. (Valores em cada grupo representa o número de sequencias de proteínas em cada grupo).

Nesse contexto, as principais proteínas reguladas em ambas cultivares sob estresse salino estão discriminadas nas tabelas 2 e 3, visando uma maior compreensão das vias metabólicas reguladas durante o processo.

Tabela 2: Proteínas relacionadas com a resposta ao estresse abiótico, diferencialmente reguladas. Principais proteínas mais expressas na cultivar RB855536 em relação à cultivar CB38-22.

Acesso	Nome	Função	Peptídeos	Score
Resposta ao estresse				
SCCCLB1001F01	Glutamina Sintetase	Resposta ao estresse; Resposta hiperosmótica; Transporte de H ⁺	4	28,0097
SCCCLR1048H09	Catalase cata	Resposta ao estresse; Resposta ao H ₂ O ₂	33	367,2613
SCSGRT2062D07	Isoforma 1 Peroxidase 52	Resposta ao estresse; Atividade oxirredutase	3	28,9274
SCEPRZ3046G10	Zeaxantina cloroplástica	Resposta ao estresse; Fotossíntese; Metabolismo energético	3	17,991
SCCART1002B11	Proteína Induzida por Jasmonato	Resposta ao estresse; Defesa	4	27,6491
SCQSST3116B04	qltg3-1	Resposta ao estresse	1	12,64
Metabolismo de Proteínas				
SCEPRZ1009C02	Proteína Ribossomal 60s I18	Síntese de proteínas; Transcrição	7	44,7867
SCJLLR1054F11	Proteína Ribossomal 40s s12	Síntese de proteínas; Transcrição	2	12,3628
SCEZLR1031E05	Proteína Ribossomal 50s I5	Síntese de proteínas; Transcrição	3	23,2272
SCCCLR1C05C08	Proteína Ribossomal 60s I27	Síntese de proteínas; Transcrição	4	26,6862
SCEQSD2074C06	Proteína Ribossomal 60s p3	Síntese de proteínas; Transcrição	2	13,2898
SCVPRZ2037B05	Proteína Ribossomal 40s s3a	Síntese de proteínas; Transcrição	3	22,5177
SCSBSD1058H12	Proteína Ribossomal 50s I12-1	Síntese de proteínas; Transcrição	3	32,9158
SCCCCL3003D04	Fator de alongamento 2	Síntese de proteínas; Transcrição	6	66,2651
Metabolismo Energético				
SCCCRZ2C01D08	Proteína de Ligação a ATP	Transporte de íons; Atividade kinase	3	16,4107
SCCCCL1001C10	Vacuolar ATPase - subunidade b	Transporte transmembranar; Transporte de íons	23	189,188
Metabolismo de Carboidratos				
SCQGAM2027G09	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Geração de energia; Atividade oxirredutase	6	57,8571
SCEQRT1033D02	Hidroxipiruvato redutase	Processo catabólico; Atividade oxirredutase	1	6,587
SCBGRT3014F08	TPA: Triosefosfato isomerase	Resposta ao estresse; Processo catabólico; Metabolismo de lipídios	9	78,1318
SCUTAM2089E05	Beta - amilase	Processo catabólico; Atividade hidrolase	3	22,9696
SCCCRZ1004B07	Didrolipoil desidrogenase - like	Homeostase; Metabolismo de aminoácidos	1	5,2588
Transporte				
SCCCRZ2002A07	Proteína relacionada-ras Ric2	Transdução de sinal; Atividade GTPase	5	30,2809
SCEPAM1023B01	Transportador do tipo ABC	Transportador transmembrana; Atividade ATPase; Resposta ao estresse	3	15,317
SCCCLR1048F06	Proteína de transferência de fosfolipídio	Ligação de lipídios	5	40,9502
SCVPST1061H08	Aquaporina pip2-1	Transporte de água; Homeostase osmótica; Atividade de canal hídrico	2	15,8768
Síntese de Flavonóides				
SCEPAM1053F09	Chalcone Isomerase	Processo de biossíntese; Atividade isomerase; Resposta ao estresse	1	5,2281

Tabela 3: Proteínas relacionadas com a resposta ao estresse abiótico, diferencialmente reguladas. Principais proteínas mais expressas na cultivar CB38-22 em relação à cultivar RB855536.

Acesso	Nome	Função	Peptídeos	Score
Resposta ao estresse				
SCVPRT2073B08	Proteína relação-patógeno	Resposta ao estresse; Defesa	8	63,7114
SCEPSD1007C11	Proteína relação-patógeno classe I	Resposta ao estresse; Defesa	1	5,8307
Metabolismo de Proteínas				
SCVPRZ2038C12	Poliubiquitina isoforma 1	Transporte vacuolar; Segmentação de proteínas	8	65,2047
SCCCRZ3002G10	Cistatina	Atividade regulatória de enzimas	4	39,4701
SCBFRZ2016G12	Proteína Ribossomal 60s I10-3	Síntese de proteínas; Transcrição	6	41,6709
SCCCST1004A07	Serina kinase	Atividade kinase; Metabolismo de aminoácidos	2	11,6719
Metabolismo Energético				
SCSFRT2069D09	PPase-dependente de fosfofrutokinase subunidade alfa	Ligação de íons; Metabolismo energético	2	22,5699
SCCCLR1C01D07	Ppase - inorganico	Ligação de íons; Metabolismo energético	4	29,7905
Metabolismo de Carboidratos				
SCCCRT2004A03	Beta - Glucanase	Atividade hidrolase	4	25,8712
SCEQRT1026E05	Precursor Beta - Glucanase	Atividade ATPase; Atividade hidrolase	14	137,4331
SCEZHR1049B08	Alfa - Glucano Sintase	Síntese de celulose; Organização da parede celular	12	109,1717
SCMCAM2084F02	Hexokinase 5	Processo glicolítico	1	6,2205
SCAGLR1043H05	Alfa-manosidase - Ligação com ion cálcio	Atividade nucleotidiltransferase	1	5,5876
Organização de Cromossomos				
SCJFRZ2010B03	Histona h1	Ligação com DNA; Organização de cromossomos	4	27,4283
SCCCLR1048F07	Histona h2a	Ligação com DNA; Organização de cromossomos	4	40,1251
SCCCRZ1004C05	Histona h4	Ligação com DNA; Organização de cromossomos	10	109,7896
Transporte				
SCRFSD1022D08	Provável transportador de fosfato mir1	Transporte transmembranar	2	10,6839
SCCCLB1024B10	Carreador de fosfato mitocondrial	Resposta ao estresse salino; Transporte	6	34,9547

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos Fisiológicos

Diante dos resultados obtidos, observou-se que as cultivares RB855536 e RB758540 apresentem uma maior tolerância ao estresse salino em comparação à cultivar CB38-22. De acordo com Diamante (1967), a cultivar RB758540 é conhecida por apresentar uma maior tolerância à estresses abióticos, especialmente em estresse hídrico. No entanto, conforme dados apresentados no presente estudo a cultivar RB855536 apresentou o melhor desempenho quando submetida ao estresse salino, embora considerada pelos produtores rurais com susceptível aos estresses abióticos (Figura 1).

A cultivar CB38-22, produzida através de programas de melhoramento da década de 50, é caracterizada principalmente por sua produtividade, amadurecimento tardio e crescimento em solos médios a férteis (Ridesa, 2010). Atualmente, não existem evidências científicas a respeito da resistência ou susceptibilidade aos estresses abióticos. Sendo assim, de acordo com os resultados obtidos, sugere-se que essa cultivar não apresente alta tolerância ao estresse salino, sendo indicado a utilização em condições favoráveis ao crescimento e desenvolvimento vegetal.

Estudos utilizando diferentes espécies revelam que o desenvolvimento da parte aérea é limitado em plantas susceptíveis ao estresse abiótico quando submetidas à essas condições adversas. Diferentemente das plantas susceptíveis, as plantas consideradas tolerantes, mesmo em condições de estresse abiótico o crescimento permanece totalmente ou parcialmente inalterado (de Abreu et al., 2008; Amara et al., 2013). Nesse sentido, é possível sugerir uma possível diferença nos níveis de tolerância entre as cultivares testadas, indicando uma maior susceptibilidade ao estresse salino da cultivar CB38-22 em relação as demais.

Adicionalmente, a análise do teor de água nos diferentes cultivares reflete diretamente em sua capacidade de sobrevivência ao estresse salino, nesse sentido as cultivares RB855536 e RB758540 se mostraram mais eficientes evitando a perda excessiva de água, diferentemente do apresentado pela cultivar CB38-22 (Figura 2).

De acordo com Aroca et al. (2001), a desidratação sob estresse abiótico é provocada principalmente pelo desbalanço ocorrido entre a absorção de água pela raiz e a taxa de transpiração. Nesse sentido, estudos revelam que, sob estresse abiótico, a maior capacidade em manter um alto teor de água nos tecidos é um importante mecanismo para sobreviver à condição adversa (Bouchabke-Coussa et al., 2008; Matsuo et al., 2009). Estudo recente conduzido em *Oryza sativa*, demonstra que o estresse salino provoca uma desidratação rápida nos tecidos, no entanto, o genótipo considerado tolerante ao estresse salino permanece com o teor de água semelhante ao apresentado no tratamento controle, principalmente através da maior atividade de aquaporinas (Mekawy et al., 2015). Nesse contexto, sugere-se que a maior desidratação apresentada na cultivar CB38-22 tenha sido um fator limitante para a tolerância desse cultivar ao estresse salino.

5.2. Carboidratos

Os carboidratos são importantes durante diferentes eventos do crescimento e desenvolvimento vegetal, principalmente através do controle da expressão de diferentes genes ao longo do desenvolvimento (Rolland et al., 2002). Estudos indicam para uma relação do metabolismo de carboidratos com diferentes estresses abióticos. De acordo com Seki et al. (2002), cerca de 31 genes envolvidos no metabolismo de carboidratos são alterados durante o estresse abiótico. Adicionalmente, resultados indicam que o acúmulo de carboidratos pode ser evento crucial para atingir a homeostase durante o estresse abiótico (Gupta e Kaur, 2005).

O acúmulo de carboidratos solúveis em plantas submetidas ao estresse salino foi verificado em diferentes espécies como *Hordeum vulgare* (Ahmad et al., 2006), *Sorghum bicolor* (Almodares et al., 2008), *Oryza sativa* L. (Thitisaksakul e Maysaya, 2008) e *Solanum melongena* L. (Abbas et al., 2010). De acordo com Siringam et al. (2013), o acúmulo de carboidratos solúveis é importante para o ajuste osmótico, diminuindo a perda da água durante o estresse salino. Adicionalmente, os carboidratos podem atuar protegendo macromoléculas importantes, que são severamente prejudicadas em condições de estresse salino (Sairam e Tyagi, 2004). Em contrapartida, estudos revelam que a concentração de amido sofre uma queda durante o estresse abiótico,

principalmente relacionando com a atividade de mobilização de reservas, resultando em um aumento na concentração de carboidratos solúveis (Basu et al., 2007; Ribeiro et al., 2014).

Nesse contexto, sugere-se que o acúmulo de carboidratos solúveis seja uma resposta inicial das plantas ao estresse salino, buscando a homeostase osmótica. Os resultados indicam também que o acúmulo de amido não seja favorável à sobrevivência ao estresse salino, sugerindo que a degradação do amido e conseqüentemente aumento da concentração de carboidratos solúveis seja mais importante na sobrevivência ao estresse salino (Figura 3).

No presente estudo observou-se um acúmulo de carboidratos solúveis, em especial um acúmulo de sacarose em todas as cultivares submetidos ao estresse salino (Figura 4). Resultados semelhantes foram observados em *Olea europaea* L. (Rejšková et al., 2007), *Oryza sativa* L. (Boriboonkaset et al., 2013b) e *Cucurbita pepo* L. (Palma et al., 2014), no qual foi observado principalmente um acúmulo no conteúdo de sacarose e uma queda na concentração de glicose e frutose ao longo do estresse abiótico. Para algumas plantas o acúmulo de glicose sob estresse abiótico pode estar relacionado com a defesa antioxidante, visto que a glicose participa de vias metabólicas importante, como na participação da síntese de compostos importantes como carotenoides e apresentam relação com a via de sinalização de ABA (Couée et al., 2006). A relação positiva entre os metabolismos de glicose e ABA pode ser importante durante o estresse abiótico uma vez que ambos apresentam um antagonismo com o metabolismo de etileno, participam da síntese de compostos importantes e regulam a expressão gênica de genes importantes durante o estresse (Arroyo et al., 2003; Shinozaki et al., 2003). No entanto, a concentração de glicose e frutose pode diminuir durante o estresse abiótico devido a atividade das principais enzimas de biossíntese e degradação de sacarose, aumentando conseqüentemente a concentração de sacarose em relação a concentração de hexose (Van den Ende e El-Esawe, 2014).

O acúmulo de sacarose durante o estresse abiótico é visto como uma importante ferramenta das plantas buscando a sobrevivência em ambientes desfavoráveis ao crescimento (Bolouri-Moghaddam et al., 2010). Estudos recentes revelam que mutações em enzimas de transporte da sacarose altera significativamente a tolerância ao estresse salino devido a alteração no

metabolismo de sacarose durante o estresse (Gong et al., 2015). De acordo com Van den Ende e El-Esawe (2014), a sacarose participa de vias metabólicas importantes visando a homeostase osmótica, principalmente através da síntese de frutanos e antocianinas. Antocianinas pertencem a uma classe de flavonoides que possuem, entre outras funções, a ação antioxidante durante o estresse abiótico, principalmente protegendo possíveis danos causados por ROS (Nagata et al., 2003). Já os frutanos, são polímeros de frutose e, em gramíneas e cereais, constituem a maior forma de armazenamento de carboidratos, principalmente em condições de estresse abiótico (Hinch et al., 2002; Kerepesi et al., 2002; Chalmers et al., 2005). Estudos sugerem que os frutanos são capazes de neutralizar o estresse oxidativo causado pelo estresse salino, especialmente através da diminuição da concentração intracelular de ROS (van Arkel et al., 2013).

Nesse contexto, sugere-se que o metabolismo de sacarose seja importante durante o estresse salino, principalmente relacionando esse composto com a vias de homeostase osmótica. Sendo assim, indica-se que o acúmulo de sacarose seja uma resposta das plantas visando minimizar os efeitos oxidativos causados pelo aumento da concentração salina. Em resumo, foi possível determinar uma regulação do metabolismo de carboidratos em cana-de-açúcar sob estresse salino, sugerindo que as alterações nesse metabolismo são respostas iniciais das plantas visando a homeostase osmótica e conseqüentemente a sobrevivência ao ambiente desfavorável, sugerindo que o acúmulo de carboidratos solúveis totais e de sacarose são importantes ferramentas da cana-de-açúcar visando o aumento da tolerância ao estresse salino.

5.3. Poliaminas

Assim como o metabolismo de carboidratos, a alteração no metabolismo de PAs é sugerido como uma importante ferramenta das plantas para tolerar o estresse salino, visto que as PAs atuam na proteção da integridade de membranas durante o estresse osmótico, sendo essa uma via importante para a sobrevivência nesses ambientes (Krasensky e Jonak, 2012). Estudos revelam que em diferentes espécies, o estresse salino promove uma regulação do metabolismo de PAs afetando diretamente a concentração endógenas das

principais PAs em plantas, sendo que o efeito é variado entre as espécies, nos quais alguns estudos demonstram um aumento na concentração das PAs totais em contrapartida outros indicam uma diminuição na concentração total desses compostos durante o estresse salino (Maiale et al., 2004; Liu et al., 2008; Sudhakar et al., 2015). No presente estudo observou-se que as cultivares CB38-22 e RB758540 apresentaram uma diminuição no conteúdo endógeno de PAs enquanto que o RB855536 não sofreu variação sob estresse salino (Figura 5).

Recentes estudos demonstram que durante o estresse abiótico diferentes enzimas relacionadas com a biossíntese e degradação das PAs são reguladas em diferentes momentos (Tiburcio et al., 2014; Yin et al., 2014). De acordo com Gupta et al. (2013), sob estresse salino tanto enzimas de biossíntese como de catabolismo das PAs são reguladas, especialmente a ADC1 (arginina descarboxilase), SPMS (espermina sintase), PAO (poliamina oxidase) e DAO (diamina oxidase). A importância das principais enzimas relacionadas com a biossíntese e catabolismo de PAs foi comprovada através de estudos utilizando diferentes mutantes para essas enzimas que demonstram uma maior susceptibilidade ao estresse salino quando essas enzimas apresentaram uma menor expressão e atividade (Soyka e Heyer, 1999; Yamaguchi et al., 2006).

A regulação das enzimas de biossíntese e catabolismo de PAs promove diferentes efeitos nas plantas durante o estresse salino, como por exemplo a regulação do catabolismo das PAs promove um acúmulo de NO (óxido nítrico) e GABA (γ - ácido aminobutírico), sendo ambas moléculas relacionadas com a tolerância ao estresse salino em plantas (Ruan et al., 2004; Guo et al., 2012; Gupta et al., 2013). Adicionalmente a regulação enzimática promove também uma diferença na concentração das principais PAs durante o estresse salino. Embora algumas espécies apresentem um acúmulo de Put em relação a Spd e Spm, na maioria dos estudos ocorre um acúmulo de Spd e Spm em relação a Put (Liu et al., 2008; Parvin et al., 2012; Sudhakar et al., 2015).

A dinâmica na concentração endógenas das diferentes PAs é um fator importante para a tolerância ou susceptibilidade das plantas ao estresse salino. Estudos realizados com *Vitis vinifera L.* demonstraram que sob estresse salino ocorre inicialmente um acúmulo de Put e posteriormente ocorre um acúmulo de Spd e Spm, sendo essas variações promovidas através da regulação das principais enzimas de biossíntese das diferentes PAs (Liu et al., 2011). Essas

variações na concentração das PAs, especialmente o acúmulo de Spd e Spm é, há um longo tempo, considerado importante para a tolerância ao estresse salino (Krishnamurthy e Bhagwat, 1989; Krishnamurthy, 1991). A importância da Spd e Spm para a tolerância ao estresse salino é demonstrada tanto pela adição exógena como pela deficiência ou superexpressão dessas PAs em *Oryza sativa* L. (Roy e Wu, 2002), *Nicotiniana tabacum* (Waie e Rajam, 2003) e *Cucumis sativus* L. (Li, B. et al., 2011). Segundo Parvin et al. (2012), plântulas de *Panax ginseng* submetidas ao estresse salino apresentaram um acúmulo de Spm e Spd e uma queda na concentração de Put. Resultados semelhantes foram obtidos em *Mesembryanthemum crystallinum* L. e *Malus sylvestris* L., sugerindo que as poliaminas Spd e Spm possam ser importantes para a tolerância ao estresse salino (Liu et al., 2008; Shevyakova et al., 2013).

A aquisição da tolerância ao estresse salino deve-se, entre outros fatores, na capacidade de realizar homeostase iônica e osmótica, sendo que as PAs são descritas importantes em ambos processos (Gupta et al., 2013). Segundo Roy et al. (2005), a importância da Spd e Spm é devido ao seus grupos aminas, visto que quanto mais cargas positivas maior a afinidade com as membranas celulares. Estes autores descreveram que a Spm e Spd, tetramina e triamina respectivamente, possuem mais afinidade com as membranas celulares em relação à diamina Put. Adicionalmente, estudos revelam a participação das PAs em eventos importantes para a aquisição da tolerância ao estresse abiótico, como na regulação da atividade de canais iônicos e na regulação da atividade de enzimas antioxidantes (Cheng et al., 2009; Janicka-Russak et al., 2010).

A regulação da atividade dos canais iônicos é vista como uma das mais importantes etapas para a aquisição da tolerância ao estresse salino, principalmente na manutenção de altos níveis de K^+ em relação ao Na^+ (Shabala e Pottosin, 2014). Estudo recente demonstra que durante o estresse abiótico as PAs atuam na regulação dos canais iônicos em diferentes espécies (Pottosin e Shabala, 2014). Segundo Roy et al. (2005), o aumento de Spd durante o estresse salino em *Oryza sativa* é fundamental para a diminuição na concentração intracelular de Na^+ e conseqüentemente aumentando a concentração de K^+ . A diminuição na concentração intracelular de Na^+ pode estar envolvida com uma relação existente entre os metabolismos de PAs e ABA, sendo essa relação

importante para a compartimentalização vacuolar de Na⁺ durante o estresse (Zhu, 2003; Alcazar et al., 2010).

O metabolismo antioxidante é uma etapa crucial para a sobrevivência das plantas sob estresse salino. Esse metabolismo é regulado principalmente pela ação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPX), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR) (Gupta e Huang, 2014). Estudos demonstram que as PAs regulam a atividade dessas enzimas durante o estresse salino em diferentes espécies como *Cucumis sativus L.* (Duan et al., 2008; Kubis, 2008), *Oryza sativa* (Jang et al., 2012) e *Pistacia vera L.* (Kamiab et al., 2014). De acordo com Shu et al. (2013), a aplicação exógena de Spm em *Cucumis sativus L.* sob estresse salino proporcionou um aumento na atividade das enzimas SOD e APX e conseqüentemente resultou na diminuição da peroxidação lipídica, causada principalmente pelo radical H₂O₂.

Nesse contexto, sugere-se que as PAs (principalmente Spd e Spm) apresentem um papel importante na aquisição da tolerância ao estresse salino. Sendo assim, no presente estudo foi possível observar o maior conteúdo endógeno de Spd + Spm em relação ao de Put na cultivar RB855536, oposto do apresentado pela cultivar CB38-22, sugerindo que a concentração endógena das diferentes PAs pode ser um fator crucial para a maior tolerância ao estresse salino em cana-de-açúcar (Figuras 6 e 7).

5.4. Proteômica

Adicionalmente as análises bioquímicas, as alterações no proteoma durante o estresse abiótico estão sendo exploradas de forma mais intensa nos últimos anos, fornecendo importantes a respeito da aquisição da tolerância ao estresse em diferentes espécies como *Oryza sativa* (Lee et al., 2009), *Glycine max L.* (Cheng et al., 2010), *Zea mays L.* (Pechanova et al., 2013) e *Hordeum vulgare L.* (Ashoub et al., 2013). A concentração de proteínas totais durante o estresse abiótico pode variar entre espécies e cultivares, sendo que em algumas espécies o conteúdo é mantido sem diferenças significativas enquanto que outras espécies apresentam uma queda na concentração durante o estresse (Zhou et al., 2012; Ahmed et al., 2013). Embora a concentração de proteínas totais seja importante, a compreensão de quais os principais grupos de proteínas

regulados durante o estresse pode fornecer informações importantes a respeito dos mecanismos de tolerância das plantas. De acordo com Timperio et al. (2008) a identificação das proteínas reguladas durante o estresse é importante para elucidar as vias metabólicas envolvidas na aquisição da tolerância ao estresse abiótico, sugerindo a importância da identificação das principais proteínas envolvidas nos processos.

No presente estudo observou que ambas cultivares, sob estresse salino, apresentaram grupo de proteínas regulados de forma semelhante, destacando-se principalmente três desses grupos que estão relacionados diretamente com a resposta ao estresse abiótico, as proteínas relacionadas com a fotossíntese, as HSPs e as peroxidases (Figura 9).

As proteínas relacionadas com a fotossíntese estão entre as mais reguladas durante o estresse salino e hídrico, sendo principalmente observado uma queda significativa na concentração dessas proteínas sob estresse (Chaves et al., 2009). Recentes estudos indicam que, sob estresse salino, ocorre principalmente uma regulação na expressão das proteínas que participam dos fotossistemas I e II, conseqüentemente afetando diretamente o funcionamento normal do aparato fotossintético (Capriotti et al., 2014; Liu et al., 2014). Segundo Li, X.-J. et al. (2011), o aumento na expressão de proteínas de outras vias metabólicas, como a via glicolítica, é importante para suprir a demanda por energia durante o estresse abiótico, visto que a diminuição da expressão das proteínas do maquinário fotossintético ocorre em diferentes espécies sob estresse abiótico, afetando principalmente a produção de energia durante o estresse.

Assim como as proteínas relacionadas com a fotossíntese, as peroxidases também foram mais expressas no tratamento controle em relação a condição de estresse salino em ambas cultivares. As peroxidases possuem a principal função de sequestrar ROS, participando diretamente das vias de tolerância ao estresse abiótico, no entanto a maior atividade dessas proteínas varia de acordo com as espécies e com o nível de tolerância apresentado (Rodziewicz et al., 2014). Estudo realizado com *Pisum sativum* revelou que sob estresse salino apenas a SOD apresentou uma maior atividade enquanto que as demais enzimas antioxidantes mantiveram uma atividade semelhante ou mais baixa que apresentado no controle (Kav et al., 2004). Nesse contexto, sugere-se

que outras enzimas antioxidantes possam apresentar uma maior atividade e serem mais importantes para a tolerância ao estresse salino em cana-de-açúcar que as peroxidases.

Diferentemente dos outros grupos, as HSPs foram mais expressas durante o estresse salino em ambas cultivares, especialmente a HSP70 e HSP90. Esses dados corroboram com estudos demonstrando que as HSPs são uma das principais classes de proteínas reguladas durante diferentes estresses abióticos (Timperio et al., 2008). Segundo Ireland et al. (2004), a HSP70 podem ser consideradas como biomarcadores de diferentes estresses abióticos, entre eles o estresse salino. A importância dessas proteínas durante o estresse salino é reconhecida através da regulação de eventos fisiológicos importantes, como a cadeia de transporte de elétrons, sugerindo que as HSPs podem ser cruciais para a sobrevivência ao estresse abiótico (Timperio et al., 2008).

Diante da análise das proteínas diferencialmente expressas em ambas cultivares sob estresse salino observou-se os principais grupos de proteínas regulados. Nesse sentido, dentro desses grupos, destaca-se 7 classes de proteínas reguladas e que apresentam direta relação com a tolerância ao estresse salino, I) Resposta ao estresse; II) Metabolismo de proteínas; III) Metabolismo energético; IV) Metabolismo de carboidratos; V) Transporte; VI) Histonas; VII) Síntese de flavonoides (Figura 10). Semelhante ao apresentado no presente trabalho, estudo recente conduzido em *Hordeum vulgare* identificou que sob estresse salino as principais proteínas reguladas estão envolvidas em processos de detoxificação, metabolismo de carboidratos e metabolismo de proteínas (Mostek et al., 2015). Esses autores sugerem que a expressão diferencial de proteínas nesses grupos pode fornecer informações importantes a respeito da tolerância ao estresse salino.

5.4.1. Resposta ao estresse

No presente estudo foi possível observar um maior acúmulo de proteínas envolvidas na resposta ao estresse na cultivar RB855536 em relação ao CB38-22. Dentre essas proteínas destaca-se a maior expressão de proteínas sequestradoras de ROS, como proteínas da família peroxidase e principalmente a catalase. As ROS são comuns durante o desenvolvimento vegetal, porém sob

estresses abióticos ocorre um aumento na produção dessas moléculas provocando um desbalanceamento em relação aos mecanismos antioxidantes, evidenciando que a capacidade de produzir enzimas antioxidantes é importante para a sobrevivência sob o estresse abiótico (Gill e Tuteja, 2010). Dentre as enzimas antioxidantes a catalase é considerada como uma das principais enzimas responsáveis pela quebra de H_2O_2 em H_2O e O_2 (Polidoros e Scandalios, 1999). Recente estudo demonstrou que dois genótipos *Cicer arietinum* L. (SKUA-06 – tolerante ao estresse salino; SKUA-03 – sensível ao estresse salino) submetidos ao estresse salino apresentaram um aumento na expressão de CAT, no entanto o genótipo tolerante apresentou uma maior expressão e atividade quando comparado com genótipo sensível, sugerindo que a expressão e atividade de CAT pode estar diretamente relacionada com o aumento da tolerância ao estresse salino (Rasool et al., 2013).

Adicionalmente as enzimas antioxidantes, outras proteínas também foram mais expressas na cultivar RB855536 em relação ao CB38-22 como glutamina sintetase (GS) e zeaxantina cloroplástica (ZE). A GS é uma enzima chave do processo do metabolismo de nitrogênio, semelhante ao papel da Rubisco para o metabolismo de carbono (Teixeira e Pereira, 2007). Resultados demonstram que a superexpressão da GS sob estresse salino aumenta a taxa de fotorrespiração e de assimilação de amônia, sugerindo que essa enzima pode ser utilizada em engenharia genética visando o aumento na produtividade em ambientes com alta concentração de sal no solo (Hoshida et al., 2000; Teixeira e Fidalgo, 2009). A ZE é uma enzima importante na síntese de carotenoides, sendo esses importantes para os mecanismos antioxidantes sob estresse abiótico (Zhang, Q. Y. et al., 2012). Segundo Park et al. (2008), a ZE está diretamente ligada as vias de sinalização de ABA, sendo assim, seus mecanismos sob estresse salino estão aliados aos de ABA como no controle da abertura estomática e no controle de genes regulados por ABA. Adicionalmente a atividade da ZE está associada com o funcionamento do aparato fotossintético, podendo ser importante durante o estresse salino, especialmente na proteção ao fotossistema II (Qiu et al., 2003).

Por fim, destaca-se duas das proteínas mais reguladas sob estresse salino, sendo que a proteína induzida por jasmonato (PIJ) foi a mais expressa em RB855536 em relação a CB38-22, enquanto que a *qltg3-1* foi expressa somente na cultivar RB855536, ressaltando que ambas proteínas estão

diretamente relacionadas com tolerância ao estresse abiótico em diferentes espécies. O jasmonato é uma importante molécula envolvida na regulação de diferentes eventos do desenvolvimento vegetal, principalmente participando da defesa das plantas a estresses bióticos e abióticos (Wasternack, 2007). Nesse mesmo estudo sugere-se, através da análise proteômica, que a regulação na expressão das PIJ está relacionada com a ação desse composto nos diferentes eventos fisiológicos. Recente estudo demonstra que as PIJ apresentam uma íntima relação com as proteínas da família DELLA e conseqüentemente com a sinalização de ABA (Wild et al., 2012). Segundo Gollack et al. (2014), a interação das sinalizações de jasmonato e ABA é uma importante via para mecanismos de tolerância ao estresse salino em plantas. Além das proteínas PIJ, a *qltg3-1*, encontrada somente na cultivar RB855536, pode ser uma via importante regulada visto sua interação com a defesa a estresses abióticos, principalmente em *Oryza sativa* (Fujino e Matsuda, 2010; Fujino e Sekiguchi, 2011). A *qltg3-1* é expressa através de genes denominados QTLs, sendo esses diretamente controlados por diferentes estresses abióticos (Fujino et al., 2008). Embora a *qltg3-1* esteja relacionada principalmente com a tolerância a baixas temperaturas sugere-se, diante dos resultados obtidos no presente trabalho, que sua maior expressão pode regular vias metabólicas importante durante o estresse salino em cana-de-açúcar.

Nesse contexto, a maior expressão de proteínas relacionadas com estresse na cultivar RB855536 em relação CB38-22 pode ser um fator chave na aquisição de uma maior tolerância ao estresse salino, devido a diferentes vias metabólicas que podem ser reguladas por essas proteínas.

5.4.2. Metabolismo de proteínas

As plantas quando submetidas ao estresse abióticos sofrem diferentes danos bioquímicos que afetam o seu desenvolvimento. Entre os danos causados a alteração no conteúdo de proteínas é de fundamental importância para a sobrevivência, visto a necessidade de degradar as proteínas que foram danificadas, ou que são desnecessários no momento. Em contrapartida à degradação, sob estresse abiótico grupos de proteínas necessitam ser formadas para a sobrevivência à condição adversa (Vítámvás et al., 2012). Nesse sentido sugere-se que, na cultivar RB855536, o aumento da expressão de proteínas

importantes na síntese de novas proteínas, como as proteínas ribossomais e fator de alongamento, podem ser importantes na formação de proteínas cruciais para a sobrevivência ao estresse salino. Adicionalmente a cultivar CB38-22 apresentou uma maior expressão em proteínas inibidoras de proteases, como a cistatina, sugerindo que a degradação de proteínas ineficientes pode ter sido prejudicada durante o estresse salino, afetando a aquisição da tolerância desse cultivar. Recentes estudos corroboram com os resultados obtidos, sugerindo que o aumento na expressão das proteínas principalmente relacionadas com a síntese de novas proteínas é importante para diferentes estresses abióticos (Agrawal et al., 2014; Rai et al., 2014).

5.4.3. Metabolismo energético

A regulação do metabolismo energético é fundamental para a sobrevivência a diferentes estresses abióticos, em especial ao estresse salino na qual, principalmente através da atividade das ATPase de membrana plasmática (P-ATPase) e ATPase de vacúolo (V-ATPase), é importante para manter a homeostase iônica na células (Li et al., 2014; Sobreira et al., 2014). Estudo realizado em *Chloris virgata* demonstrou que o estresse salino promoveu um aumento na expressão de ChvPMA que afetou diretamente a atividade de P-ATPase, aumentando sua atividade e permitindo uma maior sobrevivência ao ambiente salino (Zhang et al., 2014).

As V-ATPases são consideradas as mais importantes durante o estresse salino, principalmente associando a sua atividade com a compartimentalização do íon Na^+ no vacúolo (Fukuda et al., 2004). Sendo assim, sugere-se que a maior expressão da subunidade b da V-ATPase na cultivar RB855536 pode ser importante para a maior tolerância apresentada. A cultivar CB38-22 apresentou uma menor expressão de V-ATPase durante o estresse salino, no entanto apresentou uma maior expressão das pirofosfatases de vacúolo (V-PPase) em relação à cultivar RB855536. Assim como as ATPases, as PPases também são muito importantes durante o estresse abiótico, sendo produzidas como alternativa para produção de energia sob estresse, uma vez que a atividade das ATPases pode ficar comprometida sob o estresse abiótico (Kabała e Kłobus, 2008). Segundo Wang et al. (2001), as V-ATPases e V-PPase são mais expressas e aumentam suas atividades durante o estresse salino, no entanto a

via principal de defesa das plantas é constituída da atividade da V-ATPase, sendo as V-PPase uma rota secundária para a sobrevivência, sugerindo que a maior atividade das V-ATPases está associada com um maior nível de tolerância do genótipo. Nesse contexto, sugere-se que a maior tolerância ao estresse salino apresentado pela cultivar RB855536 pode estar associado com uma maior expressão de V-ATPase e conseqüentemente uma maior compartimentalização de Na⁺ no vacúolo.

5.4.4. Metabolismo de carboidratos

As proteínas relacionadas com o metabolismo de carboidratos são reguladas de diferentes formas em diversas espécies. No presente trabalho, duas vias foram especialmente reguladas, a via da glicólise e o remodelamento de parede celular. Estudos revelam que a regulação das enzimas que participam da via da glicólise podem apresentar um aumento ou uma diminuição na expressão, variando de acordo com a espécie e o estresse abiótico submetido (Yan et al., 2005). No entanto, a maioria das análises indicam que as enzimas da via da glicólise, como a triosefosfato isomerase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, são acumuladas durante o estresse abiótico, principalmente visando uma maior produção de energia (Minhas e Grover, 1999; Yokthongwattana et al., 2012). Sendo assim, esses resultados corroboram com os dados obtidos em que a maior expressão dessas enzimas foi encontrada na cultivar RB855536, que apresentou uma maior tolerância ao estresse salino. Em contrapartida a cultivar CB38-22 apresentou uma maior expressão em proteínas da família das glucanases, na qual estão principalmente associadas com o remodelamento da parede celular. Segundo Hashimoto e Komatsu (2007), as glucanases são importantes proteínas de defesa contra estresses bióticos, sendo pouco eficientes nos mecanismos de defesa à variações ambientais. Nesse contexto, sugere-se que a maior expressão dessas proteínas sob estresse salino não é fundamental na aquisição da tolerância ao estresse.

5.4.5. Transporte

As proteínas de transportes são consideradas importantes durante o estresse abiótico, visando tanto a homeostase iônica como a osmótica. O estresse salino está completamente associado com a expressão de proteínas de

transporte, na qual diferentes proteínas são expressas e atuam em vias metabólicas importantes para a tolerância ao excesso de sal (Agarwal et al., 2013). No presente estudo as cultivares apresentaram diferentes proteínas de transportes expressas durante o estresse salino. As proteínas mais expressas na cultivar RB855536 estão principalmente relacionadas com a falta de absorção de água causada pelo excesso de sal no solo, como as aquaporinas e proteínas de transferência de fosfolipídios. As aquaporinas são importantes moléculas para o transporte de água nas células, nesse sentido estudos demonstram que sob estresses abióticos ocorre um acúmulo dessas proteínas, principalmente relacionando sua maior expressão com sua função no transporte de água diminuindo o estresse osmótico (Jang et al., 2004). Assim como as aquaporinas as proteínas de transporte de fosfolipídios também são reguladas durante estresses abióticos, no entanto a ação dessa proteína é mais relacionada com estresse por temperatura, não sendo expressa em outras espécies sob estresse salino (Yubero-Serrano et al., 2003).

Em contrapartida ao apresentado pela cultivar RB855536, a cultivar CB38-22 apresentou uma maior expressão principalmente em carreadores mitocondriais de fosfato. Segundo Laloi (1999), a atividade desses carreadores são importantes durante o estresse abiótico para o fornecimento de fosfato que servem de substrato para a fosforilação do ADP. Entretanto estudos realizados em *Arabidopsis thaliana* demonstrou que superexpressão desses carreadores foi prejudicial para a germinação de sementes sob estresse salino, sugerindo que a alteração no metabolismo energético é prejudicial para a tolerância ao estresse (Zhu et al., 2012).

5.4.6. Histonas

No presente estudo verificou que a cultivar CB38-22 aumentou a expressão de histonas sob estresse salino quando comparado à cultivar RB855536. Histonas são moléculas importantes no processo de condensação do DNA e por consequência atuam na regulação de diferentes genes alterando a ligação dos fatores de transcrição com o gene, impedindo ou não sua transcrição (Chabouté et al., 1993). Estudos demonstram que, sob estresses abióticos, tanto a expressão como as modificações nas histonas são alteradas podendo regular a expressão de genes importantes para a tolerância ao estresse

(Ascenzi e Gantt, 1997; Chinnusamy e Zhu, 2009). Análises das principais modificações em histonas durante o estresse salino forneceu informações importantes a respeito da regulação na expressão de genes, sugerindo que essas moléculas podem estar relacionadas com os mecanismos de tolerância das plantas (Golldack et al., 2011; Kim et al., 2015).

5.4.7. Síntese de flavonoides

Proteínas relacionadas com a síntese de flavonoides também foram regulados durante o estresse salino, no entanto, diferentemente das histonas elas foram mais expressas na cultivar RB855536 em relação ao CB38-22. A chalcone isomerase (CHI) é uma das principais enzimas nas vias de biossíntese de flavonoides e isoflavonoides em plantas (Nishihara et al., 2005). A antocianina, um dos flavonoides mais estudados, é considerada um metabólito secundário produzido pelas plantas principalmente sob variações ambientais, atuando como um mecanismo de defesa aos estresses abióticos (Hichri et al., 2011). Nesse sentido, a expressão da proteína CHI é importante para a sobrevivência sob estresses abióticos, sendo que sua expressão pode ser regulada por diferentes moléculas como a sacarose e ácido jasmônico durante o estresse (Morkunas et al., 2005; Dao et al., 2011). A regulação da expressão de CHI por sacarose foi demonstrada em *Vitis vinifera* (Vitrac et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (Teng et al., 2005) e *Vaccinium corymbosum* (Zheng et al., 2009), sugerindo que o acúmulo de sacarose, identificado nos três cultivares submetidos ao estresse salino no presente trabalho, pode estar relacionado com a regulação da expressão de CHI e conseqüentemente um acúmulo de flavonoides.

Adicionalmente, a ação dos flavonoides é dependente da presença em compartimentos celulares, sendo necessário a atividade de transportes específicos, como por exemplo os transportadores do tipo ABC que internalizam os flavonoides especialmente nos vacúolos, onde possuem papel fundamental nos mecanismos de defesa das plantas ao estresse abiótico (Agati et al., 2012). No presente estudo verificou-se uma maior expressão dos transportadores do tipo ABC na cultivar RB855536, sugerindo que a ação desses transportadores no transporte de flavonoides pode ter funcionado como uma ferramenta importante para a maior tolerância ao estresse salino.

5.5. Metabolismo Bioquímico durante o estresse salino em Cana-de-açúcar

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se possíveis rotas bioquímicas importantes para a aquisição da tolerância ao estresse salino em cana-de-açúcar (Figura 11). 1) O estresse salino provoca um acúmulo de carboidratos solúveis, em especial um acúmulo de sacarose. A sacarose acumulada na célula regula a expressão CHI e conseqüentemente promove um aumento na síntese de flavonoides. Os flavonoides podem atuar em diferentes compartimentos nas células, sendo o transporte nas células realizado principalmente por transportadores do tipo ABC, encaminhando os flavonoides para o interior dos vacúolos, sendo importantes durante o estresse salino; 2) O conteúdo de cada PA no interior das células é importante para a tolerância ao estresse salino, principalmente na manutenção de altos níveis de Spd+Spm em relação aos de Put. O acúmulo de Spd e Spm favorece a síntese e atividade de bombas de prótons, em especial as V-ATPases que possuem um papel fundamental na compartimentalização do íon Na^+ nos vacúolos. A maior atividade das V-ATPases é importante para uma maior concentração de H^+ no interior dos vacúolos, alterando o gradiente eletroquímico e ativando canais antiportes H^+/Na^+ , responsáveis por enviar Na^+ para dentro dos vacúolos e H^+ para o citosol; 3) Aumento na expressão de HSPs, em especial as HSP70 e HSP90; 4) Aumento na expressão de PIJ e ZE. A PIJ apresenta uma relação com as vias de sinalização das proteínas DELLA enquanto que a ZE é uma importante enzima na biossíntese de carotenoides. Nesse sentido ambos apresentam uma estreita relação com as vias de sinalização do ABA, ressaltando que o ABA é um importante hormônio na tolerância aos estresses abióticos; 5) Aumento na expressão de duas classes de proteínas importantes para a tolerância ao estresse salino. As catalases são mais expressas durante o estresse salino e são importantes principalmente no sequestro de ROS no interior das células, evitando os danos causados pelos mesmos. Já as proteínas ribossomais são importantes na síntese de novas proteínas que serão de fundamental importância para a tolerância ao estresse salino.

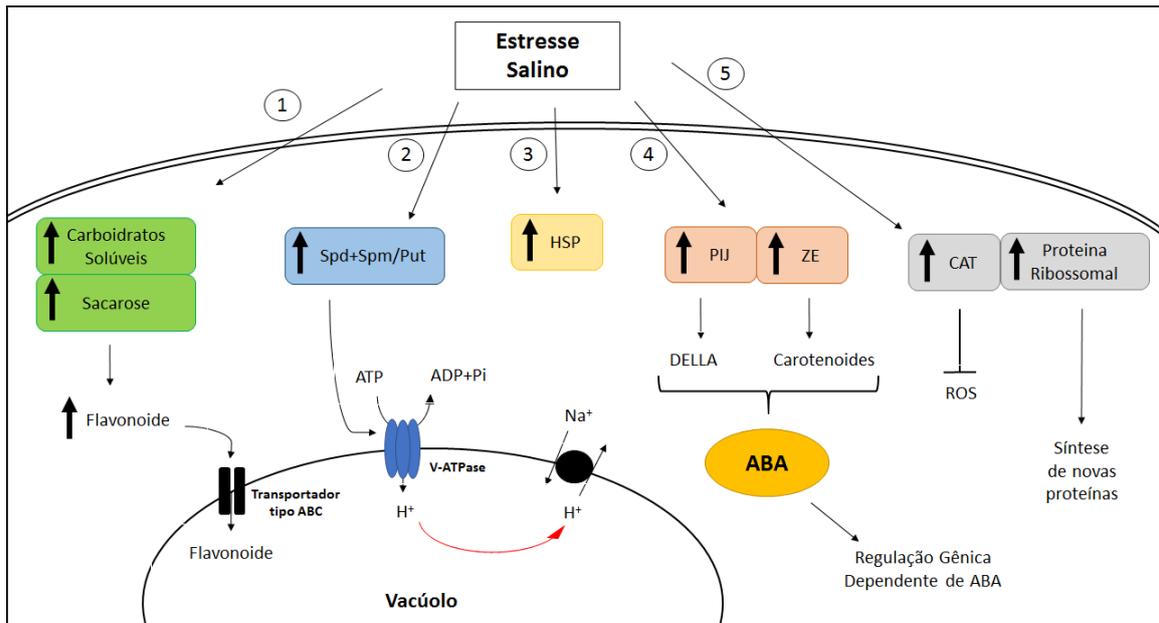


Figura 11: Esquema proposto de algumas das possíveis vias bioquímicas importantes para a aquisição da tolerância ao estresse salino em cana-de-açúcar. (Abreviações: ROS: espécies reativas de oxigênio; Proteínas DELLA: proteínas que apresentam um mesmo domínio altamente conservado; CAT: catalase; ZE: zeaxantina cloroplástica; PIJ: proteína induzida por jasmonato.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados podem-se obter as seguintes conclusões:

- Nas condições experimentais, a cultivar RB855536 apresentou uma maior tolerância ao estresse salino em relação as demais cultivares;
- Verificou-se que o estresse salino altera o metabolismo de PAs e carboidratos;
- Observou-se que sob estresse salino ocorre um acúmulo no conteúdo endógeno de carboidratos solúveis, especialmente de sacarose, como uma resposta comum entre as cultivares;
- Verificou-se que a maior concentração de Spd+Spm em relação a Put pode ser importante para a tolerância ao estresse salino em cana-de-açúcar;
- O acúmulo de enzimas antioxidantes, HSPs e transportadores específicos durante o estresse salino é um importante mecanismo de tolerância ao estresse salino;
- O aumento na expressão de bombas de prótons, principalmente V-ATPase, pode ser importante no processo de compartimentalização do íon Na^+ , e conseqüentemente importante para a sobrevivência sob estresse salino;
- Os resultados obtidos permitem sugerir rotas bioquímicas que possivelmente possam ser importantes na aquisição da tolerância ao estresse salino em cana-de-açúcar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, W.; Ashraf, M.; Akram, N. A. Alleviation of salt-induced adverse effects in eggplant (*Solanum melongena* L.) by glycinebetaine and sugarbeet extracts. **Scientia horticulturae**, v. 125, n. 3, p. 188-195; 2010.

Abreu, I. A.; Farinha, A. P.; Negrão, S.; Gonçalves, N.; Fonseca, C.; Rodrigues, M.; Batista, R.; Saibo, N. J.; Oliveira, M. M. Coping with abiotic stress: proteome changes for crop improvement. **Journal of proteomics**, v. 93, p. 145-168; 2013.

Agarwal, P. K.; Shukla, P. S.; Gupta, K.; Jha, B. Bioengineering for salinity tolerance in plants: state of the art. **Molecular biotechnology**, v. 54, n. 1, p. 102-123; 2013.

Agati, G.; Azzarello, E.; Pollastri, S.; Tattini, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67-76; 2012.

Agrawal, C.; Sen, S.; Singh, S.; Rai, S.; Singh, P. K.; Singh, V. K.; L.C., R. Comparative proteomics reveals association of early accumulated proteins in conferring butachlor tolerance in three N₂-fixing *Anabaena* spp. **Journal of Proteomics** v. 96, p. 271 - 290; 2014.

Agrawal, G. K.; Pedreschi, R.; Barkla, B. J.; Bindschedler, L. V.; Cramer, R.; Sarkar, A.; Renaut, J.; Job, D.; Rakwal, R. Translational plant proteomics: a perspective. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 15, p. 4588-4601; 2012.

Ahmad, M. S. A.; Ali, Q.; Bashir, R.; Javed, F.; Alvi, A. K. Time course changes in ionic composition and total soluble carbohydrates in two barley cultivars at seedling stage under salt stress. **Pak. J. Bot**, v. 38, n. 5, p. 1457-1466; 2006.

Ahmed, I. M.; Cao, F.; Han, Y.; Nadira, U. A.; Zhang, G.; Wu, F. Differential changes in grain ultrastructure, amylase, protein and amino acid profiles between Tibetan wild and cultivated barleys under drought and salinity alone and combined stress. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2743-2750; 2013.

Albrecht, G.; Biemelt, S.; Baumgartner, S. Accumulation of fructans following oxygen deficiency stress in related plant species with different flooding tolerances. **New phytologist**, v. 136, n. 1, p. 137-144; 1997.

Alcazar, R.; Altabella, T.; Marco, F.; Bortolotti, C.; Reymond, M.; Koncz, C.; Carrasco, P.; Tiburcio, A. F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. **Planta**, v. 231, n. 6, p. 1237-1249; 2010.

Alcázar, R.; Marco, F.; Cuevas, J. C.; Patron, M.; Ferrando, A.; Carrasco, P.; Tiburcio, A. F.; Altabella, T. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 23, p. 1867-1876; 2006.

Almodares, A.; Hadi, M.; Ahmadpour, H. Sorghum stem yield and soluble carbohydrates under different salinity levels. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 22; 2008.

Amara, I.; Capellades, M.; Dolores Ludevid, M.; Pages, M.; Goday, A. Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing LEA Rab28 gene. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 9, p. 864-873; 2013.

Anderson, K. Economic impacts of policies affecting crop biotechnology and trade. **New biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 558-564; 2010.

Aroca, R.; Tognoni, F.; Irigoyen, J. J.; Sánchez-Díaz, M.; Pardossi, A. Different root low temperature response of two maize genotypes differing in chilling sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1067-1073; 2001.

Arroyo, A.; Bossi, F.; Finkelstein, R. R.; León, P. Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 133, n. 1, p. 231-242; 2003.

Ascenzi, R.; Gantt, J. S. A drought-stress-inducible histone gene in Arabidopsis thaliana is a member of a distinct class of plant linker histone variants. **Plant molecular biology**, v. 34, n. 4, p. 629-641; 1997.

Ashoub, A.; Beckhaus, T.; Berberich, T.; Karas, M.; Brüggemann, W. Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress. **Planta**, v. 237, n. 3, p. 771-781; 2013.

Baginsky, S. Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. **Mass spectrometry reviews**, v. 28, n. 1, p. 93-120; 2009.

Balbuena, T. S.; Silveira, V.; Junqueira, M.; Dias, L. L. C.; Santa-Catarina, C.; Shevchenko, A.; Floh, E. I. S. Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 3, p. 337-352; 2009.

Barkla, B. J.; Vera-Estrella, R.; Pantoja, O. Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. **Proteomics**, v. 13, n. 12-13, p. 1801-1815; 2013.

Baron, K.; Stasolla, C. The role of polyamines during in vivo and in vitro development. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 44, n. 5, p. 384-395; 2008.

Basu, P.; Ali, M.; Chaturvedi, S. Osmotic adjustment increases water uptake, remobilization of assimilates and maintains photosynthesis in chickpea under drought. **Indian journal of experimental biology**, v. 45, n. 3, p. 261; 2007.

Bolouri-Moghaddam, M. R.; Le Roy, K.; Xiang, L.; Rolland, F.; Van den Ende, W. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. **Febs Journal**, v. 277, n. 9, p. 2022-2037; 2010.

Boriboonkaset, T.; Theerawitaya, C.; Yamada, N.; Pichakum, A.; Supaibulwatana, K.; Cha-um, S.; Takabe, T.; Kirdmanee, C. Regulation of some carbohydrate metabolism-related genes, starch and soluble sugar contents, photosynthetic activities and yield attributes of two contrasting rice genotypes subjected to salt stress. **Protoplasma**, p. 1-11; 2013a.

Boriboonkaset, T.; Theerawitaya, C.; Yamada, N.; Pichakum, A.; Supaibulwatana, K.; Cha-um, S.; Takabe, T.; Kirdmanee, C. Regulation of some carbohydrate metabolism-related genes, starch and soluble sugar contents, photosynthetic activities and yield attributes of two contrasting rice genotypes subjected to salt stress. **Protoplasma**, v. 250, n. 5, p. 1157-1167; 2013b.

Bouchabke-Coussa, O.; Quashie, M.-L.; Seoane-Redondo, J.; Fortabat, M.-N.; Gery, C.; Yu, A.; Linderme, D.; Trouverie, J.; Granier, F.; Téoulé, E. ESKIMO1 is a key gene involved in water economy as well as cold acclimation and salt tolerance. **BMC plant biology**, v. 8, n. 1, p. 125; 2008.

Bray, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant physiology**, v. 103, n. 4, p. 1035; 1993.

Bressan, R. A.; Park, H. C.; Orsini, F.; Oh, D.-h.; Dassanayake, M.; Inan, G.; Yun, D.-J.; Bohnert, H. J.; Maggio, A. Biotechnology for mechanisms that counteract salt stress in extremophile species: a genome-based view. **Plant biotechnology reports**, v. 7, n. 1, p. 27-37; 2013.

Capriotti, A. L.; Borrelli, G. M.; Colapicchioni, V.; Papa, R.; Piovesana, S.; Samperi, R.; Stampachiachiere, S.; Laganà, A. Proteomic study of a tolerant genotype of durum wheat under salt-stress conditions. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, n. 5, p. 1423-1435; 2014.

Chaboute, M.; Chaubet, N.; Gigot, C.; Philipps, G. Histones and histone genes in higher plants: structure and genomic organization. **Biochimie**, v. 75, n. 7, p. 523-531; 1993.

Chalmers, J.; Lidgett, A.; Cummings, N.; Cao, Y.; Forster, J.; Spangenberg, G. Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. **Plant Biotechnology Journal**, v. 3, n. 5, p. 459-474; 2005.

Chaves, M. M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551-60; 2009.

Chen, S.; Harmon, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, v. 6, n. 20, p. 5504-5516; 2006.

Chen, T. H.; Murata, N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. **Plant, cell & environment**, v. 34, n. 1, p. 1-20; 2011.

Cheng, L.; Gao, X.; Li, S.; Shi, M.; Javeed, H.; Jing, X.; Yang, G.; He, G. Proteomic analysis of soybean [*Glycine max (L.) Meer.*] seeds during imbibition at chilling temperature. **Molecular breeding**, v. 26, n. 1, p. 1-17; 2010.

Cheng, L.; Zou, Y.; Ding, S.; Zhang, J.; Yu, X.; Cao, J.; Lu, G. Polyamine accumulation in transgenic tomato enhances the tolerance to high temperature stress. **Journal of integrative plant biology**, v. 51, n. 5, p. 489-499; 2009.

Chinnusamy, V.; Zhu, J.-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 2, p. 133-139; 2009.

Cidade, D. A. D.; Garcia, R. D.; Duarte, A. C.; Sachetto-Martins, G.; Mansur, E. In vitro morphogenesis of Brazilian sugarcane varieties. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 385-391; 2006.

CONAB. 3º Levantamento Cana-de-açúcar Safra 2013/2014 - Dezembro 2013. 2013. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/> >. Acesso em: 05/02/2014.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar. 2015. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/> >. Acesso em: 11/03/2015.

Couée, I.; Sulmon, C.; Gouesbet, G.; El Amrani, A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 3, p. 449-459; 2006.

Dao, T.; Linthorst, H.; Verpoorte, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 397-412; 2011.

Dat, J.; Vandenabeele, S.; Vranova, E.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Van Breusegem, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 57, n. 5, p. 779-795; 2000.

de Abreu, C. E.; Prisco, J. T.; Nogueira, A. R.; Bezerra, M. A.; Lacerda, C. F. d.; Gomes-Filho, E. Physiological and biochemical changes occurring in dwarf-cashew seedlings subjected to salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 2, p. 105-118; 2008.

Diamante, U. Variedades de cana-de-açúcar vii-série de ensaios realizados no período de 1959 a 1962. **Bragantia: Boletim técnico da Divisão de experimentação e pesquisas, Instituto agrônômico**, v. 26, p. 197; 1967.

Dias, L. L. C.; Santa-Catarina, C.; Silveira, V.; Pieruzzi, F. P.; Floh, E. I. S. Polyamines, amino acids, IAA and ABA contents during *Ocotea catharinensis* seed germination. **Seed Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 42-51; 2009.

Duan, J.; Li, J.; Guo, S.; Kang, Y. Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. **Journal of plant physiology**, v. 165, n. 15, p. 1620-1635; 2008.

EMBRAPA. Sistema de Informação de Solos Brasileiros. 2014. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/solos> >. Acesso em: 03/07/2014.

Eveland, A. L.; Jackson, D. P. Sugars, signalling, and plant development. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 9, p. 3367-3377; 2012.

FAO. Feeding the world - Part 3. 2012. Disponível em: < <http://www.fao.org/home/en/> >. Acesso em: 05/02/2014.

Fariduddin, Q.; Mir, B. A.; Yusuf, M.; Ahmad, A. Comparative roles of brassinosteroids and polyamines in salt stress tolerance. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 7, p. 2037-2053; 2013.

Fatehi, F.; Hosseinzadeh, A.; Alizadeh, H.; Brimavandi, T.; Struik, P. C. The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley genotypes to long-term salinity stress. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 5, p. 6387-6397; 2012.

Fernández, J.-E. Understanding olive adaptation to abiotic stresses as a tool to increase crop performance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 103, p. 158-179; 2014.

Flexas, J.; Ribas-Carbó, M.; Bota, J.; Galmés, J.; Henkle, M.; Martínez-Cañellas, S.; Medrano, H. 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**, v. 172, n. 1, p. 73-82; 2006.

Folgado, R.; Panis, B.; Sergeant, K.; Renaut, J.; Swennen, R.; Hausman, J.-F. Differential Protein Expression in Response to Abiotic Stress in Two Potato Species: *Solanum commersonii* Dun and *Solanum tuberosum* L. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 3, p. 4912-4933; 2013.

Ford, K. L.; Cassin, A.; Bacic, A. Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. **Frontiers in plant science**, v. 2; 2011.

Fujino, K.; Matsuda, Y. Genome-wide analysis of genes targeted by qLTG3-1 controlling low-temperature germinability in rice. **Plant molecular biology**, v. 72, n. 1-2, p. 137-152; 2010.

Fujino, K.; Sekiguchi, H. Origins of functional nucleotide polymorphisms in a major quantitative trait locus, qLTG3-1, controlling low-temperature germinability in rice. **Plant molecular biology**, v. 75, n. 1-2, p. 1-10; 2011.

Fujino, K.; Sekiguchi, H.; Matsuda, Y.; Sugimoto, K.; Ono, K.; Yano, M. Molecular identification of a major quantitative trait locus, qLTG3-1, controlling low-temperature germinability in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 34, p. 12623-12628; 2008.

Fukuda, A.; Chiba, K.; Maeda, M.; Nakamura, A.; Maeshima, M.; Tanaka, Y. 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**, v. 55, n. 397, p. 585-594; 2004.

Gao, L.; Yan, X.; Li, X.; Guo, G.; Hu, Y.; Ma, W.; Yan, Y. Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). **Phytochemistry**, v. 72, n. 10, p. 1180-1191; 2011.

George, E. F.; Hall, M. A.; Klerk, G.-J. D. **Plant propagation by tissue culture: The background**. 3. Dordrecht: Springer, 2008. 501

Gill, S. S.; Tuteja, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930; 2010.

Gimeno, V.; Syvertsen, J. P.; Simón, I.; Nieves, M.; Díaz-López, L.; Martínez, V.; García-Sánchez, F. Physiological and morphological responses to flooding with fresh or saline water in *Jatropha curcas*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 78, p. 47-55; 2012.

Golldack, D.; Li, C.; Mohan, H.; Probst, N. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. **Frontiers in plant science**, v. 5; 2014.

Golldack, D.; Lüking, I.; Yang, O. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. **Plant cell reports**, v. 30, n. 8, p. 1383-1391; 2011.

Gong, X.-Q.; Liu, J.-H. Genetic transformation and genes for resistance to abiotic and biotic stresses in Citrus and its related genera. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, p. 1-11; 2012.

Gong, X.; Liu, M.; Zhang, L.; Ruan, Y.; Ding, R.; Ji, Y.; Zhang, N.; Zhang, S.; Farmer, J.; Wang, C. Arabidopsis AtSUC2 and AtSUC4, encoding sucrose transporters, are required for abiotic stress tolerance in an ABA-dependent pathway. **Physiologia plantarum**, v. 153, n. 1, p. 119-136; 2015.

Grzesiak, M.; Filek, M.; Barbasz, A.; Kreczmer, B.; Hartikainen, H. Relationships between polyamines, ethylene, osmoprotectants and antioxidant enzymes activities in wheat seedlings after short-term PEG-and NaCl-induced stresses. **Plant Growth Regulation**, v. 69, n. 2, p. 177-189; 2013.

Guo, Y.; Yang, R.; Chen, H.; Song, Y.; Gu, Z. Accumulation of γ -aminobutyric acid in germinated soybean (*Glycine max L.*) in relation to glutamate decarboxylase and diamine oxidase activity induced by additives under hypoxia. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 4, p. 679-687; 2012.

Gupta, A. K.; Kaur, N. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. **Journal of biosciences**, v. 30, n. 5, p. 761-776; 2005.

Gupta, B.; Huang, B. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. **International journal of genomics**, v. 2014; 2014.

Gupta, K.; Dey, A.; Gupta, B. Plant polyamines in abiotic stress responses. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 7, p. 2015-2036; 2013.

Hashimoto, M.; Komatsu, S. Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. **Proteomics**, v. 7, n. 8, p. 1293-1302; 2007.

Hendry, G. A. Evolutionary origins and natural functions of fructans—a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. **New phytologist**, v. 123, n. 1, p. 3-14; 1993.

Hichri, I.; Barrieu, F.; Bogs, J.; Kappel, C.; Delrot, S.; Lauvergeat, V. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. **Journal of Experimental Botany**, p. erq442; 2011.

Hincha, D. K.; Zuther, E.; Hellwege, E. M.; Heyer, A. G. Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. **Glycobiology**, v. 12, n. 2, p. 103-110; 2002.

Hoshida, H.; Tanaka, Y.; Hibino, T.; Hayashi, Y.; Tanaka, A.; Takabe, T.; Takabe, T. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. **Plant molecular biology**, v. 43, n. 1, p. 103-111; 2000.

Hummel, I.; Gouesbet, G.; El Amrani, A.; Aïnouche, A.; Couée, I. Characterization of the two arginine decarboxylase (polyamine biosynthesis) paralogues of the endemic

subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica* and analysis of their differential expression during development and response to environmental stress. **Gene**, v. 342, n. 2, p. 199-209; 2004.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - LSPA - Novembro 2013. 2013. Disponível em: <
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>>. Acesso em: 05/02/2014.

Illingworth, C.; Mayer, M. J.; Elliott, K.; Hanfrey, C.; Walton, N. J.; Michael, A. J. The diverse bacterial origins of the *Arabidopsis* polyamine biosynthetic pathway. **FEBS letters**, v. 549, n. 1, p. 26-30; 2003.

Ireland, H. E.; Harding, S. J.; Bonwick, G. A.; Jones, M.; Smith, C. J.; Williams, J. H. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*. **Biomarkers**, v. 9, n. 2, p. 139-155; 2004.

ISO. Quarterly Market Outlook. 2012. Disponível em: <
<http://www.iso.org/iso/home.htm>>. Acesso em: 05/02/2014.

Jang, J. Y.; Kim, D. G.; Kim, Y. O.; Kim, J. S.; Kang, H. An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant molecular biology**, v. 54, n. 5, p. 713-725; 2004.

Jang, S. J.; Wi, S. J.; Choi, Y. J.; An, G.; Park, K. Y. Increased polyamine biosynthesis enhances stress tolerance by preventing the accumulation of reactive oxygen species: T-DNA mutational analysis of *Oryza sativa* lysine decarboxylase-like protein 1. **Molecules and cells**, v. 34, n. 3, p. 251-262; 2012.

Janicka-Russak, M.; Kabała, K.; Młodzińska, E.; Kłobus, G. The role of polyamines in the regulation of the plasma membrane and the tonoplast proton pumps under salt stress. **Journal of plant physiology**, v. 167, n. 4, p. 261-269; 2010.

Jorrin-Novo, J. V. Plant Proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 3, p. 283-284; 2009.

Jorrin-Novo, J. V.; Maldonado, A. M.; Echevarria-Zomeno, S.; Valledor, L.; Castillejo, M. A.; Curto, M.; Valero, J.; Sghaier, B.; Donoso, G.; Redondo, I. 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**, v. 72, n. 3, p. 285-314; 2009.

Kabała, K.; Kłobus, G. Modification of vacuolar proton pumps in cucumber roots under salt stress. **Journal of plant physiology**, v. 165, n. 17, p. 1830-1837; 2008.

Kamiab, F.; Talaie, A.; Khezri, M.; Javanshah, A. Exogenous application of free polyamines enhance salt tolerance of pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings. **Plant growth regulation**, v. 72, n. 3, p. 257-268; 2014.

Kav, N. N.; Srivastava, S.; Goonewardene, L.; Blade, S. F. Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. **Annals of applied Biology**, v. 145, n. 2, p. 217-230; 2004.

Kerepesi, I.; Banyai-Stevanovits, E.; Galiba, G. Fructans in wheat under stress conditions. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 46, n. 3-4, p. 101-102; 2002.

Keunen, E.; Peshev, D.; Vangronsveld, J.; Van den Ende, W.; Cuypers, A. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, cell & environment**, v. 36, n. 7, p. 1242-1255; 2013.

Kim, J.-M.; Sasaki, T.; Ueda, M.; Sako, K.; Seki, M. Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 114; 2015.

Koch, K. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annual review of plant biology**, v. 47, n. 1, p. 509-540; 1996.

Krasensky, J.; Jonak, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 4, p. 1593-1608; 2012.

Krishnamurthy, R. Amelioration of salinity effect in salt tolerant rice (*Oryza sativa* L.) by foliar application of putrescine. **Plant and cell physiology**, v. 32, n. 5, p. 699-703; 1991.

Krishnamurthy, R.; Bhagwat, K. Polyamines as modulators of salt tolerance in rice cultivars. **Plant Physiology**, v. 91, n. 2, p. 500-504; 1989.

Kubis, J. Exogenous spermidine differentially alters activities of some scavenging system enzymes, H₂O₂ and superoxide radical levels in water-stressed cucumber leaves. **Journal of plant physiology**, v. 165, n. 4, p. 397-406; 2008.

Kushalappa, A. C.; Gunnaiah, R. Metabolo-proteomics to discover plant biotic stress resistance genes. **Trends in Plant Science**; 2013.

Lakshmanan, P.; Geijskes, R. J.; Aitken, K. S.; Grof, C. L. P.; Bonnett, G. D.; Smith, G. R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 4, p. 345-363; 2005.

Laloi, M. Plant mitochondrial carriers: an overview. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 56, n. 11-12, p. 918-944; 1999.

Lee, D.-G.; Ahsan, N.; Lee, S.-H.; Lee, J. J.; Bahk, J. D.; Kang, K. Y.; Lee, B.-H. Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. **Journal of plant physiology**, v. 166, n. 1, p. 1-11; 2009.

Lee, T. S. G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 10, n. 1, p. 47-55; 1987.

Li, B.; Guo, S.-R.; Sun, J.; Li, J. Effects of Exogenous Spermidine on Free Polyamine Content and Polyamine Biosynthesis Gene Expression in Cucumber Seedlings under Salt Stress. **Plant Science Journal**, v. 29, n. 4, p. 480-485; 2011.

Li, J.; Jia, H.; Wang, J.; Cao, Q.; Wen, Z. Hydrogen sulfide is involved in maintaining ion homeostasis via regulating plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter system in the hydrogen peroxide-dependent manner in salt-stress *Arabidopsis thaliana* root. **Protoplasma**, v. 251, n. 4, p. 899-912; 2014.

Li, J.; Ye, X.; An, B.; Du, L.; Xu, H. Genetic transformation of wheat: current status and future prospects. **Plant biotechnology reports**, v. 6, n. 3, p. 183-193; 2012.

Li, X.-J.; Yang, M.-F.; Zhu, Y.; Liang, Y.; Shen, S.-H. Proteomic analysis of salt stress responses in rice shoot. **Journal of Plant Biology**, v. 54, n. 6, p. 384-395; 2011.

Liu, C. W.; Chang, T. S.; Hsu, Y. K.; Wang, A. Z.; Yen, H. C.; Wu, Y. P.; Wang, C. S.; Lai, C. C. Comparative proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in roots and leaves of rice. **Proteomics**, v. 14, n. 15, p. 1759-1775; 2014.

Liu, H.; Sadygov, R. G.; Yates, J. R. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. **Analytical chemistry**, v. 76, n. 14, p. 4193-4201; 2004.

Liu, J.-H.; Inoue, H.; Moriguchi, T. Salt stress-mediated changes in free polyamine titers and expression of genes responsible for polyamine biosynthesis of apple *in vitro* shoots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 62, n. 1, p. 28-35; 2008.

Liu, J.; Nakajima, I.; Moriguchi, T. Effects of salt and osmotic stresses on free polyamine content and expression of polyamine biosynthetic genes in *Vitis vinifera*. **Biologia plantarum**, v. 55, n. 2, p. 340-344; 2011.

Lopez, C. G.; Banowitz, G. M.; Peterson, C. J.; Kronstad, W. E. Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. **Crop Science**, v. 43, n. 2, p. 577-582; 2003.

Maiale, S.; Sánchez, D. H.; Guirado, A.; Vidal, A.; Ruiz, O. A. Spermine accumulation under salt stress. **Journal of plant physiology**, v. 161, n. 1, p. 35-42; 2004.

Matsuo, N.; Ozawa, K.; Mochizuki, T. Genotypic differences in root hydraulic conductance of rice (*Oryza sativa* L.) in response to water regimes. **Plant and Soil**, v. 316, n. 1-2, p. 25-34; 2009.

McCready, R.; Guggolz, J.; Silveira, V.; Owens, H. Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical chemistry**, v. 22, n. 9, p. 1156-1158; 1950.

Mekawy, A. M. M.; Assaha, D. V.; Yahagi, H.; Tada, Y.; Ueda, A.; Saneoka, H. Growth, physiological adaptation, and gene expression analysis of two Egyptian rice cultivars under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 87, p. 17-25; 2015.

Minhas, D.; Grover, A. Transcript levels of genes encoding various glycolytic and fermentation enzymes change in response to abiotic stresses. **Plant Science**, v. 146, n. 1, p. 41-51; 1999.

Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405-410; 2002.

Morkunas, I.; Marczak, Ł.; Stachowiak, J.; Stobiecki, M. Sucrose-induced lupine defense against *Fusarium oxysporum*: Sucrose-stimulated accumulation of isoflavonoids as a defense response of lupine to *Fusarium oxysporum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 363-373; 2005.

Morsy, M. R.; Jouve, L.; Hausman, J.-F.; Hoffmann, L.; Stewart, J. M. Alteration of oxidative and carbohydrate metabolism under abiotic stress in two rice (*Oryza sativa* L.) genotypes contrasting in chilling tolerance. **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 2, p. 157-167; 2007.

Mostek, A.; Börner, A.; Badowiec, A.; Weidner, S. Alterations in root proteome of salt-sensitive and tolerant barley lines under salt stress conditions. **Journal of plant physiology**, v. 174, p. 166-176; 2015.

Munns, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 239-250; 2002.

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

Munns, R.; Tester, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 651-681; 2008.

Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497; 1962.

Nagata, T.; Todoriki, S.; Masumizu, T.; Suda, I.; Furuta, S.; Du, Z.; Kikuchi, S. Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and anthocyanin in Arabidopsis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2992-2999; 2003.

Nishihara, M.; Nakatsuka, T.; Yamamura, S. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. **FEBS letters**, v. 579, n. 27, p. 6074-6078; 2005.

Nishizawa, A.; Yabuta, Y.; Shigeoka, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiology**, v. 147, n. 3, p. 1251-1263; 2008.

Oeljeklaus, S.; Meyer, H. E.; Warscheid, B. Advancements in plant proteomics using quantitative mass spectrometry. **Journal of proteomics**, v. 72, n. 3, p. 545-554; 2009.

Oufir, M.; Legay, S.; Nicot, N.; Van Moer, K.; Hoffmann, L.; Renaut, J.; Hausman, J.-F.; Evers, D. Gene expression in potato during cold exposure: changes in carbohydrate and polyamine metabolisms. **Plant science**, v. 175, n. 6, p. 839-852; 2008.

Palma, F.; Carvajal, F.; Lluch, C.; Jamilena, M.; Garrido, D. Changes in carbohydrate content in zucchini fruit (*Cucurbita pepo* L.) under low temperature stress. **Plant Science**, v. 217, p. 78-86; 2014.

Palma, F.; Tejera, N. A.; Lluch, C. Nodule carbohydrate metabolism and polyols involvement in the response of *Medicago sativa* to salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 85, p. 43-49; 2013.

Parida, A. K.; Das, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 60, n. 3, p. 324-49; 2005.

Park, H.-Y.; Seok, H.-Y.; Park, B.-K.; Kim, S.-H.; Goh, C.-H.; Lee, B.-h.; Lee, C.-H.; Moon, Y.-H. Overexpression of Arabidopsis ZEP enhances tolerance to osmotic stress. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 375, n. 1, p. 80-85; 2008.

Parvin, S.; Lee, O.; Sathiyaraj, G.; Khorolragchaa, A.; Kim, Y.; Miah, M. G.; Yang, D. Modulation of polyamine levels in ginseng hairy root cultures subjected to salt stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 59, n. 6, p. 757-765; 2012.

Pechanova, O.; Takáč, T.; Šamaj, J.; Pechan, T. Maize proteomics: an insight into the biology of an important cereal crop. **Proteomics**, v. 13, n. 3-4, p. 637-662; 2013.

Perez-Amador, M. A.; Leon, J.; Green, P. J.; Carbonell, J. Induction of the arginine decarboxylase ADC2 gene provides evidence for the involvement of polyamines in the wound response in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 130, n. 3, p. 1454-1463; 2002.

Pieruzzi, F. P.; Dias, L. L. C.; Balbuena, T. S.; Santa-Catarina, C.; dos Santos, A. L. W.; Floh, E. I. S. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). **Annals of Botany**, v. 108, n. 2, p. 337-345; 2011.

Polidoros, A. N.; Scandalios, J. G. 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**, v. 106, n. 1, p. 112-120; 1999.

Pottosin, I.; Shabala, S. Polyamines control of cation transport across plant membranes: implications for ion homeostasis and abiotic stress signaling. **Frontiers in plant science**, v. 5; 2014.

Puniran-Hartley, N.; Hartley, J.; Shabala, L.; Shabala, S. Salinity-induced accumulation of organic osmolytes in barley and wheat leaves correlates with increased oxidative stress tolerance: In planta evidence for cross-tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 83, p. 32-39; 2014.

Qiu, N.; Lu, Q.; Lu, C. Photosynthesis, photosystem II efficiency and the xanthophyll cycle in the salt-adapted halophyte *Atriplex centralasiatica*. **New Phytologist**, v. 159, n. 2, p. 479-486; 2003.

Qiu, Z.; Wang, Y.; Zhu, A.; Peng, F.; Wang, L. Exogenous sucrose can enhance tolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings to salt stress. **Biologia Plantarum**, v. 58, n. 4, p. 611-617; 2014.

Rai, S.; Agrawal, C.; Shrivastava, A. K.; Singh, P. K.; Rai, L. Comparative proteomics unveils cross species variations in *Anabaena* under salt stress. **Journal of proteomics**, v. 98, p. 254-270; 2014.

Rasool, S.; Ahmad, A.; Siddiqi, T.; Ahmad, P. Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 4, p. 1039-1050; 2013.

Reddy, P. S.; Reddy, G. M.; Pandey, P.; Chandrasekhar, K.; Reddy, M. K. Cloning and molecular characterization of a gene encoding late embryogenesis abundant protein from *Pennisetum glaucum*: protection against abiotic stresses. **Molecular biology reports**, v. 39, n. 6, p. 7163-7174; 2012.

Rejšková, A.; Patková, L.; Stodůlková, E.; Lipavská, H. The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea L.*) under in vitro conditions. **Journal of Plant physiology**, v. 164, n. 2, p. 174-184; 2007.

Ribeiro, P. R.; Fernandez, L. G.; de Castro, R. D.; Ligterink, W.; Hilhorst, H. W. Physiological and biochemical responses of *Ricinus communis* seedlings to different temperatures: a metabolomics approach. **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 223; 2014.

Ridesa. Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar. Curitiba: Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucrialcooleiro. p. 136p.; 2010.

Rodziewicz, P.; Swarczewicz, B.; Chmielewska, K.; Wojakowska, A.; Stobiecki, M. Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 1, p. 1-19; 2014.

Rolland, F.; Moore, B.; Sheen, J. Sugar sensing and signaling in plants. **The Plant Cell Online**, v. 14, n. suppl 1, p. S185-S205; 2002.

Roy, M.; Wu, R. Overexpression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in rice increases polyamine level and enhances sodium chloride-stress tolerance. **Plant Science**, v. 163, n. 5, p. 987-992; 2002.

Roy, P.; Niyogi, K.; Sengupta, D. N.; Ghosh, B. Spermidine treatment to rice seedlings recovers salinity stress-induced damage of plasma membrane and PM-bound H⁺-ATPase in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. **Plant Science**, v. 168, n. 3, p. 583-591; 2005.

Ruan, H.-H.; Shen, W.-B.; Xu, L.-L. Nitric oxide modulates the activities of plasma membrane H⁺-ATPase and PPase in wheat seedling roots and promotes the salt tolerance against salt stress. **Acta Botanica Sinica-English Edition**, v. 46, n. 4, p. 415-422; 2004.

Ruane, J.; Sonnino, A. Agricultural biotechnologies in developing countries and their possible contribution to food security. **Journal of Biotechnology**, v. 156, p. 356-363; 2011.

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

Santa-Catarina, C.; Silveira, V.; Scherer, G. F. E.; Floh, E. I. S. Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 90, n. 1, p. 93-101; 2007.

Seki, M.; Narusaka, M.; Ishida, J.; Nanjo, T.; Fujita, M.; Oono, Y.; Kamiya, A.; Nakajima, M.; Enju, A.; Sakurai, T. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, v. 31, n. 3, p. 279-292; 2002.

Shabala, S.; Pottosin, I. Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. **Physiologia plantarum**, v. 151, n. 3, p. 257-279; 2014.

Shevyakova, N. I.; Musatenkob, L. I.; Stetsenko, L. A.; V. Yu. Rakitina; Vedenichev, N. P.; Kuznetsov, V. V. Effect of ABA on the Contents of Proline, Polyamines, and Cytokinins in the Common Ice Plants under Salt Stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 60, p. 741-748; 2013.

Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Seki, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current opinion in plant biology**, v. 6, n. 5, p. 410-417; 2003.

Shu, S.; Yuan, L.-Y.; Guo, S.-R.; Sun, J.; Yuan, Y.-H. Effects of exogenous spermine on chlorophyll fluorescence, antioxidant system and ultrastructure of chloroplasts in *Cucumis sativus* L. under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 209-216; 2013.

Sicher, R. C.; Timlin, D.; Bailey, B. Responses of growth and primary metabolism of water-stressed barley roots to rehydration. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 7, p. 686-695; 2012.

Silva, F. d. A.; Azevedo, C. d. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 71-78; 2002.

Silveira, V.; Floh, E. I. S.; Handro, W.; Guerra, M. P. Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 76, n. 1, p. 53-60; 2004.

Siringam, K.; Juntawong, N.; Cha-um, S.; Kirdmanee, C. Salt stress induced ion accumulation, ion homeostasis, membrane injury and sugar contents in salt-sensitive rice (*Oryza sativa* L. spp. indica) roots under isoosmotic conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 8, p. 1340-1346; 2013.

Smeekens, S. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual review of plant biology**, v. 51, n. 1, p. 49-81; 2000.

Sobreira, A. C. M.; Maia, Y.; Rebouças, D. M.; Fontenele, N. M. B.; Costa, J. H.; Otoch, M. d. L. O.; de Oliveira, L. M. N.; Orellano, E. G.; de Melo, D. F. Vacuolar proton pumps regulation during development of *Vigna unguiculata* seedlings under salt stress. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 26, n. 3-4, p. 167-175; 2014.

Soyka, S.; Heyer, A. G. Arabidopsis knockout mutation of ADC2 gene reveals inducibility by osmotic stress. **FEBS letters**, v. 458, n. 2, p. 219-223; 1999.

Sperdoui, I.; Moustakas, M. Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 6, p. 577-585; 2012.

Sudhakar, C.; Veeranagamallaiah, G.; Nareshkumar, A.; Sudhakarbabu, O.; Sivakumar, M.; Pandurangaiah, M.; Kiranmai, K.; Lokesh, U. Polyamine metabolism influences antioxidant defense mechanism in foxtail millet (*Setaria italica* L.) cultivars with different salinity tolerance. **Plant Cell Reports**, v. 34, p. 141-156; 2015.

Székely, G.; Ábrahám, E.; Cséplő, Á.; Rigó, G.; Zsigmond, L.; Csiszár, J.; Ayaydin, F.; Strizhov, N.; Jásik, J.; Schmelzer, E. Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. **The Plant Journal**, v. 53, n. 1, p. 11-28; 2008.

Teixeira, J.; Fidalgo, F. Salt stress affects glutamine synthetase activity and mRNA accumulation on potato plants in an organ-dependent manner. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 807-813; 2009.

Teixeira, J.; Pereira, S. High salinity and drought act on an organ-dependent manner on potato glutamine synthetase expression and accumulation. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 1, p. 121-126; 2007.

Teng, S.; Keurentjes, J.; Bentsink, L.; Koornneef, M.; Smeekens, S. Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis requires the MYB75/PAP1 gene. **Plant Physiology**, v. 139, n. 4, p. 1840-1852; 2005.

Thitisaksakul, W. P.; Maysaya. Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, p. 736-742; 2008.

Tiburcio, A. F.; Altabella, T.; Bitrián, M.; Alcázar, R. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. **Planta**, v. 240, n. 1, p. 1-18; 2014.

Timperio, A. M.; Egidi, M. G.; Zolla, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). **Journal of Proteomics**, v. 71, n. 4, p. 391-411; 2008.

UNICA. Balanço da Safra 2014/2015. 2014. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/> >. Acesso em: 30/01/2015.

Urano, K.; Yoshiba, Y.; Nanjo, T.; Igarashi, Y.; Seki, M.; Sekiguchi, F.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; Shinozaki, K. Characterization of Arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. **Plant, Cell & Environment**, v. 26, n. 11, p. 1917-1926; 2003.

Vale, E. M. **Análise proteômica e determinação de carboidratos na embriogênese somática do mamoeiro (carica papaya l.)**. 2013. Dissertação de Mestrado Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF

Valluru, R.; Van den Ende, W. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 11, p. 2905-2916; 2008.

van Arkel, J.; Sévenier, R.; Hakkert, J. C.; Bouwmeester, H. J.; Koops, A. J.; van der Meer, I. M. Tailor-made fructan synthesis in plants: a review. **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 1, p. 48-56; 2013.

Van den Ende, W.; El-ESawe, S. K. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: A dual function in abiotic and biotic stress responses? **Environmental and Experimental Botany**, v. 108, p. 4-13; 2014.

Vanderschuren, H.; Lentz, E.; Zainuddin, I.; Gruissem, W. Proteomics of model and crop plant species: Status, current limitations and strategic advances for crop improvement. **Journal of Proteomics**; 2013.

Vasil, I. K. A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. **Plant cell reports**, v. 27, n. 9, p. 1423-1440; 2008.

Veiga, C. d. M.; RIBEIRO, J.; Morgado, I. Diagnóstico da cadeia produtiva da cana-de-açúcar do estado do Rio de Janeiro: relatório de pesquisa. **Rio de Janeiro: FAERJ: SEBRAE/RJ**; 2006.

Verbruggen, N.; Hermans, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino acids**, v. 35, n. 4, p. 753-759; 2008.

Vítámvás, P.; Prášil, I. T.; Kosova, K.; Planchon, S.; Renaut, J. Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A and 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation. **Proteomics**, v. 12, n. 1, p. 68-85; 2012.

Vitrac, X.; Larronde, F.; Krisa, S.; Decendit, A.; Deffieux, G.; Mérillon, J.-M. Sugar sensing and Ca²⁺-calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 53, n. 6, p. 659-665; 2000.

Vuosku, J.; Suorsa, M.; Ruottinen, M.; Sutela, S.; Muilu-Mäkelä, R.; Julkunen-Tiitto, R.; Sarjala, T.; Neubauer, P.; Häggman, H. Polyamine metabolism during exponential growth transition in Scots pine embryogenic cell culture. **Tree physiology**, v. 32, n. 10, p. 1274-1287; 2012.

Waie, B.; Rajam, M. V. Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. **Plant Science**, v. 164, n. 5, p. 727-734; 2003.

Wang, B.; Lüttge, U.; Ratajczak, R. Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 365, p. 2355-2365; 2001.

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

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

Wasternack, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of botany**, v. 100, n. 4, p. 681-697; 2007.

Wild, M.; Davière, J.-M.; Cheminant, S.; Regnault, T.; Baumberger, N.; Heintz, D.; Baltz, R.; Genschik, P.; Achard, P. The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. **The Plant Cell Online**, v. 24, n. 8, p. 3307-3319; 2012.

Wilkins, M. R.; Sanchez, J. C.; Williams, K. L.; Hochstrasser, D. F. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, n. 5, p. 830-838; 1996.

Yamaguchi, K.; Takahashi, Y.; Berberich, T.; Imai, A.; Miyazaki, A.; Takahashi, T.; Michael, A.; Kusano, T. The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS letters**, v. 580, n. 30, p. 6783-6788; 2006.

Yan, K.; Shao, H.; Shao, C.; Chen, P.; Zhao, S.; Brestic, M.; Chen, X. Physiological adaptive mechanisms of plants grown in saline soil and implications for sustainable saline agriculture in coastal zone. **Acta Physiologiae Plantarum**, p. 1-12; 2013.

Yan, S.; Tang, Z.; Su, W.; Sun, W. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. **Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 235-244; 2005.

Yang, G.; Zhou, R.; Tang, T.; Chen, X.; Ouyang, J.; He, L.; Li, W.; Chen, S.; Guo, M.; Li, X. Gene expression profiles in response to salt stress in *Hibiscus tiliaceus*. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, n. 3, p. 609-617; 2011.

Yin, Z. P.; Li, S.; Ren, J.; Song, X. S. Role of spermidine and spermine in alleviation of drought-induced oxidative stress and photosynthetic inhibition in Chinese dwarf cherry (*Cerasus humilis*) seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 74, n. 3, p. 209-218; 2014.

Yokthongwattana, C.; Mahong, B.; Roytrakul, S.; Phaonaklop, N.; Narangajavana, J.; Yokthongwattana, K. Proteomic analysis of salinity-stressed *Chlamydomonas reinhardtii* revealed differential suppression and induction of a large number of important housekeeping proteins. **Planta**, v. 235, n. 3, p. 649-659; 2012.

Yubero-Serrano, E. M.; Moyano, E.; Medina-Escobar, N.; Muñoz-Blanco, J.; Caballero, J. L. Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress*. **Journal of experimental botany**, v. 54, n. 389, p. 1865-1877; 2003.

Zhang, H.; Han, B.; Wang, T.; Chen, S.; Li, H.; Zhang, Y.; Dai, S. Mechanisms of plant salt response: insights from proteomics. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 1, p. 49-67; 2011.

Zhang, L.; Zhao, G.; Jia, J.; Liu, X.; Kong, X. Molecular characterization of 60 isolated wheat MYB genes and analysis of their expression during abiotic stress. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 1, p. 203-214; 2012.

Zhang, Q. Y.; Wang, L. Y.; Kong, F. Y.; Deng, Y. S.; Li, B.; Meng, Q. W. Constitutive accumulation of zeaxanthin in tomato alleviates salt stress-induced photoinhibition and photooxidation. **Physiologia plantarum**, v. 146, n. 3, p. 363-373; 2012.

Zhang, X.; Wang, H.; Liu, S.; Takano, T. Cloning and Characterization of a Plasma Membrane H⁺-ATPase (PMA) Gene from a Salt-tolerant Plant *Chloris virgata*. **Molecular Soil Biology**, v. 5, n. 5; 2014.

Zhao, F.; Song, C.-P.; He, J.; Zhu, H. Polyamines improve K⁺/Na⁺ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. **Plant physiology**, v. 145, n. 3, p. 1061-1072; 2007.

Zhao, H.; Yang, H. Exogenous polyamines alleviate the lipid peroxidation induced by cadmium chloride stress in *Malus hupehensis* Rehd. **Scientia horticulturae**, v. 116, n. 4, p. 442-447; 2008.

Zhao, Q.; Zhang, H.; Wang, T.; Chen, S.; Dai, S. Proteomics-based investigation of salt-responsive mechanisms in plant roots. **Journal of proteomics**, v. 82, p. 230-253; 2013.

Zheng, Y.; Tian, L.; Liu, H.; Pan, Q.; Zhan, J.; Huang, W. Sugars induce anthocyanin accumulation and flavanone 3-hydroxylase expression in grape berries. **Plant Growth Regulation**, v. 58, n. 3, p. 251-260; 2009.

Zhou, G.; Yang, L.-T.; Li, Y.-R.; Zou, C.-L.; Huang, L.-P.; Qiu, L.-H.; Huang, X.; Srivastava, M. K. Proteomic analysis of osmotic stress-responsive proteins in sugarcane leaves. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 2, p. 349-359; 2012.

Zhu, J.-K. Plant salt tolerance. **Trends in plant science**, v. 6, n. 2, p. 66-71; 2001.

Zhu, J.-K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current opinion in plant biology**, v. 6, n. 5, p. 441-445; 2003.

Zhu, W.; Miao, Q.; Sun, D.; Yang, G.; Wu, C.; Huang, J.; Zheng, C. The mitochondrial phosphate transporters modulate plant responses to salt stress via affecting ATP and gibberellin metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e43530; 2012.

Zhu, Y.-N.; Shi, D.-Q.; Ruan, M.-B.; Zhang, L.-L.; Meng, Z.-H.; Liu, J.; Yang, W.-C. Transcriptome analysis reveals crosstalk of responsive genes to multiple abiotic stresses in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80218; 2013.