



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ISABEL CRISTINA DA CÓSTA SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CALOS DE ESPÉCIES LATICÍFERAS EM
RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE
OSMOTINAS**

FORTALEZA-CE

2015

ISABEL CRISTINA DA CÓSTA SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CALOS DE ESPÉCIES LATICÍFERAS EM
RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE
OSMOTINAS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.

FORTALEZA-CE

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S714c Souza, Isabel Cristina da Csta.
Caracterização bioquímica de calos de espécies laticíferas em resposta ao estresse salino e análise da transcrição de osmotinas / Isabel Cristina da Csta Souza. – 2015.
101 f. : il. color., ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Marcio Viana Ramos.
Coorientação: Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho.
1. *Calotropis procera*. 2. Estresse salino. 3. Látex. I. Título.

CDD 574.192

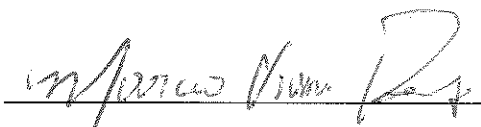
ISABEL CRISTINA DA CÔSTA SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CALOS DE ESPÉCIES LATICÍFERAS EM
RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO E ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE
OSMOTINAS.**

Dissertação submetida à Coordenação
do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica.

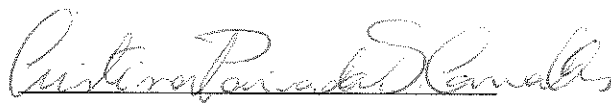
Dissertação aprovada em: ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA



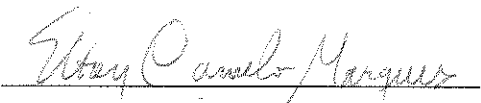
Prof. Dr. Marcio Viana Ramos (Orientador)

Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular -
UFC



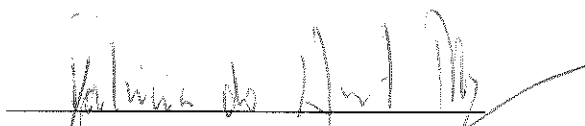
Prof.ª Dr.ª Cristina Paiva da Silveira Carvalho

(Coorientadora)- Deptº de Bioquímica e
Biologia Molecular - UFC



Dr. Elton Camelo Marques

Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular -
UFC



Dr.ª Patricia do Nascimento Bordallo

EMBRAPA

A minha mãe (Ana Alves) que sempre incentivou meus estudos, não medindo esforços para a realização dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os procedimentos experimentais que compõem esta dissertação foram realizados com o apoio dos seguintes Programas/Instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica.

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) - através da concessão de bolsa de mestrado e de fomentos à pesquisa.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq) e **FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP)** - pela contribuição para a melhoria nas condições experimentais e formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Márcio Viana Ramos, pela confiança e pelo incentivo fornecido, além de não medir esforços para disponibilizar todos os meios possíveis e impossíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Cristina Paiva, por ser um exemplo de competência, dedicação e simplicidade. Agradeço também pelos excelentes conselhos e pela sua amizade.

À Dr^a. Patricia Bordallo por ter aceitado participar da minha banca examinadora.

Ao Dr. Elton Camelo, por sempre estar disponível para me ajudar e por ter aceitado participar da minha banca examinadora.

Ao Professor Hélio Costa pelas valiosíssimas contribuições dadas para a realização deste trabalho, estando sempre disponível em colaborar.

À Professora Ana Cristina de Oliveira Monteiro e ao Professor Renato de Azevedo, da Universidade de Fortaleza (UNIFOR), por disponibilizarem o espaço e os recursos de seu laboratório.

Ao Professor Thalles Barbosa, coordenador do Laboratório de Citogenética e Genética Molecular, assim como os estudantes membros deste laboratório.

Aos Professores Enéas Gomes e Joaquim Enéas coordenadores dos Laboratórios de Fisiologia Vegetal.

Ao Professor Albenísio Gomes coordenador do Laboratório de Metabolismo e Estresse de Plantas.

A todos os colegas que fazem parte do laboratório (Rachel, Brenda, Misrael, Italo, Fernanda, Carol, Felipe, Zelândia, Wallace) e a amiga Aldelisa (Teca), pela cumplicidade e companheirismo. Agradeço em especial a Rayanne, por ter sido uma ótima companheira de bancada e de lar.

Agradeço especialmente a minha família, pelo apoio para concretizar esta etapa: a minha mãe Ana e ao meu pai Geraldo, obrigada por entenderem minha ausência; a minha irmã Isabele e sobrinha Maria, por constituir minha família e cuidar dos meus pais.

A Rafael Melo, pelo amor, companheirismo e paciência, apoiando-me mesmo estando distante.

RESUMO

Calotropis procera e *Cryptostegia grandiflora* são plantas laticíferas. Em seus fluidos laticíferos, foram encontradas proteínas do tipo osmotina. A literatura reporta que osmotinas são proteínas relacionadas com mecanismos de defesa vegetal em situações de estresse biótico e/ou abiótico. Entretanto, ainda há várias inconsistências nessa afirmação. Nesse contexto, técnicas *in vitro* de cultura de tecidos vegetais foram aplicadas como modelo para auxiliar na compreensão de como as células de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* respondem ao estresse salino, em termos bioquímicos, e se o nível de transcritos para a osmotina seria aumentado em resposta à exposição a NaCl. Para indução desse estresse, NaCl foi adicionado à formulação nutritiva de Murashige e Skoog (MS), em concentrações crescentes (0, 20, 40, 60 e 80 mM). Os resultados mostram que os calos cultivados com NaCl a 80 mM tiveram o crescimento e o teor de umidade reduzidos, respectivamente, em 33% e 10%, em *C. procera* e de 83% e 39%, em *C. grandiflora*, em comparação ao seu tratamento controle. Nessas mesmas condições, foi observado um aumento nas concentrações dos íons Na⁺ e Cl⁻ de, respectivamente, 98,9% e 98%, em *C. procera*, e de 98,8% e 96%, em *C. grandiflora*. Foi também observada diminuição no teor de K⁺ nos calos tratados com NaCl a 80 mM. Essa redução foi de 43%, em *C. procera*, e de 18% em *C. grandiflora*, quando comparado ao tratamento controle. Os calos tratados com NaCl a 80 mM, apresentaram uma tendência de acúmulo de prolina e açúcares solúveis, alcançando, respectivamente valores, 26% e 37% maiores em calos de *C. procera*, e 55,4% e 45% maiores, em calos de *C. grandiflora*, que aqueles em condições controle. O aumento na atividade das enzimas que degradam H₂O₂ foi observado em calos de *C. grandiflora* submetidos a estresse salino, sugerindo um possível dano oxidativo. Esse aumento foi de 73%, para a ascorbato peroxidase, e de 62% para a peroxidase do guaiacol, nos calos tratados com NaCl a 80 mM, em relação ao controle. Não foi observada qualquer alteração significativa na atividade das enzimas do sistema antioxidativo em razão do estresse salino em calos de *C. procera*. Em relação à transcrição da osmotina, foi avaliado o perfil de seus transcritos nos intervalos de tempo de 0, 2, 12, 24, 48 horas e de 4, 7, 14 e 28 dias sob estresse. Os transcritos de osmotina foram observados a partir de 12 horas de contato dos calos com NaCl a 80 mM, em ambas as espécies. Contudo, nos extratos proteicos dos calos de *C. procera* e *C. grandiflora* cultivados em condições controle e de 80 mM de NaCl, não foi detectada a presença da proteína osmotina quando avaliado pelos ensaios de eletroforese, *Dot blotting* e espectrometria de massas. Assim, a avaliação do estresse salino utilizando como modelo de estudo células *in vitro* foi eficiente, fornecendo

informações do comportamento celular de duas espécies laticíferas, mostrando suas alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Os resultados sugerem que o estresse salino favoreceu o aumento da transcrição do gene da osmotina em calos das duas espécies em estudo e permite propor uma possível relação das osmotinas dessas espécies com a tolerância à salinidade. A falha em detectar as proteínas correspondentes aos genes propicia a concepção de várias novas hipóteses a serem validadas.

Palavras - chave: Plantas laticíferas. PR- proteínas. RT-PCR. Salinidade.

ABSTRACT

Calotropis procera e *Cryptostegia grandiflora* are laticiferous plants. It was found osmotin protein. The literature shows that the osmotinas are associated to plant defence mechanisms in situations of biotic or abiotic stress. However, there are still several inconsistencies in this hypothesis. In this context, it was used *in vitro* tissue culture techniques as model to assist in the understanding of how the *C. procera* and *C. grandiflora* callus cells respond to salt stress in biochemical terms, and whether the transcripts level for osmotin has raised in response to exposure to NaCl. It was added NaCl to the culture medium of Murashige e Skoog (MS) in increasing concentrations (0, 20, 40, 60 e 80 mM). The results show that callus treated with 80 mM NaCl have reduced the growth and the humidity percentage of respectively 33% and 10% in *C. procera* and 83% and 39% in *C. grandiflora* compared to the control treatment callus. Under the same conditions, it was seen an increase in ions concentrations of Na⁺ and Cl⁻, 98.9% and 98% in *C. procera* and 98.8% and 96% in *C. grandiflora* respectively. It was also seen a reduction in K⁺ level in callus treated with 80 mM NaCl, 43% in *C. procera* and 18% in *C. Grandiflora*, when compared to the control. The callus treated with 80 mM NaCl, showed a tendency of the proline accumulation and soluble sugars, increasing 26% and 37% in *C. procera* callus and 55.4% and 45% in *C. grandiflora* callus, respectively, when compared to control conditions. The increase in the activity of enzymes that break H₂O₂ has been observed in *C. grandiflora* callus under the salt stress, suggesting a possible oxidative damage, this increase was 73% in the ascorbate peroxidase activity and 62% in guaiacol peroxidase activity when compared to the activity of enzymes of the control callus with the treaty in 80 mM NaCl. None connection was seen between changes in the activity of the enzymes of the oxidative system and the salt stress in *C. procera* callus. It was evaluated the behaviour of osmotin in the osmotin transcription at 0, 2, 12, 24, 48 hours and at 4, 7, 14, 28 days of callus contact under stress. The osmotin transcripts were observed from 12 hours of contact of callus in 80mM NaCl in both species. However, it was not found osmotin by electrophoresis assays, dot blotting and mass spectrometry in the protein extracts of *C. procera* and *C. grandiflora* callus grown in control conditions and in 80 mM NaCl. Thus, the salt stress evaluation using *in vitro* cell model study was effective, providing cellular behaviour information for these two laticifers plants species showing their physiological, biochemical and molecular changes. The results suggest that the induced salt stress has favoured the increase of osmotin gene expression in both cases and suggests a possible relationship between osmotin of these species with the protection to salinity

conditions. The failure to detect the proteins corresponding to genes provides the conception of several new hypotheses to be validated.

Keywords: Laticíferas plants. PR-proteins. RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação anatômica dos dois tipos de laticíferos.....	19
Figura 2 -	Aspectos gerais da planta <i>Calotropis procera</i>	20
Figura 3 -	Aspectos gerais da planta <i>Cryptostegia grandiflora</i>	22
Figura 4 -	Representação do ajuste iônico.....	27
Figura 5 -	Mecanismo de ação antifúngica da osmotina.....	32
Figura 6 -	Calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	60
Figura 7 -	Taxa de crescimento relativo dos calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	63
Figura 8 -	Teor relativo de água em porcentagem de umidade dos calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	64
Figura 9 -	Relação entre os íons Na^+/K^+ dos calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	66
Figura 10 -	Teores dos íons de Na^+ , Cl^- e K^+ , em calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	67
Figura 11 -	Concentração de prolina em calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i> .	69
Figura 12 -	Concentração de açúcares solúveis totais dos calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	70
Figura 13 -	Peroxidação de lipídeos em calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	74
Figura 14 -	Eletroforese em gel de agarose (1%), evidenciando as bandas do RNA ribossomal 18S e 28S do RNA extraído dos calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	76
Figura 15 -	Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da amplificação de cDNA com diferentes temperaturas de anelamento utilizando o <i>primer</i> EF1 α e o da osmotina.....	77
Figura 16 -	Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da amplificação de cDNA dos calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i> ...	78
Figura 17 -	Eletroforese em gel de agarose (1%), evidenciando a banda do <i>amplicon</i> para o gene EF1 α amplificado com o cDNA dos dos calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	79

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose (1%), evidenciando a banda do <i>amplicon</i> do gene da osmotina amplificado com o cDNA dos dos calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	81
Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) do extrato proteico de calos <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	82
Figura 20 - Identificação da proteína osmotina por <i>Dot Blotting</i> do extrato proteico de calos <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de nutrientes, vitaminas e compostos orgânicos utilizados para formulação do meio de cultura de Murashige e Skoog (MS)....	43
Quadro 2 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Osmolalidade do meio MS acrescido de concentrações crescentes de NaCl (0- 80 mM).....	61
Tabela 2 - Atividade enzimática da APX, CAT, G-POD em calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i> submetidos a estresse com concentrações crescentes de NaCl (0-80 mM).....	73
Tabela 3 - Valores médios das concentrações e relações de absorbâncias dos RNAs extraídos de calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	75
Tabela 4 - Lista de proteínas identificadas por espectrometria de massas ESI-QUAD-TOF.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
APX	Peroxidase do ascorbato
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
G-POD	Peroxidase do guaiacol
N-terminal	Amino-terminal
RT – PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da DNA polimerase
SOD	Dismutase do superóxido
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Plantas laticíferas	18
1.1.1 Calotropis procera (Ait.) R.Br.....	19
1.1.2 Cryptostegia grandiflora R. Br.	21
1.2 Aspectos gerais da salinidade e seus efeitos nas plantas.....	22
1.3 Mecanismos de defesa das plantas a salinidade	23
1.3.1 Homeostase iônica de plantas sob estresse salino	24
1.3.2 Homeostase osmótica.....	27
1.3.3 Proteção contra o estresse oxidativo.....	28
1.4 Osmotinas.....	30
1.5 Cultura <i>in vitro</i> de tecidos vegetais	33
1.5.1 Seleção de espécies tolerantes <i>in vitro</i>.....	34
1.5.2 Cultura de tecidos <i>in vitro</i> como uma ferramenta para estudos da fisiologia de plantas	36
2 JUSTIFICATIVA.....	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Material	40

4.1.1 Reagentes químicos.....	40
4.1.2 Material vegetal	40
4.2 Métodos.....	40
4.2.1 Germinação das sementes e indução de calos de <i>C. procera</i> e <i>C. grandiflora</i>	40
4.2.2 Indução de estresse salino.....	41
4.2.3 Determinação da taxa de crescimento relativo.....	42
4.2.4 Teor de umidade	43
4.2.5 Determinação de íons inorgânicos.....	43
4.2.6 Teores de solutos orgânicos.....	44
4.2.7 Obtenção do extrato proteico.....	46
4.2.8 Determinação da concentração de proteínas solúveis.....	46
4.2.9 Atividades das enzimas antioxidativas.....	46
4.2.10 Atividade proteolítica.....	47
4.2.11 Peroxidação de lipídeos.....	48
4.2.12 Eletroforeses em gel de poliacrilamida em primeira dimensão.....	49
4.2.13 Extração de RNA.....	49
4.2.14 Quantificação do RNA.....	50
4.2.15 Integridade do RNA.....	51
4.2.16 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	51
4.2.17 Padronização da RT-PCR.....	52

<i>4.2.18 Produção de anticorpos anti-CpOsm nativa</i>	54
<i>4.2.19 Imunodeteccção de proteínas (Dot blotting)</i>	55
<i>4.2.20 Espectrometria de massas</i>	56
<i>4.2.21 Análise estatística</i>	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Obtenção dos calos.....	58
5.2 Crescimento dos calos.....	59
5.3 Teor relativo de água.....	61
5.4 Teores de sódio, potássio e cloreto.	63
5.5 Teores de solutos orgânicos	66
5.6 Atividade enzimática.....	69
5.7 Peroxidação de lipídeos de membrana	72
5.8 Obtenção e determinação da qualidade do RNA	73
5.9 Padronização da RT-PCR	75
5.10 Qualidade e padronização do cDNA obtido pela reação de transcrição reversa	77
5.11 Relação entre as osmotinas e o estresse salino.....	79
<i>5.11.1 Análise da transcrição de osmotinas</i>	79
<i>5.11.2 Avaliação da presença de osmotinas</i>	80
6 CONCLUSÃO.....	89

REFERÊNCIAS

1 INTRODUÇÃO

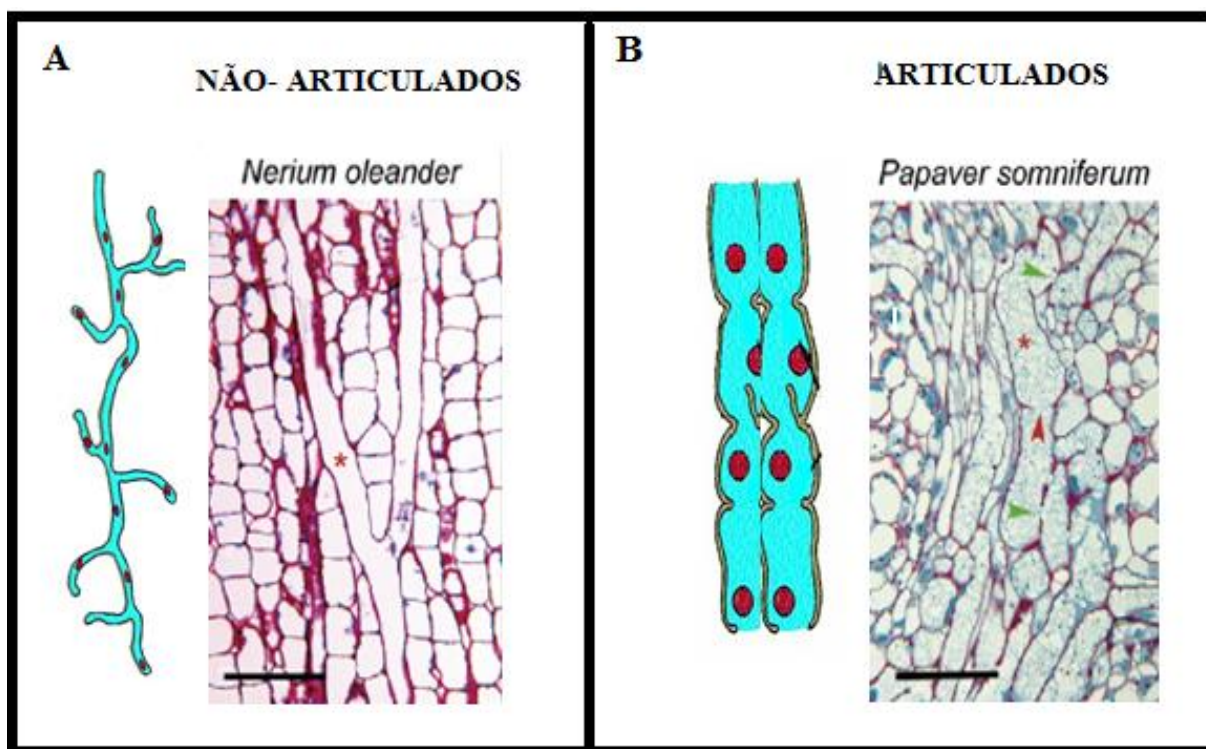
1.1 Plantas laticíferas

Existe um grande número de espécies laticíferas presentes em diferentes ambientes, podendo ser herbáceas, arbustivas ou arbóreas. Cerca de 12.500 espécies, pertencentes a 22 famílias, são consideradas plantas laticíferas (HAGEL *et al.*, 2008). Uma característica marcante destas espécies é o fato de exsudarem látex quando sofrem algum tipo de injúria, seja por dano mecânico ou por herbivoria (KEKWICK, 2002).

O látex é um conteúdo citoplasmático de aspecto leitoso encontrado em células especializadas denominadas células laticíferas. Esse material é alvo de uma série de estudos científicos, devido as suas propriedades farmacológicas e industriais (AOKI *et al.*, 2014). Os laticíferos podem estar presentes em toda a planta, mas prevalecem no caule, nos frutos e principalmente nas folhas (LOPES *et al.*, 2009). Esses laticíferos são classificados em dois tipos, baseados no desenvolvimento e morfologia: os não articulados e os articulados (Figura 1). Os laticíferos não articulados, se originam e são constituídos por uma única célula alongada, que se desenvolve nos espaços intercelulares e, eventualmente, se ramifica, dando origem a uma rede, cuja disposição assemelha-se às hifas de fungos. Os laticíferos articulados, por outro lado, são formados por células dispostas sequencialmente, em fileiras únicas, interconectadas por perfurações em suas paredes celulares (KONNO, 2011).

Entre as plantas laticíferas mais comuns e conhecidas, estão espécies pertencentes às famílias Euphorbiaceae e Apocynaceae, e muitas delas apresentam propriedades bioquímicas interessantes (KONNO, 2011). A Apocynaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas, compreendendo 424 gêneros e cerca de 3700 espécies, distribuídas em cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae (CANAVEZE, 2012). Duas espécies da subfamília Apocynoideae merecem destaque: *Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora*. O látex dessas espécies é de bastante interesse, pois possui funções biológicas e também utilizações na indústria, e elas também merecem destaque pelo fato de sobreviverem em condições ambientais adversas.

Figura 1 - Representação anatômica dos dois tipos de laticíferos. (A) Cortes longitudinais dos caules de *Nerium oleander* (não-articulado) e (B) *Papaver somniferum* (articulado).



Fonte: HAGEL *et al.* (2008).

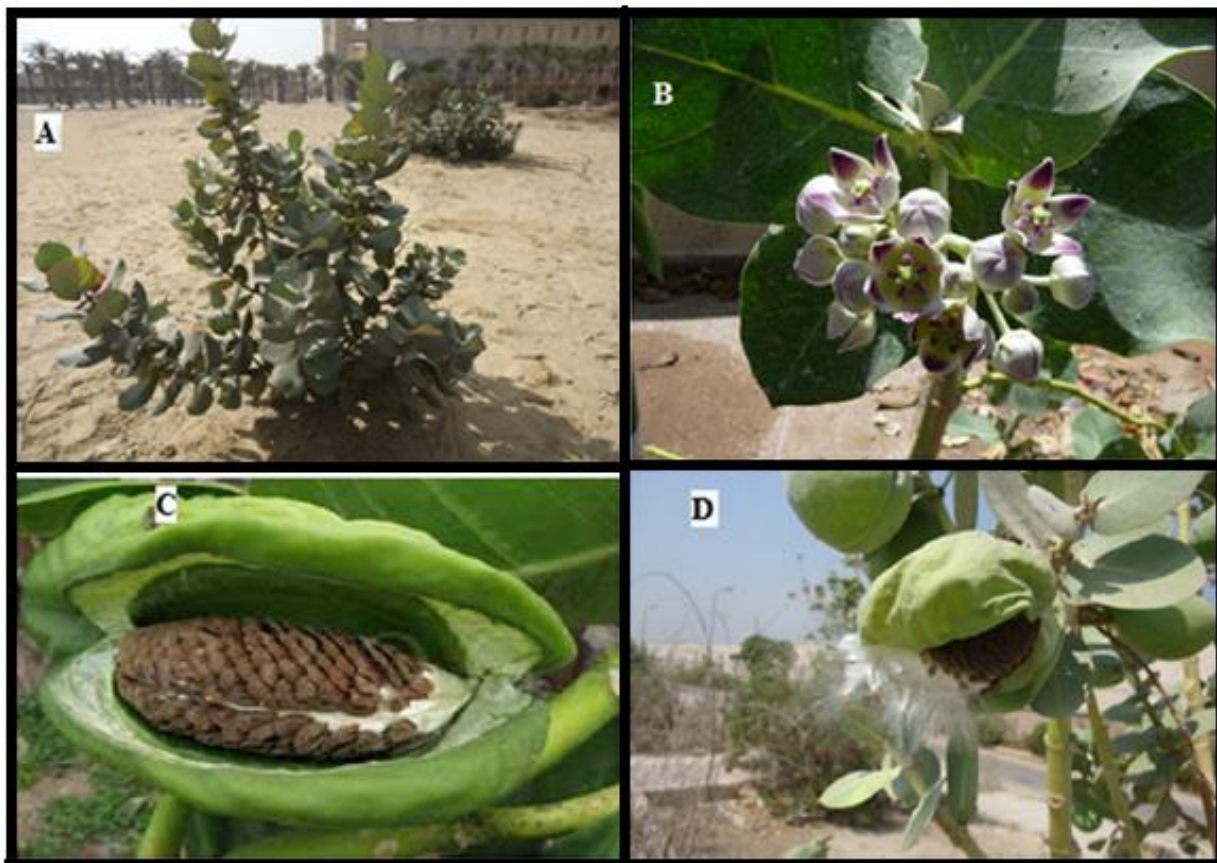
1.1.1 *Calotropis procera* (Ait.) R.Br.

Essa planta possui vários nomes populares, variando de acordo com a região onde é encontrada, podendo ser chamada de: flor-de-seda, algodão-de-seda, algodão da praia, leiteira, paininha-de-seda, queimadeira, pé-de-balão, janaúba e ciúme (COSTA *et al.*, 2009). *C. procera* é uma espécie xerófila, podendo ser encontrada como arbusto ou árvore, crescendo frequentemente em solos salinos e secos (HASSAN *et al.*, 2015).

Com relação às suas características morfológicas, essas plantas possuem um caule verde e lenhoso, que quando injuriado exsuda látex. Suas raízes são profundas, podendo atingir de 3 a 4 m de profundidade. As folhas são grandes, com cerca de 15 cm de comprimento e 10 cm de largura, são sésseis, opostas e grossas (HASSAN *et al.*, 2015). Os frutos têm formato ovoide, sendo inflados e com um tamanho de 8 a 12 cm de comprimento, possuindo uma aparência cerosa, com uma grande quantidade de látex (MURTI *et al.* 2010). Cada fruto possui cerca de 350 a 500 sementes (HASSAN *et al.*, 2015), sendo elas de formato ovoide, com base arredondada e extremidade aguda; achatadas, e com superfície rugosa, na

sua extremidade possuem um grande número de filamentos sedosos que facilitam a dispersão (GOMES, 2008) (Figura 2).

Figura 2 - Aspectos gerais da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **A:** planta adulta; **B:** flores abertas; **C:** fruto globoso maduro; **D:** sementes ligadas a fios de seda em dispersão.



Fonte: HASSAN *et al.*, 2015.

C. procera é bastante utilizada para fins tecnológicos. Um estudo relatou a eficiência dessa espécie no processo de fitorremediação, possuindo a capacidade de extrair metais pesados do solo e acumulá-los nas folhas (D'SOUZA *et al.*, 2010). Essa espécie também é utilizada no controle biológico de plantas daninhas, já que é uma espécie alelopática (SAMREEN *et al.*, 2009).

Essa espécie tem como característica principal a intensa produção de látex branco, que flui abundantemente quando se rompem os tecidos. Muitos autores têm demonstrado várias propriedades do látex de *C. procera*, como hemólise das células sanguíneas e atividade antiplasmodial (SHARMA *et al.*, 2001), ação cicatrizante (RASIK *et al.*, 1999), antitumoral (CHOEDON *et al.*, 2006), antipirética (DEWAN *et al.*, 2000b), analgésica (DEWAN *et al.*,

2000a), anti-inflamatória (KUMAR *et al.*, 2014), antibacteriana (LARHSINE *et al.*, 1999), larvicida e inseticida (RAMOS *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2010) e preventiva contra choque séptico (LIMA-FILHO *et al.*, 2010).

Uma propriedade fisiológica bem característica dessa espécie é a manutenção do crescimento e sobrevivência quando exposta a condições de seca e à salinidade. Essa planta é considerada uma das mais tolerantes do deserto, conseguindo manter os seus processos fisiológicos sob condições adversas, como déficit hídrico, solos salinos e pobres em nutrientes e altas temperaturas (BOUTRAA, 2010). Sharma (1934) afirma que essa espécie vegetal ocorre em áreas de baixa pluviosidade, com precipitação anual variando de 150 a 1.000 mm e tolera altitudes de 1.000 metros e temperaturas entre 20 e 30 °C. Porém, existem poucos relatos na literatura sobre quais mecanismos de defesa são acionados quando *C. procera* é submetida a estresses abióticos.

1.1.2 Cryptostegia grandiflora R. Br.

Esta espécie é endêmica de Madagascar (África), sendo amplamente distribuída em áreas tropicais. Ela possui muitos nomes populares, entre os mais comuns estão o de alamanda-roxa, boca-de-leão, unha-de-onça e viúva alegre. É popularmente conhecida no estado do Ceará como “unha-de-gato”, “bombom” e “unha-de-bruxa” (CAVALHEIRO, 2010).

Esta planta é arbustiva, com caule, folhas e frutos que exsudam látex quando seus tecidos são danificados. Suas folhas são simples e opostas, com nervura central bem marcada e esbranquiçada (SOUZA, 2014) e as sementes possuem um grande número de filamentos sedosos na extremidade (Figura 3).

Figura 3 - Aspectos gerais da planta *Cryptostegia grandiflora*. **A**: frutos maduros com sementes ligadas a fibras de seda; **B**: planta jovem; **C**: fruto imaturo.



Fonte: NIKHARGE (2014).

Algumas atividades biológicas relacionadas diretamente ao látex de *C. grandiflora* já foram descritas na literatura, como a atividade pró-inflamatória, através da migração de neutrófilos e aumento da permeabilidade vascular (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009); atividade larvicida, sendo um agente eficaz contra o mosquito *Aedes aegypti* (RAMOS *et al.*, 2009); atividade antifúngica (RAMOS *et al.*, 2014); e indutor da coagulação sanguínea (VIANA *et al.*, 2013).

A resistência da espécie a adversidade ambiental é uma característica bem peculiar, uma vez que ela sobrevive a condições abióticas desfavoráveis, porém não há registro científico sobre os mecanismos bioquímicos e fisiológicos usados na defesa contra essas adversidades.

1.2 Aspectos gerais da salinidade e seus efeitos nas plantas.

A natureza séssil das plantas causa uma exposição direta a uma gama de estresses que podem causar danos ao seu metabolismo. Esses estresses podem ser de natureza biótica ou abiótica. A salinidade é um estresse abiótico que afeta a produtividade agrícola principalmente em regiões áridas e semiáridas do mundo (MUNNS, 2002; FLOWERS, 2004; MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Os solos salinos são um problema de escala mundial. Estima-se que 830 a 950 milhões de hectares no mundo sejam afetados com este problema (TEAKLE; TYERMAN, 2010; HASEGAWA, 2013).

Os efeitos deletérios da salinidade nas plantas estão associados a dois principais motivos: ao redução do potencial osmótico do solo (efeitos osmóticos) e/ou acúmulo de íons tóxicos para planta (efeitos iônicos). Os efeitos iônicos são decorrentes da elevada absorção de íons Na^+ e Cl^- , que podem atingir níveis tóxicos dentro das plantas, desfavorecendo a homeostase iônica das células (ZHU, 2003). Os efeitos osmóticos são causados pela alta concentração de sais no ambiente radicular reduzindo o potencial osmótico do solo, o que restringe a capacidade das plantas em absorver água (ASHRAF; HARRIS, 2004; MUNNS; TESTER, 2008). A salinidade também pode induzir o estresse oxidativo ao provocar o acúmulo de **Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's)**, causando danos às estruturas celulares (MITTER, 2000). Os solos salinos também afetam a nutrição da planta, pelo fato de dificultar a disponibilidade de nutrientes e sais minerais (ZHU, 2003).

Existe grande variabilidade de comportamento entre as culturas com relação à tolerância à salinidade. Algumas plantas possuem mecanismos de adaptação a solos salinos, tornando-se resistentes, como por exemplo, as espécies classificadas como halófitas, que crescem rápido ou lentamente em concentrações de NaCl de 200 a 300 mM e chegam a tolerar concentrações de sal de até 700 mM (GREENWAY; MUNNS, 1980). Já outras espécies são menos tolerantes à salinidade, as plantas glicófitas, as quais possuem o seu crescimento inibido quando cultivadas em solos salinos.

A existência de plantas tolerantes e sensíveis à salinidade evidencia a presença de fatores genéticos que influenciam a tolerância aos sais, sendo de interesse o estudo desses fatores (YAMAGUCHI; BLUMWALD, 2005).

1.3 Mecanismos de defesa das plantas à salinidade

Como resposta ao estresse salino, as plantas desenvolveram mecanismos que favorecem a sua sobrevivência nessa condição. Tais mecanismos envolvem processos bioquímicos e moleculares que foram evoluindo através de pressões ambientais. Os mecanismos bioquímicos incluem a homeostase iônica, a homeostase osmótica, indução de enzimas e/ou compostos antioxidantes entre outras respostas.

Os processos moleculares de tolerância ao estresse salino incluem a regulação positiva ou negativa de genes. Estes genes que possuem sua expressão modificada quando expostos a estresse, geralmente indicam a produção de RNA ou proteína com funções

adaptativas às condições adversas (XIONG; ZHU, 2002; PARIDA; DAS, 2005, BRESSAN *et al.*, 2008; GUPTA; HUANG, 2014). Sabe-se que a tolerância de plantas à salinidade é um fator multigênico, e que esses genes têm como produto final proteínas que estão relacionadas com a defesa vegetal (PARIDA; DAS, 2005). Tais genes codificam proteínas com funções fisiológicas variadas como, por exemplo, proteínas relacionadas à fotossíntese (ZOU *et al.*, 2009), síntese de compostos solúveis compatíveis (ROSHANDEL; FLOWERS, 2009), proteínas que compartimentalizam e excluem íons tóxicos (CHAKRABORTY *et al.*, 2012) e enzimas do sistema antioxidativo.

1.3.1 Homeostase iônica de plantas sob estresse salino

Durante a exposição à salinidade, os solutos mais acessíveis para as plantas são os íons Na^+ e Cl^- , assim existe uma tendência de elevar a absorção deles, gerando toxicidade celular. A elevação da concentração desses íons no solo dificulta também a aquisição de K^+ e de outros nutrientes essenciais para o desenvolvimento vegetal (ZHU, 2003; BRESSAN *et al.*, 2008). O K^+ é ativador de mais de 50 enzimas do metabolismo vegetal e, apesar da similaridade atômica, não pode ser substituído pelo Na^+ nessa função, de modo que uma alta concentração de Na^+ ou uma alta relação Na^+/K^+ acarretará a interrupção de vários processos metabólicos essenciais (WILLADINO; CÂMARA, 2010). A sobrevivência das plantas em ambientes salinos é dependente da manutenção da concentração iônica intracelular, a qual é importante para a sustentação dos processos metabólicos que controlam o crescimento e o desenvolvimento da planta (NIU *et al.*, 1995).

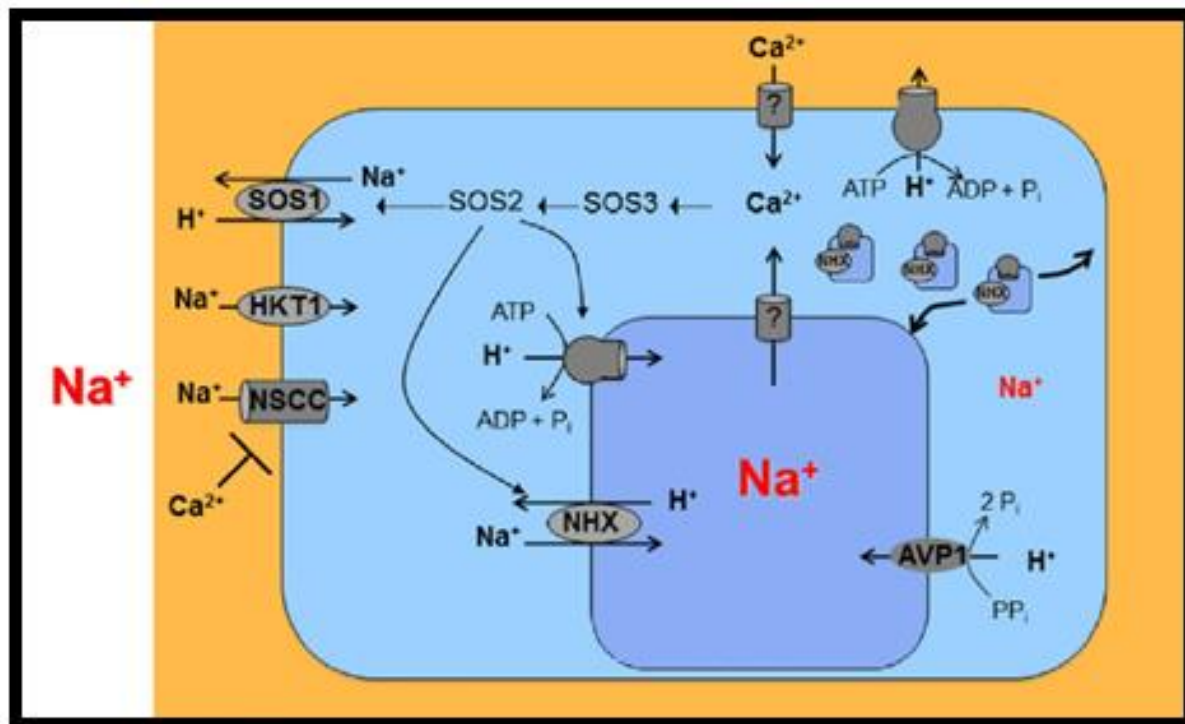
Sabe-se que os íons Na^+ podem ser absorvidos de duas principais formas: através de proteínas transportadoras de K^+ ou através de transporte apoplástico (BLUMWALD *et al.*, 2000). Existem três transportadores de K^+ : o de alta afinidade por K^+ (HKT, do inglês, **H**igh **T**ransport **K**⁺), de baixa afinidade por K^+ (LKT, do inglês, **L**ow **T**ransport **K**⁺) e os canais de cátions não sensíveis à voltagem (NSCC, do inglês, **N**onselective **C**ation **C**hannels) (MAATHUIS; AMTMANN, 1999). Dentre esses transportadores, as proteínas da família HKT representam um sistema importante de co-transporte tipo simporte Na^+/K^+ , já os transportadores NSCC são as principais vias de influxo de Na^+ nas células sob salinidade (SILVEIRA *et al.*, 2010). O transporte de Na^+ via apoplasto foi apresentado em alguns estudos realizados com o arroz, e ele consiste na absorção desse íon mediado pelo fluxo transpiratório (YEO *et al.*, 1999).

Como estratégia para evitar um possível acúmulo de íons Na^+ e manter os níveis de K^+ , as plantas desenvolveram mecanismos de exclusão e/ou compartimentação dos íons tóxicos, mantendo assim a homeostase iônica (ASHRAF; HARRIS, 2004; PRISCO; GOMES-FILHO, 2010).

Nas plantas, o principal mecanismo de exclusão de Na^+ para a região apoplástica é mediada por um sistema que envolve proteínas H^+ -ATPases e transportadores antiporte Na^+/H^+ presentes na membrana plasmática (BLUMWALD *et al.*, 2000; MANSOUR *et al.*, 2003). As H^+ -ATPases são bombas eletrogênicas que realizam o transporte ativo primário de H^+ , utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP (NIU *et al.*, 1995; PARIDA; DAS, 2005). Como consequência da atividade das H^+ -ATPases, o acúmulo de H^+ é gerado na parte apoplástica, formando um gradiente de potencial eletroquímico que é utilizado na exclusão de Na^+ mediada por transportadores Na^+/H^+ do tipo antiporte presentes na membrana plasmática. Assim, esses transportadores acoplam o movimento de H^+ para dentro da célula ao movimento de Na^+ para fora da célula, contra um gradiente de potencial eletroquímico (APSE; BLUMWALD, 2002; BLUMWALD *et al.*, 2000; PARIDA; DAS, 2005).

Um tipo de transportador antiporte Na^+/H^+ são as proteínas SOS1 (SOS, do inglês, **Salt Overly Sensitive**). Essas proteínas estão localizadas na membrana plasmática e atuam na exclusão do excesso de Na^+ celular, pelo contratransporte Na^+/H^+ (BLUMWALD *et al.*, 2000; SHI; ZHU, 2002). Segundo o modelo proposto por Hasegawa (2013), a presença de concentrações elevadas de NaCl na parte apoplástica leva a um aumento no teor de Ca^{2+} livre no citosol, que modula a atividade de proteínas quinases dependentes desse íon (a SOS2 e a SOS3), no entanto esse mecanismo de aumento na quantidade Ca^{2+} livre ainda é desconhecido. A ativação dessas quinases sinaliza a ação do contratransporte efetuado pelas proteínas SOS1. O mecanismo de contratransporte Na^+/H^+ dá-se através da diferença de potencial de H^+ gerado pelas H^+ -ATPases (Figura 4).

Figura 4 - Representação do ajuste iônico. Evidenciando os canais de entrada de Na^+ (NSCC e HKT1), o transportador de Na^+ para a região apoplástica (SOS1), os transportadores de Na^+ para o vacúolo (NHX) e as H^+ ATPases (AVP1).



Fonte: Hasegawa (2013)

Além do efluxo de Na^+ , outro mecanismo importante para a manutenção da homeostase iônica é a compartimentalização dos íons no vacúolo. Esse mecanismo é mediado por uma proteína transportadora presente na membrana do vacúolo (NHX1), que transporta Na^+/H^+ de forma antiporte, e que é ativada pela via de sinalização das quinases dependente de Ca^{2+} (SOS3-SOS2). A NHX1 utiliza o gradiente de potencial eletroquímico gerado pelas H^+ -ATPases pirofosfatases localizadas na membrana do vacúolo como força eletroquímica para o transporte Na^+/H^+ (APSE; BLUMWALD, 2002). O funcionamento desses transportadores Na^+/H^+ do tipo antiporte é de grande importância em plantas tolerantes (GREENWAY; MUNNS, 1980).

O acúmulo de grandes quantidades de Na^+ e Cl^- no vacúolo evita seus efeitos deletérios em outras partes do citoplasma e favorece a entrada de água nas células, mesmo em um ambiente de baixo potencial osmótico e hídrico (BLUMWALD, 2000; ZHU, 2003).

Os mecanismos que controlam a absorção e o acúmulo do Cl^- também são de grande relevância para a homeostase iônica das plantas em condições de salinidade. Contudo, ao contrário do que se tem para o Na^+ , o modo de absorção do Cl^- pelas plantas e o controle da sua concentração nas células vegetais são ainda pouco conhecidos (TYERMANN; SKERRETT, 1999; PARIDA; DAS, 2005). Alternativamente, em altas concentrações de sais, o transporte do cloreto ocorreria passivamente através de canais permeáveis ao nitrato (SKERRETT; TYERMANN, 1994). Alguns autores sugerem que a compartimentalização do Cl^- no vacúolo pode ser alcançada através de canais, sendo o gradiente de pH gerado pelo bombeamento de prótons através do tonoplasto a principal força termodinâmica para o transporte. Além disso, a compartimentalização do Cl^- no vacúolo poderia ocorrer ativamente por um transportador H^+ /ânion do tipo antiporte (NIU *et al.*, 1995).

1.3.2 Homeostase osmótica

A salinidade diminui o potencial osmótico e o potencial hídrico do solo, provocando uma diminuição no gradiente de potencial hídrico entre o solo e a planta, e conseqüentemente, dificultando a absorção de água pelas células vegetais (MANSOUR *et al.*, 2003; PRISCO; FILHO, 2010). Como ação protetora a essa redução no potencial hídrico, as plantas passam a produzir compostos que diminuem o potencial osmótico e favorecem a absorção de água. Esse mecanismo é conhecido como ajuste osmótico celular ou osmorregulação, o qual contribui para a manutenção da abertura estomática, para sustentação dos processos fotossintéticos e para a expansão celular (SERRAJ; SINCLAIR, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2009).

O acúmulo de solutos orgânicos é um processo comum em plantas submetidas a estresses ambientais, tais como o hídrico e o salino (MUNNS, 2002). Ao contrário dos solutos inorgânicos, que inibem as atividades de muitas enzimas citosólicas, os solutos orgânicos, mesmo em altas concentrações, não interferem no metabolismo celular, sendo por isso também chamados de solutos compatíveis (SAIRAM; TYAGI, 2004). Os solutos orgânicos compartilham algumas propriedades, entre elas, o fato de permanecerem invariáveis em pH neutro e de serem altamente solúveis em água (HASEGAWA *et al.*, 2000). Além da função de ajuste osmótico, acredita-se também que os solutos orgânicos possam contribuir para a estabilidade das proteínas e das membranas celulares, bem como exercer efeitos protetores contra espécies reativas de oxigênio (ASHRAF; FOOLAD, 2007; GREENWAY; MUNNS, 1980; SMIRNOFF, 1998).

Os solutos compatíveis constituem um pequeno grupo de substâncias de natureza química distinta, destacando-se: aminoácidos, compostos amônio-quaternários, polióis, açúcares solúveis ou poliméricos (HASEGAWA *et al.*, 2000). Entre os compostos orgânicos acumulados sobre condições de estresse abiótico, a síntese do aminoácido prolina e de açúcares solúveis é bem apresentada na literatura (PATADE *et al.*, 2008; GHANE *et al.*, 2014). O papel da prolina é bastante discutido, e sabe-se que, além do papel osmótico, ela regula o estoque de nitrogênio na célula e protege as membranas e proteínas contra danos causados pelos sais (ASHRAF; HARRIS, 2004). Os carboidratos, tais como glicose, frutose e sacarose também possuem múltiplas funções, a exemplo do ajuste osmótico e armazenamento de carbono (PARIDA; DAS, 2005).

Além da síntese de compostos orgânicos, as plantas possuem outros mecanismos de ajuste osmótico. Estes mecanismos, referem-se à síntese de proteínas de membrana envolvidas no movimento da água entre os meios intracelular e extracelular (HASEGAWA *et al.*, 2000). Tais proteínas são denominadas aquaporinas e fazem parte de uma superfamília altamente conservadas no reino vegetal, conhecidas como MIP (do inglês, **M**ajor **I**ntrinsic **P**rotein **S**uper-family), que se apresentam sob múltiplas isoformas (TYERMAN; SKERRETT, 1999). As aquaporinas aumentam a permeabilidade das membranas e atuam mediando o transporte de moléculas de água a favor do gradiente hídrico. Essas proteínas podem transportar também pequenas moléculas, como glicerol, solutos e íons (TYERMAN; SKERRETT, 1999; ZHANG *et al.*, 2006). Assim, o aumento na síntese dessas proteínas favorece a sobrevivência das plantas em ambientes salinos e secos.

1.3.3 Proteção contra o estresse oxidativo

As plantas quando expostas a estresse salino tendem a ativar mecanismos de defesa que visam amenizar os danos iônicos e osmóticos, porém apenas esses mecanismos não são suficientes para elas se tornarem tolerantes a esse tipo de estresse, sendo necessário desencadear mecanismos de proteção contra estresses secundários como o estresse oxidativo (SILVEIRA *et al.*, 2010).

As EROs são compostos reativos frequentemente produzido por seres aeróbicos. Durante o processos respiratório e fotossintético, as plantas produzem EROs, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais livres superóxido ($^{\cdot}O_2$) e hidroxil (OH^{\cdot}), que são capazes de oxidar lipídios de membranas, desnaturar proteínas e reagir com DNA (PRISCO;

FILHO, 2010). As plantas que estão sob condições ótimas neutralizam esses efeitos deletérios graças aos antioxidantes por elas produzidos. Quando a produção desses antioxidantes não é suficiente para neutralizar as EROs, elas se acumulam e a planta passa a sofrer estresse oxidativo (SCANDALIOS, 2002; AZEVEDO NETO *et al.*, 2008). Estudos mostram que, sob condições de estresse salino, as plantas tendem a aumentar a quantidade de EROs (AZEVEDO NETO *et al.*, 2005).

Existem dois mecanismos de eliminação de EROs, o enzimático e o não enzimático. Os mecanismos não enzimáticos referem-se à síntese de moléculas como flavonóides, ascorbato, carotenóides e poliaminas, que são compostos com ação protetora na célula vegetal (LAWLOR; CORNIC, 2002). Essas moléculas desempenham um papel-chave na eliminação de EROs nas plantas, servindo como um agente redutor doando elétrons para EROs e as deixando em um estado químico menos nocivo (ASADA, 1999)

Como resposta de defesa enzimática às EROs, as plantas aumentam a transcrição e tradução das enzimas do sistema antioxidativo. As principais enzimas do sistema antioxidativo são a superóxido dismutase (SOD; E.C. 1.15.1.1), a catalase (CAT; E.C. 1.11.1.6), a peroxidase do ascorbato (APX; E.C. 1.11.1.11), a peroxidase da glutatona (GPX; E.C. 1.11.1.9) e a peroxirredoxina (PrxR; E.C. 1.11.1.15), além da peroxidase do guaiacol (G-POD; E.C. 1.11.1.7), que também pode contribuir para a eliminação de EROs (PARIDA; DAS, 2005). Essas enzimas agem convertendo as espécies reativas de oxigênio em produtos menos tóxicos ou não tóxicos à biomoléculas.

O radical superóxido é produzido regularmente nos cloroplastos e mitocôndrias, embora pequenas quantidades também sejam produzidas nos peroxissomos, glioxissomos e retículo endoplasmático (ARORA *et al.*, 2002). A SOD, enzima presente em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos, converte o $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 . Em seguida, as enzimas APX, CAT, GPX e G-POD, subsequentemente, convertem o H_2O_2 à H_2O e O_2 (MUNNS; TESTER, 2008).

Sairam e colaboradores (1998) demonstraram que os sistemas de remoção de EROs pelas enzimas ascorbato peroxidase, glutatona redutase e catalase são importantes para a diminuição da peroxidação lipídica, mantendo a estabilidade de membranas, bem como os conteúdos de clorofilas e carotenóides presentes.

1.4 Osmotinas

As osmotinas são proteínas que possuem estruturas primárias semelhantes à taumatinas, proteína presente nos frutos da planta tropical *Thaumatococcus daniellii*. Tanto as osmotinas como taumatinas pertencem à família 5 das PR- proteínas (do inglês, **Pathogenesis Related Proteins**) (LIU *et al.*, 2010). As PR-proteínas são definidas como proteínas sintetizadas pelas plantas quando em situações de patogenicidade. Assim estas proteínas são produzidas quando as plantas estão em contato direto com o estresse ou quando são submetidos a sinalizadores de estresses (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; VAN LOON; PIETERSE, 2006).

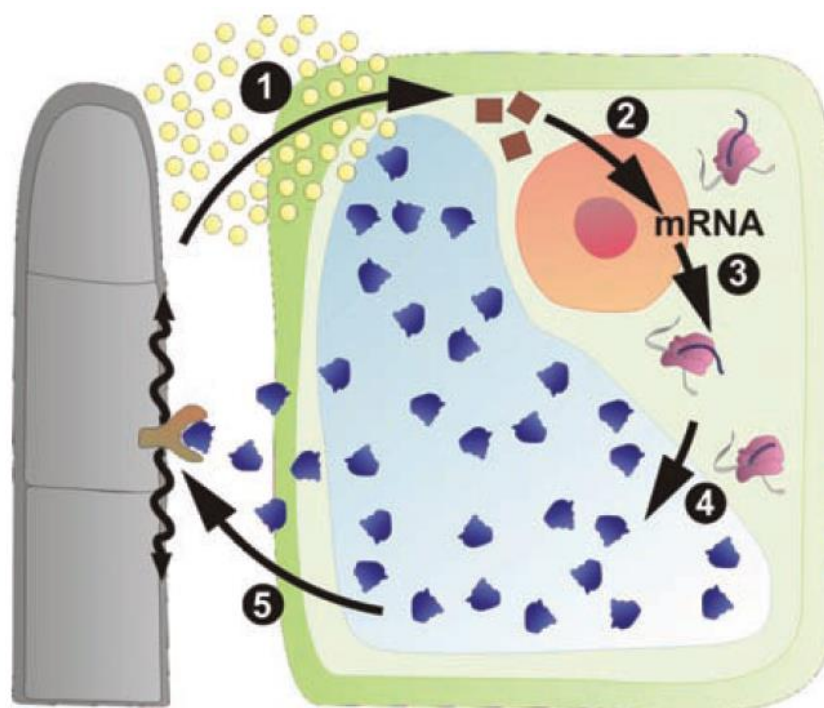
A primeira osmotina foi descrita em culturas de células de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) adaptadas às condições de salinidade (SINGH *et al.*, 1987). Após a descoberta da osmotina, muitos estudos têm demonstrado que a sua síntese em plantas é regulada por diversos sinais hormonais e ambientais, incluindo infecções fúngicas, injúria mecânica, salinidade, dessecação, frio, radiação ultravioleta e hormônios, como auxinas, etileno e ácido abscísico (NOORI; SOKHANSANJ, 2008). Essas proteínas são moléculas indispensáveis para resistência vegetal, pois estão associadas à defesa das plantas a estresses bióticos e abióticos.

As osmotinas podem ser encontradas em diferentes tecidos vegetais, como nas raízes, epiderme, corola e botões florais imaturos, sendo quase indetectáveis em outros tecidos (VIKTOROVA *et al.*, 2012). Entretanto, alguns estudos identificaram a presença da osmotina em látex (SUBROTO *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2011a; SOUZA, 2014). Como características em comum das osmotinas, encontram-se a propriedade de serem ricas em cisteína, possuem baixo peso molecular, estabilidade em pH baixo, estabilidade térmica e resistência à degradação por proteases (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

Muitos estudos descrevem o papel da osmotina na defesa contra patógenos. Em plantas de tabaco e tomate, foi descoberto que as osmotinas são induzidas quando as plantas estão em contato com agentes patogênicos de origem viral e fúngica (STINTZI *et al.*, 1993; WOLOSHUK *et al.*, 1991), indicando uma provável relação com os mecanismos de resistência a ataques patogênicos. Existem relatos na literatura de que a superexpressão dessas proteínas em plantas susceptíveis confere resistência a patógenos (RAJAM *et al.*, 2007).

A elucidação do mecanismo de ação das osmotinas sobre os fungos ainda é alvo de muitos estudos. Um provável mecanismo de ação dá-se pela interação da osmotina com proteínas específicas da membrana plasmática dos microrganismos e, por meio de transdução de sinais, levando à morte celular programada como resultado acúmulo de espécies reativas de oxigênio (NARASIMHAN *et al.*, 2005), alternativamente a osmotina pode hidrolisar β -1,3-glucano (LAURENCE *et al.*, 2003), componente da parede celular dos fungos (Figura 5). A capacidade das osmotinas em inibir o crescimento de hifas e a germinação de esporos é diretamente relacionada com o aumento da permeabilidade da membrana plasmática pela incapacidade das células de manterem o gradiente de pH (VIKTOROVA *et al.*, 2012).

Figura 5 - Mecanismo de ação antifúngica da osmotina. (1) liberação de elicitores pelo patógeno (2) transcrição de RNAm (3) tradução da proteína (4) direcionamento da proteína para o vacúolo (5) liberação da osmotina e interação com o receptor celular do fungo causando danos na membrana do mesmo e apoptose



Fonte: VIKTOROVA *et al.* (2012).

Além da defesa contra agentes patogênicos, existem muitos estudos que comprovam a ação protetora da osmotina a danos abióticos. Estudos mostram a relação da osmotina na proteção de estresses causados por danos mecânicos (NELSON, 1992), por resfriamento (ZHU; CHEN; LI, 1995; HONG *et al.*, 2004) e déficit hídrico (ZHU; CHEN; LI, 1995).

A relação da osmotina com o estresse salino também é bastante estudada. Trabalhos realizados por Onishi *et al.* (2006) mostraram que a expressão do RNAm da osmotina foi induzida em raízes de soja (*Glycine max*) por ácido abscísico, escassez de água ou alta concentração de sal. Outro estudo demonstrou que plantas de morangueiro, expressando um gene codificando uma osmotina de *N. tabacum*, foi resistente a altas concentrações de sal (HUSAINI; ABDIN, 2008). A tolerância à salinidade conferida pela osmotina está ligada a sua ação como soluto compatível, sendo bastante útil para aumentar o potencial osmótico das células (VIKTOROVA *et al.*, 2012), fazendo dela um eficiente agente osmoprotetor.

Outro ponto observado é que a osmotina leva ao acúmulo de prolina (BARTHAKUR *et al.*, 2001). Estudo realizado com o tomate transformado com o gene codificador da osmotina do tabaco revelou um aumento no teor de prolina de 4 a 6 vezes em plantas transformadas, quando comparadas com as plantas do tipo selvagem. O acúmulo de prolina induzida pela osmotina é um mecanismo de tolerância a estresses abióticos, porém este mecanismo ainda é alvo de muitos estudos. Acredita-se que a osmotina não seja um fator de transcrição, já que estudos da sequência de genes dessa proteína em várias espécies mostram que não existem motivos de ligação ao DNA. Assim, supõe-se que a osmotina induza a produção de prolina através de sinalização celular.

As osmotinas possuem estruturas primárias, secundárias e terciárias bastante conservadas (REISS *et al.*, 2006). Um estudo realizado com duas espécies de Apocynaceae descreveu a estrutura tridimensional de osmotinas nativas do látex. Um desses estudos foi realizado com *C. grandiflora*, onde purificou-se do látex uma osmotina de 21,7 kDa. Essa proteína, denominada de CgOsm, é composta por três domínios: o domínio I, que consiste de 11 fitas beta, formando uma conformação do tipo beta sanduíche; o domínio II, que é formado por diversos *loops* que se estendem até o domínio I, e o domínio III, que consiste de um pequeno *loop* (SOUZA, 2014).

No látex de *C. procera*, encontrou-se uma osmotina denominada de CpOsm. Essa proteína foi encontrada em duas isoformas, sendo registrados dois diferentes valores de pI, 8,9 e 9,1, mas uma única sequência N-terminal de aminoácidos foi determinada [ATFTIRNNCPYTIWAAA VPGGGRRLNSGGTWTINVAPGTA]. Essas duas isoformas possuem massas moleculares de 22,3 e 22,5 kDa (FREITAS *et al.*, 2011a). A CpOsm, é composta por três domínios: o domínio I, que consiste de duas folhas betas formadas por 5 e

6 fitas beta, formando uma conformação do tipo beta sanduíche, em que as duas folhas são posicionadas opostamente e são estabilizadas por pontes de hidrogênio e duas pontes dissulfeto; o domínio II, que é estabilizado por quatro pontes dissulfeto e é constituído principalmente por estruturas randômicas, aleatórias e contém uma α -hélice de nove resíduos de aminoácidos; e o domínio III, o menor dos domínios, que é constituído por duas pequenas fitas beta que contém 15 resíduos de aminoácidos estabilizados também por duas pontes dissulfeto (OLIVEIRA, 2014).

Essas osmotinas também já foram estudadas em relação as suas atribuições biológicas. Análises *in silico* revelaram que a osmotina do látex de *C. grandiflora* (CgOsm) possui segmentos estruturais com *foldings* similar a adiponectina, enquanto que ensaios de modelagem molecular demonstraram que CgOsm poderia interagir com o receptor de adiponectina favoravelmente, sugerindo que essa osmotina mimetize atividades da adiponectina humana (SOUZA, 2014). A CpOsm apresentou atividade antifúngica sobre *Fusarium solani*, *Neurospora sp.* e *Colletotrichum gloeosporioides*, inibindo a germinação de esporos e o crescimento vegetativo de hifas (FREITAS *et al.*, 2011). Contudo, não existe registro na literatura que avalie alguma relação das CpOsm e CgOsm com a proteção ao estresse salino.

1.5 Cultura *in vitro* de tecidos vegetais

A cultura de tecidos vegetais consiste em um conjunto de técnicas que possui várias aplicações, podendo ser usada em diferentes áreas, como na bioquímica, fisiologia, fitopatologia e genética. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vegetal, denominados de explantes, passam por um processo de desinfestação, e são cultivados em formulações nutritivas apropriadas, suplementadas com reguladores de crescimento sob condições assépticas (ANDRADE, 2002).

Os explantes podem ser submetidos a processos de embriogênese somática ou organogênese, os quais podem ocorrer de forma direta ou indireta. A embriogênese somática é uma via de desenvolvimento na qual a formação de embriões é induzida de células somáticas; já na organogênese, o órgão vegetal é induzido e se desenvolve diretamente de um explante (MANTELL *et al.*, 1994), sendo considerados processos diretos. Já nas vias de regeneração indireta, formam-se um aglomerado de células denominado de calos e subsequentemente surge a formação de embriões ou órgãos.

Muitas vezes existe a formação de calos, esse são grupos ou massas de células em crescimento desordenado os quais podem apresentar certo grau de diferenciação (NOBÉCOURT, 1939). Esses calos podem apresentar estruturas compactas e/ou friáveis. Calos friáveis são formados por divisão celular rápida, e compostos por células indiferenciadas, altamente vacuoladas e frouxamente ligadas. Por outro lado, os calos compactos são formados por células com pequeno espaço intercelular e densamente compactadas, desfavorecendo a rápida divisão celular (IKEUCHI *et al.*, 2013).

A formação dos calos dá-se quando os explantes são expostos a um meio de cultura apropriado, assim as células passam por um processo de desdiferenciação e, conseqüentemente, o explante dá origem a um novo tecido, composto por células não diferenciadas, semelhantes à células meristemáticas, os quais por sua vez são de natureza parenquimatosa (GEORGE *et al.*; 2008). O processo de indução de calos pode ocorrer através de estimulação feita por lesões físicas ou por estimulações químicas, sendo realizadas por fitorreguladores adicionados ao meio nutritivo (IKEUCHI *et al.*, 2013). O que determina o nível de diferenciação e desdiferenciação das células do explante é o equilíbrio entre os hormônios auxina e citocinina (SKOOG; MILLER, 1957 *apud* IKEUCHI *et al.*, 2013). Combinações de auxinas e citocininas em cultura *in vitro* são capazes de promover diferenciação celular, a embriogênese e também a organogênese.

A técnica de cultura de células e tecidos fornece ferramentas para várias pesquisas biotecnológicas, sendo muito utilizada em estudos de seleção ou avaliação da tolerância de plantas e também como modelo de estudo para processos fisiológicos de espécies vegetais.

1.5.1 Seleção de espécies tolerantes in vitro

A produtividade agrícola é frequentemente prejudicada em decorrência de estresses bióticos e abióticos, os quais são responsáveis por perdas econômicas em todo o mundo. Como uma forma de amenizar esses problemas, pesquisas científicas têm tentado traçar estratégias para reduzir os danos causados aos vegetais (RAI *et al.*, 2011).

A engenharia genética desenvolve muitos estudos com base na introdução de genes em plantas, com a intenção de torná-las tolerantes ao estresse (YAMAGUCHI; BLUMWALD, 2005). No entanto, essa técnica possui alguns fatores limitantes, já que é complexa e necessita de um alto investimento econômico (KONISHI; SUGIYAMA, 2003). As

técnicas de cultura de tecidos vegetais surgiram como uma alternativa viável e de baixo custo para o desenvolvimento de plantas tolerantes ao estresse. Essas técnicas possuem inúmeras vantagens, como o fato de trabalhar em condições controladas, produzindo plantas mais uniformes e saudáveis, a fim de selecionar espécies tolerantes ao estresse com um menor custo de produção além de produzir materiais vegetais assépticos (SAKHANOKHO; KELLEY, 2009).

A seleção *in vitro* consiste em cultivar células, tecidos ou órgãos vegetais em meio nutritivo contendo agentes seletivos. Esses agentes oferecem a oportunidade de selecionar características desejáveis das plantas. Entre os agentes mais utilizados para a seleção *in vitro*, podemos destacar o NaCl, que seleciona materiais tolerantes ao sal, o PEG (Polietileno glicol) e o manitol, que estão relacionados à seleção de espécies tolerantes à seca, e filtrado de fungos ou fitotoxinas, para seleção de espécies tolerantes à doenças (RAI *et al.*, 2012).

Após a realização da técnica de seleção *in vitro*, apenas os explantes capazes de sustentar sua sobrevivência são selecionados. Existem duas formas de seleção de explantes: (a) a que agentes estressantes são gradualmente adicionados durante o tempo e (b) o tratamento de choque, em que os explantes são diretamente submetidos à alta concentração de agente estressante, selecionando apenas os mais resistentes (PUROHIT *et al.*, 1998).

A seleção *in vitro* ocasiona uma condição de estresse nos explantes, provocando distúrbios durante a divisão celular, denominados variações somaclonais (MOHAMED *et al.*, 2000). A maioria das variações somaclonais origina-se de distúrbios ocorridos durante o processo de separação dos cromossomos duplicados na anáfase mitótica, ocasionando poliploidias e aneuploidias nos cromossomos (CANÇADO *et al.*, 2009). Assim, essas variações somaclonais podem, muitas vezes, resultar em uma variedade de organismos com variações fenotípicas de origem genética, úteis na melhoria das culturas.

Apesar das muitas vantagens, o desenvolvimento de plantas tolerantes ao estresse através de seleção *in vitro* apresenta algumas limitações, como a perda da capacidade de regeneração dos explantes e o fenômeno de adaptação epigenética (TAL, 1994). As alterações epigenéticas não são herdáveis e representam alterações na sequência de nucleotídeos na fita de DNA. Numerosos estudos documentam que DNA alterado por metilação é uma das principais causas de modificação epigenética (GUO *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007). Muitos autores sugerem que o problema da adaptação epigenética durante a seleção *in vitro* pode ser

superado pela utilização de seleções em curto prazo, impedindo o desenvolvimento de células epigeneticamente adaptadas (TAL, 1994).

Devido à eficiência das técnicas de seleção *in vitro*, muitos estudos investem em empregar essa técnica para solucionar os problemas da sensibilidade das plantas à salinidade (BARAKAT; ABDEL-LATIF, 1996; GANDONOU *et al.*, 2006). O excesso de sal no solo interfere em vários processos bioquímicos e fisiológicos. Para que as plantas se tornem tolerantes ao estresse, elas passam por mudanças fisiológicas. Assim, acredita-se que as plantas selecionadas sob condições salinas desenvolvem uma série de mecanismos de proteção contra os efeitos nocivos do estresse salino. Entre os mecanismos de tolerância desenvolvidos por espécies selecionadas *in vitro*, encontra-se: redução na taxa de crescimento (QUEIROS *et al.*, 2007), redução no teor de clorofila das plantas (EHSANZADEH *et al.*, 2009), aumento na síntese e na atividade das enzimas do sistema antioxidativo (PIQUERAS *et al.*, 1996, HOSSAIN *et al.*, 2007; LU *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2009), homeostase iônica e síntese de solutos compatíveis (HASSAN *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2009). Estes mecanismos desenvolvidos são úteis para amenizar problemas, como o desequilíbrio iônico, deficiência de minerais, o estresse osmótico, toxicidade causada pelos íons e o estresse oxidativo.

1.5.2 Cultura de tecidos in vitro como uma ferramenta para estudos da fisiologia de plantas

As pesquisas na área de fisiologia vegetal estão concentradas em analisar os comportamentos bioquímicos, fisiológicos e moleculares das plantas em determinadas condições. Frequentemente, torna-se difícil analisar a resposta das plantas a condições de estresse abiótico quando elas são cultivadas em casa de vegetação, devido estarem sujeitas a outros danos além dos desejados para o estudo (PÉREZ-CLEMENTE; GÓMEZ-CADENAS, 2012).

A cultura *in vitro* de tecidos vegetais proporciona ferramentas que auxiliam a padronização das pesquisas, tendo uma importância incontestável, pois minimiza as possibilidades de erros durante o desenvolvimento do experimento. Para obter possíveis estratégias para a resolução de danos causados por estresses bióticos e abióticos, faz-se necessário a compreensão dos processos fisiológicos que levam a adaptação de espécies vegetais em condições adversas. A cultura de células e de tecidos vegetais é um dos meios mais eficazes para o estudo de processos biológicos fundamentais (GHOULAM *et al.*, 2001).

Muitos estudos atuais concentram-se em verificar os mecanismos de defesas de cultura *in vitro* de plantas e células quando submetidas a estresse salino. Nesse contexto, as técnicas de cultura *in vitro* de calos friáveis servem como uma ferramenta útil para estudar as respostas de estresse salino de células indiferenciadas, proporcionando o uso de condições controladas, uniformes e assépticas (SHARMA; RAMAWAT, 2014). Um estudo abrangente do mecanismo de adaptação fisiológica em parâmetro celular seria de grande ajuda para entender os processos de crescimento e adaptação da planta em ambientes hostis (YANG *et al.*, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Neste estudo foi proposto o uso da técnica de cultura *in vitro* de calos de *Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora*, como uma estratégia para avaliar o efeito da salinidade sobre a expressão da osmotina.

Esse interesse de investigar a expressão da osmotina surgiu do fato de terem sido purificadas osmotinas a partir do látex das espécies em estudo. Para a osmotina purificada de *C. procera*, foi encontrada atividade antifúngica, podendo essa proteína estar relacionada com a proteção de mecanismos de defesa contra agentes patogênicos, porém, para a osmotina de *C. grandiflora*, não foi registrada qualquer atividade. Sabendo que a osmotina é uma PR-proteína que está relacionada a estresse osmótico, sugeriu-se estudar a relação delas com o estresse salino nas espécies.

Esta pesquisa abordou três aspectos extremamente relevantes. O primeiro aspecto foi o de permitir o estabelecimento de condições controladas para avaliar o efeito da salinidade em nível celular. O segundo foi o de caracterizar os mecanismos desenvolvidos durante o estresse salino. O terceiro aspecto esteve relacionado com a hipótese de que, em condições de estresse salino, o nível de expressão da osmotina seria aumentado.

Sabe-se que a salinidade é um fator limitante para a produtividade agrícola. Muitos pesquisadores acreditam que a solução para o problema da salinidade depende da compreensão do que acontece com a fisiologia e bioquímica das plantas cultivadas sob essas condições. Os resultados gerados neste trabalho visam contribuir com proposições de como o estresse salino é enfrentado por essas espécies laticíferas. Assim, uma vez que seja elucidado como as células vegetais se comportam em ambientes salinos, fica mais apropriado o estabelecimento de metodologias para amenização destes problemas. Outro fato relevante é o de avaliar a relação da osmotina com os mecanismos adaptativos ao estresse, sugerindo sua relação com a redução dos efeitos deletérios da salinidade, sendo uma molécula alvo para pesquisas de clonagem do gene para transformação genética de plantas de importância agrícola.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do estresse salino em cultura *in vitro* de calos de *Calotropis procera* e *Cryptostegia grandiflora* e analisar a expressão da osmotina em resposta às condições de estresse.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desenvolvimento de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* obtidos a partir de hipocótilo e cultivados *in vitro* sob diferentes concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM);
- Analisar o conteúdo de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ dos calos de *C. procera* e *C. grandiflora* cultivados em condição de estresse salino;
- Determinar o conteúdo de prolina e de açúcares solúveis dos calos de *C. procera* e *C. grandiflora* em condição de estresse salino;
- Avaliar a atividade de enzimas (catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase), envolvidas na remoção de espécies reativas de oxigênio em calos de *C. procera* e *C. grandiflora* cultivados em condição de estresse salino;
- Quantificar a atividade proteolítica dos calos de *C. procera* e *C. grandiflora* cultivados sob condições de estresse salino;
- Determinar o nível de peroxidação de lipídeos dos calos cultivados em condições de estresse como indicativo de dano de membrana;
- Avaliar o nível de transcritos de osmotina em calos de *C. procera* e *C. grandiflora* cultivados em condição de estresse salino;
- Verificar por eletroforese, imunodectecção e espectrometria de massa, se a osmotina é expressa em calos de *C. procera* e *C. grandiflora* cultivados em condição de estresse salino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Reagentes químicos

Os kits para extração de RNA foram adquiridos da QIAGEN. Os reagentes para obtenção das outras análises de biologia molecular foram fornecidos pela Promega. O marcador de massa molecular de ácidos nucleicos usado nas eletroforeses em gel de agarose (Φ X174 RF DNA/Hae III Fragments) foi adquirido da Invitrogen.

Acrilamida, ágar, agarose, ácido 1-naftaleno acético (ANA), cinetina (CIN), marcadores de massa molecular de proteína e membrana de diálise “cut off” 12.000 Da foram obtidos de Sigma ou Sigma-Aldrich Co. USA. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.2 Material vegetal

Exemplares de *C. procera* (Ait) R. Br. e *C. grandiflora* R. Br. foram identificadas por um taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará e depositadas sob exsicatas de número N. 32663 e N. 040409, respectivamente. Frutos de plantas saudáveis crescendo nas proximidades de Fortaleza, Ceará, Brasil, foram usados como fonte de sementes viáveis para realização do trabalho. Após a obtenção dos frutos eles foram armazenados em temperatura ambiente e transportados para o laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Ceará, Brasil.

4.2 Métodos

4.2.1 Germinação das sementes e indução de calos de *C. procera* e *C. grandiflora*.

Sementes de *C. procera* e *C. grandiflora*, foram submetidas à lavagem com detergente comercial diluído e tiveram suas superfícies desinfestadas por imersão em solução etanólica na concentração de 70%, por um período de 5 minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes com água destilada autoclavada. Na sequência, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio (1% cloro ativo), por um período de 15 minutos e finalmente lavadas por três vezes com água destilada autoclavada. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar.

Após a etapa de desinfestação, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com a metade das soluções de macronutrientes e acrescido de sacarose (2%) e ágar (0,7%) (TEIXEIRA *et al.*, 2011). A formulação do meio MS é descrita no Quadro 1. O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,8. Para esterilizar esses meios de cultura, foi utilizada autoclavagem a 121 °C, por 15 minutos. O procedimento de semeadura foi realizado em câmara de fluxo laminar e em seguida este material foi acondicionado em sala de cultura sob fotoperíodo de 16 h.

Após quatro semanas da semeadura, as plântulas das espécies em estudo foram usadas como fonte de explante para indução dos calos, essas plântulas possuíam um tamanho aproximado de 4 cm. Para obtenção dos calos, segmentos de hipocótilo e cotilédone foram cultivados por quatro semanas em meio MS, contendo metade das concentrações de macronutrientes, acrescido de sacarose a 2%, ágar a 0,7% e suplementado com os reguladores de crescimento ácido naftaleno acético (ANA) e cinetina (CIN), nas concentrações de 3,0 µM e 4,6 µM, respectivamente (SURI; RAMAWAT, 1995). O cultivo dos calos foi realizado em placas de Petri contendo 25 mL de meio nutritivo, o qual continha 5 explantes de hipocótilo no tamanho de 1 cm² cortados longitudinalmente e explantes de cotilédones no tamanho de 1 cm². Para o desenvolvimento dos calos, estes foram armazenados em câmara de germinação tipo B.O.D. na ausência de luz a 25 ± 2 °C.

4.2.2 Indução de estresse salino

Após a obtenção de calos friáveis de *C. procera* e *C. grandiflora*, estes foram submetidos ao cultivo em placas de Petri contendo 25 mL de meio MS acrescido de diferentes concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM), cada placa de Petri contendo 5 calos de aproximadamente 1 g cada. O procedimento de obtenção do meio MS foi similar ao anteriormente citado, sendo este acrescido de NaCl. Após a preparação dessa formulação nutritiva, realizou-se medidas da osmolalidade do meio de cultura. Para a determinação desta medida, o meio de cultura foi submetido a uma temperatura de aproximadamente 80 °C para a despolimerização do ágar presente, e em seguida, foi diluído em uma proporção 1:3 em água desionizada. Essa solução diluída foi utilizada para determinação da osmolalidade em microsmômetro (VAPRO 5520, Wesco, Logan, Utah, USA), tomando uma alíquota de 10 µL. Os valores da osmolalidade foram expressos em mmol/kg.

Os calos obtidos passaram 28 dias sob estresse salino e em seguida foram submetidos à análises descritas nos tópicos seguintes.

Quadro 1 - Lista de nutrientes, vitaminas e compostos orgânicos utilizados para formulação do meio de cultura de Murashige e Skoog (MS).

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)
MACRONUTRIENTES	
<i>NH₄NO₃</i>	1650,0
<i>KNO₃</i>	1900,0
<i>CaCl₂2H₂O</i>	440,0
<i>MgSO₄7H₂O</i>	370,0
<i>KH₂PO₄</i>	170,0
MICRONUTRIENTES	
<i>MnSO₄4H₂O</i>	22,3
<i>ZnSO₄7H₂O</i>	8,6
<i>Na₂MoO₄2H₂O</i>	0,25
<i>CoCl₂6H₂O</i>	0,025
<i>CuSO₄5H₂O</i>	0,025
<i>KI</i>	0,83
<i>H₃BO₃</i>	6,2
VITAMINAS E COMPOSTOS ORGÂNICOS	
<i>Ácido nicotínico</i>	0,5
<i>Cloridrato de piridoxina</i>	0,5
<i>Cloridrato de tiamina</i>	0,1
<i>Glicina</i>	2,0

4.2.3 Determinação da taxa de crescimento relativo

Para a determinação da taxa de crescimento relativo (TCR), utilizou-se a metodologia descrita por Lokhande *et al.* (2010). Calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a 28 dias de cultivo na presença de diferentes concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM), tiveram sua TCR determinada pela seguinte equação:

$$TCR = \frac{P_f - P_0}{P_0}$$

Equação 1

Onde: P_0 = peso fresco dos calos no início do tratamento (antes do cultivo em meio com NaCl), P_f = peso fresco após quatro semanas do início do experimento, TCR = taxa de crescimento relativo.

Para a obtenção deste parâmetro, foram utilizadas três repetições, tendo como unidade experimental uma placa de Petri contendo cinco calos. O efeito dos tratamentos foi analisado comparando-se os valores obtidos das três repetições.

4.2.4 Teor de umidade

Para a avaliação desse critério, os calos de *C. procera* e *C. grandiflora*, tiveram seus pesos frescos determinados e logo em seguida foram submetidas ao processo de liofilização. Após isto, o teor de umidade foi determinado pela seguinte equação.

$$\% \text{ Umidade} = \left(\frac{M_f - M_s}{M_f} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: M_s = massa dos calos secos depois de submetidos ao estresse salino, P_i = massa inicial dos calos frescos.

Esta metodologia foi descrita por Lokhande e colaboradores (2010). Para a obtenção deste parâmetro, foram utilizadas três repetições, tendo como unidade experimental uma placa de Petri contendo cinco calos. O efeito dos tratamentos foi analisado comparando-se os valores obtidos das três repetições.

4.2.5 Determinação de íons inorgânicos

Para a determinação dos teores de Na^+ , K^+ e Cl^- , os calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a 28 dias de cultivo, na presença de diferentes concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM), foram liofilizadas para obtenção do material seco. Após isso, o material foi macerado com o auxílio de cadinho de porcelana e pistilo até a obtenção de um pó, e em seguida este material foi armazenado em tubos de ensaio hermeticamente fechados.

Para obtenção do extrato contendo os íons de interesse, foram adicionados em tubos de ensaio 50 mg de pó liofilizado de calos e 10 mL de água desionizada. Após serem hermeticamente fechados, os tubos foram levados a banho-maria a 100 °C, por 1 h, sob agitação periódica. Decorrido esse tempo, o extrato foi filtrado em ponteiras de 5 mL

contendo filtro de algodão. Após a filtragem, as metodologias específicas para determinação dos íons foram empregadas.

Para avaliar as concentrações de sódio e potássio nos extratos obtidos foi utilizada a metodologia descrita por Malavolta e colaboradores (1989). As análises de Na^+ e K^+ foram realizadas através de leituras em fotômetro de chama calibrado em solução padrão de NaCl com 50 ppm de Na^+ .

Já para a determinação das concentrações dos íons Cl^- , foi empregado o método de titulação como descrito por Malavolta e colaboradores (1989), tendo como solução padrão nitrato de prata (AgNO_3), indicando o volume de Cl^- presente no extrato. Para realização dessa análise, foi adicionado 0,5 mL da solução indicadora de K_2CrO_4 (cromato de potássio) a 5% (m/V) em 5 mL dos extratos dos calos. Cada amostra foi titulada lentamente com AgNO_3 a 28 mM, até ocorrer uma mudança de cor indicada através da formação do precipitado de Ag_2CrO_4 , que possui uma coloração marrom. Para a realização dos cálculos, foi considerado que cada 1 mL de nitrato de prata gasto na titulação correspondeu a 1,5 mg de cloreto em 100 mg de matéria seca. Foi utilizado um controle negativo com 5 mL de água deionizada + indicador + Ag_2NO_2 até obtenção da coloração marrom. O volume do controle negativo foi subtraído de cada amostra.

Os conteúdos de Na^+ , K^+ e Cl^- foram expressos em mmol por grama de massa seca (MS). Para a realização dessas análises, utilizaram-se amostras compostas de calos de diferentes repetições, sendo a determinação realizada em triplicata. Os resultados obtidos foram analisados comparando os valores das três repetições.

4.2.6 Teores de solutos orgânicos

4.2.6.1 Prolina

Para a determinação do teor de prolina, utilizaram-se 500 mg de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a 28 dias de cultivo na presença de diferentes concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM). A concentração de prolina foi determinada de acordo com os procedimentos descritos por Bates e colaboradores (1973). Nesta metodologia, 500 mg de calo fresco foi homogeneizado em 20 mL de ácido sulfossalicílico 3%. Em seguida este material foi centrifugado em uma velocidade de 4.000 x g, durante 15 minutos, em temperatura ambiente, e o sobrenadante gerado foi retirado para análise de conteúdo de

prolina. Para tanto, foram adicionados em tubo de ensaio: 1 mL da amostra, 1 mL de ninidrina ácida e 1 mL ácido acético glacial. Para o preparo da ninidrina ácida, foi pesado 1,25 g de ninidrina e dissolvido em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico 6 M. Os tubos de ensaio rosqueáveis foram fechados, agitados vigorosamente e colocados em banho-maria a 100 °C por 1 hora. A reação foi interrompida colocando as amostras em banho de gelo por aproximadamente cinco minutos. Após o resfriamento, as amostras foram retiradas do banho de gelo, mantidas em temperatura ambiente, e em seguida foram adicionados 2 mL de tolueno no meio da reação.

Após a adição do tolueno, os tubos foram agitados vigorosamente, e a fase superior menos densa foi aspirada com o auxílio de pipeta Pasteur e utilizada para a realização das leituras da absorbância em 520 nm. Os teores de prolina das amostras foram determinados através de comparação com uma curva padrão de prolina, utilizando-se como controle negativo o tolueno. As amostras foram compostas de fragmentos de calos de três repetições diferentes, sendo as análises feitas em triplicata.

4.2.6.2 Açúcares solúveis totais

O teor de açúcares solúveis foi determinado de acordo com os procedimentos descritos por Koehler (1952). Para realização desta análise, utilizaram-se 500 mg de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a 28 dias de cultivo na presença de diferentes concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM). Inicialmente, homogeneizou-se em gral de porcelana 500 mg dos calos com álcool etílico 80%. Posteriormente, filtrou-se este material e o mesmo foi levado à estufa para a evaporação do álcool e após a secagem o material foi ressuscitado em 30 mL de H₂O desionizada. Alíquotas de 1 mL das soluções obtidas foram adicionadas a 1 mL do reagente de antrona a 100 °C, por 10 minutos. Em seguida, realizou-se as leituras da absorbância em 620 nm. Para obtenção do reagente de antrona dissolveu-se 50 mg de antrona em 50 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os teores de açúcares das amostras foram determinados através de comparação com uma curva padrão de glicose, utilizando como controle a água desionizada. Esse parâmetro foi determinado através de amostras compostas, formadas por fragmentos de calos de três repetições diferentes, sendo as análises feitas em triplicata. A quantidade de açúcares foi expressa em mg de açúcares solúveis totais por grama de matéria fresca.

4.2.7 Obtenção do extrato proteico

Para a obtenção do extrato proteico, macerou-se em nitrogênio líquido 500 mg de diferentes amostras de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a 28 dias de cultivo na presença de diferentes concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM). Em seguida, adicionaram-se 5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0, contendo EDTA 0,1 mM. Logo após, centrifugou-se o homogeneizado a 12.000 x g, a 4 °C, por 30 minutos, o sobrenadante foi considerado o extrato proteico solúvel. Esse extrato proteico foi utilizado nos testes de atividade das enzimas antioxidativas e atividade proteolítica.

O extrato proteico para a realização dos ensaios de eletroforeses, imunodeteção e espectrometria de massas foi obtido usando a mesma metodologia acima citada, adicionando uma etapa de diálise. Essa diálise foi realizada utilizando uma membrana com capacidade de retenção de moléculas com massa molecular superior a 12 kDa e as amostras foram dialisadas em água destilada por 2 dias. Em seguida, esse extrato proteico foi concentrado pelo processo de liofilização.

4.2.8 Determinação da concentração de proteínas solúveis

A dosagem de proteínas solúveis foi determinada utilizando a metodologia descrita por Bradford (1976). Para essa determinação, 100 µL de amostras foram adicionados a 2,5 mL do reagente de Bradford e a mistura foi agitada vigorosamente em *vortex*. Após 10 minutos em repouso, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. A concentração proteica foi estimada com base em uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

4.2.9 Atividades das enzimas antioxidativas

A atividade das enzimas antioxidativas foram realizadas com os extratos proteicos das amostras de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a 28 dias de cultivo na presença de diferentes concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM). Essas análises foram determinadas através de amostras compostas, formadas por fragmentos de calos de três repetições diferentes, sendo as análises feitas em triplicata.

4.2.9.1 Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX (EC: 1.11.1.1) foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). Nessa metodologia, alíquotas de 0,1 mL de extrato proteico foram adicionadas ao meio de reação composto de 2,7 mL de tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 6,0, contendo ácido ascórbico 0,5 mM. Logo após, adicionou-se 0,2 mL de H₂O₂ 30 mM ao meio de reação e foi acompanhado o decaimento da absorbância a 290 nm. Esta leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no intervalo de 0 a 300 segundos, sendo feita em intervalos sucessivos de 15 segundos. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente extinção molar do ascorbato ($\epsilon = 0,0028 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e seu resultado foi expresso em $\mu\text{M de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF}$, considerando a estequiometria que dois moles de ascorbato reage com um de H₂O₂.

4.2.9.2 *Catalase (CAT)*

A atividade da CAT (EC: 1.11.1.6) foi determinada pelo método descrito por Beer e Sizer (1952). A reação foi iniciada através da adição de 0,05 mL do extrato enzimático no meio de reação contendo 2,95 mL do tampão fosfato de potássio 50 mM, contendo H₂O₂ 20 mM em pH 7. O consumo de H₂O₂ foi monitorado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm. O cálculo da atividade foi feito usando o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ ($\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e seu resultado foi expresso em $\mu\text{M de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF}$.

4.2.9.3 *Peroxidase do guaiacol (G-POD)*

Para determinar a atividade da G-POD (EC 1.11.1.7) foi utilizada a metodologia descrita por Urbanek *et al.* (1991), que consiste de uma mistura reacional contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, acrescido de EDTA 0,1 μM , em pH 7,0, H₂O₂ 15 mM e guaiacol 0,02M. A reação foi iniciada pela adição de 10 μL do extrato enzimático ao meio de reação e o aumento da absorbância foi medido a 470 nm por minuto. A atividade foi determinada pela quantidade de tetraguaicol formado, usando seu coeficiente de extinção molar como base para cálculos ($26,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), levando em consideração que 4 moles de guaiacol são necessários para reduzir 1 mol de H₂O₂. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M de H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ MF}$.

4.2.10 *Atividade proteolítica*

A atividade proteolítica total foi testada através da reação colorimétrica, em que se utiliza azocaseína como um substrato não específico. Essa proteína, ao sofrer degradação por

proteases, libera um composto denominado de azo que funciona como um cromóforo, sendo detectado no comprimento de onda de 420 nm.

Para a realização desse ensaio, foi utilizada alíquota de 100 μL da amostra dos extratos proteicos de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a 28 dias de cultivo na presença de diferentes concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM). Essas amostras foram adicionadas à reação com 200 μL de azocaseína 1% e o volume ajustado para 500 μL com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após 60 minutos a 37 °C, a reação foi parada com adição de 300 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Os tubos foram centrifugados a 5.000 x g, por 10 minutos, a 25 °C e 400 μL do sobrenadante foram misturados com 400 μL de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M. O desenvolvimento de cor foi medido por espectrofotômetro a 420 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de proteína capaz de aumentar a absorvância em 0,01 em uma hora (XAVIER-FILHO *et al.*, 1989). Os resultados foram apresentados em UA μg^{-1} de proteína.

4.2.11 Peroxidação de lipídeos

Para avaliar a peroxidação de lipídeos, foi estimado o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês, Thiobarbituric Acid Reactive Substances), conforme descrito por Heath e Packer (1968). Para isso, foram macerados na presença de nitrogênio líquido 200 mg das amostras de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a 28 dias de cultivo na presença de diferentes concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM). Durante a maceração, adicionou-se 1 mL de TCA 5 % e o material foi macerado por mais três minutos. O material formado foi centrifugado a 12.000 x g, durante 15 minutos na temperatura de 4°C. Em seguida, 500 μL desse extrato foram adicionados a 500 μL de uma solução ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (m/v), preparado em TCA 20% (m/v), em tubos de ensaio rosqueáveis. A reação foi levada a banho-maria a 95 °C durante 1 hora, esta reação foi interrompida adicionando os tubos de ensaio em banho de gelo. Após 30 minutos em temperatura ambiente, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda distintos: 532 e 660 nm (formação do complexo MDA-TBA). O conteúdo de peroxidação de lipídeos foi determinado após a subtração entre leituras de absorvância em 532 nm e 600 nm e utilizando-se seu coeficiente de extinção molar 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, sendo o resultado expresso em $\text{nmol g}^{-1} \text{MF}$. Essa análise foi determinada através de amostras compostas, formadas por fragmentos de calos de três repetições diferentes, sendo as análises feitas em triplicata.

4.2.12 Eletroforeses em gel de poliacrilamida em primeira dimensão

Nesta etapa, 50 µg de proteínas oriundas do extrato proteico de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a 28 dias de cultivo na presença de diferentes concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970).

Os géis de separação e de concentração tinham 12,5% e 5% de poliacrilamida, respectivamente. As amostras foram diluídas em tampão de amostra Tris-HCl (Hidroximetil Aminometano) 0,0625 M, pH 6,8 contendo SDS 2% (m/v); β-mercaptoetanol 2,5% (v/v) e azul de bromofenol 0,001% (m/v). Após a diluição, as amostras foram aplicadas no interior dos poços do gel de concentração.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema vertical Dual Gel Caster (Hoefer, São Francisco, EUA), à temperatura ambiente, a 120 V e 20 mA por gel, utilizando como tampão de corrida Tris 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v). Após a corrida, os géis foram corados com solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,2% (m/v), preparado em metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Os géis foram descorados com solução de metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), e em seguida escaneados para uma posterior análise.

4.2.13 Obtenção e determinação da qualidade do RNA

4.2.13.1 Extração de RNA

Tecidos de calos obtidos a partir de hipocótilo de *C. procera* e *C. grandiflora* foram utilizados para extração de RNA. Estes calos foram submetidos a estresse salino (MS acrescido de NaCl a 80 mM) e condição controle (Meio MS). Foram realizados diferentes tempos de coleta sendo eles de 0, 2, 12, 24 e 48 horas e 4, 7, 14 e 28 dias de contato com o meio de cultura.

Para o procedimento de extração, utilizaram-se 200 mg de calos. Esse material foi obtido através de amostra composta por calos de diferentes repetições. Os calos foram macerados em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. Do material vegetal macerado, fez-se a extração de RNA total, através do *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

Em microtubos, adicionaram-se 700 μL do tampão RLT e 10 μL de β -mercaptoetanol às amostras de calos macerados, e a mistura foi homogeneizada usando vórtex, e a solução obtida foi transferida através de pipetagem para uma mini coluna do kit (QIAshedder spin column), acoplada a um tubo coletor de 2 mL e centrifugada a 12.000 x g, a 25 °C, por 2 minutos. O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 400 μL de etanol 95% sendo a solução obtida foi misturada por inversão.

A solução obtida anteriormente foi transferida para uma nova coluna do kit (RNeasy mini spin column), também acoplada a um tubo coletor de 2 ml e centrifugada a temperatura ambiente (25 °C) por 15 segundos a 8.000 x g. O eluído foi descartado sendo adicionado na coluna 400 μL de tampão RW1, centrifugando-se a 8000 x g, a temperatura ambiente, por 15 segundos. Após essa lavagem com RW1, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e foram adicionados 500 μL de tampão RPE na coluna, que foi submetida a uma nova centrifugação a 8000 x g, à temperatura ambiente por 15 segundos. O eluído foi descartado e foram adicionados mais 500 μL de tampão RPE na coluna. A amostra foi submetendo a uma nova centrifugação a 8000 x g, à temperatura ambiente por 2 minutos, a fim de eliminar qualquer resíduo de etanol que pudesse interferir em reações posteriores.

O eluído e o tubo coletor foram descartados e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 40 μL de água livre de RNases diretamente na coluna, submetendo a nova centrifugação a 8000 x g, por 1 minuto para eluição do RNA. O RNA eluído foi armazenado a -20 °C para posterior quantificação, análises eletroforéticas, reações de transcrição reversa (RT) e ensaios de RT-PCR.

4.2.13.2 *Quantificação do RNA*

A concentração do RNA foi estimada com base nas leituras das absorbâncias das amostras no comprimento de onda de 260 nm, utilizando espectrofotômetro GeneQuant (Pharmacia). O grau de pureza deste RNA também foi avaliado neste equipamento por meio da razão das absorbâncias 260/280 nm e a razão de 260/230 nm. As amostras foram quantificadas em triplicata e em seguida foram feitas uma média foi feita da leitura da absorbância.

4.2.13.3 Integridade do RNA

A integridade do RNA total e a verificação de contaminação com DNA genômico foram examinadas usando-se 0,5 µg de RNA total. Para isso foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1%. Géis de agarose para migração eletroforética foram preparados de acordo com o protocolo descrito por Sambrook (1989). Para a produção do gel, agarose foi fundida em tampão TAE, pH 8,0 (Tris acetato a 0,04 M e EDTA a 0,001 M) contendo 0,5 µg de brometo de etídeo. Logo em seguida, essa mistura foi colocada em uma cuba horizontal apropriada para inserção de pentes, possibilitando a formação de poços.

Após a polimerização do gel, aplicou-se nos poços um volume de 5 µL contendo as amostras de RNA. Para a preparação destas utilizaram-se 500 ng de RNA total (com volume variado), 1,5 µL do tampão da amostra (Azul de bromo fenol) e água desionizada autoclavada para completar o volume final de 5 µL.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba horizontal preenchida com tampão TAE, pH 8. Os parâmetros utilizados foram: amperagem constante de 35 mA e voltagem de 70 V. A duração da corrida foi de aproximadamente 30 minutos e foi realizada à temperatura ambiente. As bandas do RNA ribossomal (18S e 28S) no gel de agarose foram visualizadas por exposição à luz UV, em um transiluminador *Vilber Lourmat* (Marne-la-Vallée, France), e a imagem foi capturada por um sistema de fotodocumentação acoplado ao equipamento.

4.2.16 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Após realizar a quantificação das amostras de RNA, foi realizada uma corrida eletroforética visando identificar se as amostras de RNAs estavam realmente homogêneas e íntegras. Confirmada a homogeneidade das amostras de RNA, foram realizadas as reações de transcrição reversa.

O RNA total foi utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando o Kit da IMPromIITM Transcriptase Reverse (Promega, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante.

Para ocorrer a reação, incubou-se 1µg da amostra de RNA com 500 ng de iniciador Oligo (dT)₁₈, por 5 minutos, à temperatura de 70 °C e depois a 4 °C, por mais 5

minutos. Logo após, adicionou-se uma mistura reacional contendo: 4 µL de tampão de transcrição reversa 5 vezes concentrado, 2,4 µL de MgCl₂ 0,025 M, 1 µL de dNTP 0,01 M e 1 µL da enzima transcriptase reversa a 1 UA/ µL. A reação de síntese da fita complementar ocorreu a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 1 hora, seguida de 75 °C por 15 minutos (inativação da enzima). O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C para posteriores reações de PCR.

4.2.17 Padronização da RT-PCR

Para a realização das RT-PCR, foram utilizados dois oligonucleotídeos iniciadores degenerados (*Primers*): o CpOsm e o EF1 α . Os oligonucleotídeos degenerados de CpOsm foram desenhado por Oliveira (2014), produzidos com base na sequência N-terminal obtida de osmotina de *C. procera*. Devido à alta similaridade entre a sequência N-terminal das osmotinas encontradas no látex das espécies em estudos, os oligonucleotídeos degenerados CpOsm foram úteis para amplificação da osmotina de *C. grandiflora*.

Outros oligonucleotídeos utilizados foram os EF1 α (fator de alongação da síntese proteica em eucariotos), sendo este um gene de expressão constitutiva. O objetivo da sua utilização foi à normalização dos dados obtidos por meio da sua expressão estável. Estes oligonucleotídeos foram descritos por alguns pesquisadores (COSTA *et al.*, 2010; GODIM *et al.*, 2012). Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir da região 3' não traduzida (3'UTR). O Quadro 2 mostra as sequências de nucleotídeos dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no experimento.

Quadro 2 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Sequência
CpOsm F	5'CCGGCCACNTTYACNATHCGNAACAAYTGYCC 3'
CpOsm R	5' CCGGGRCARAANAYAACYCTRTRARTTDGT 3'
EF1α F	5' AGRTTYGAGAARGARGCTGC 3'
EF1α R	5' CCACGCTTSAGATCCTTVAC 3'

4.2.17.1 Gradiente de temperatura

Com o objetivo de verificar qual a temperatura mais apropriada para ocorrer o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores CpOsm e EF1 α , foi feito um gradiente de temperatura. Para isto, coletou-se um *pool* das amostras de cDNA. Este procedimento foi realizado em termociclador Mastercycler ep realplex 4S (Eppendorf®). As temperaturas usadas foram (52; 53; 54; 55; 56 e 57 °C).

4.2.17.2 Padronização da quantidade ideal de ciclos

Esta etapa foi realizada com o intuito de verificar qual o melhor número de ciclos para amplificar o produto gênico dos *primers* CpOsm e EF1 α . Para isso, foi selecionado um *pool* de amostras de cDNA de *C. procera* e testadas com 27 ciclos, 30 ciclos, 33 ciclos e 35 ciclos de amplificação. Em seguida foi determinado o melhor número de ciclos para ocorrer a reação da polimerase em cadeia. A reação foi realizada em termociclador Mastercycler ep realplex 4S (Eppendorf®), tendo como temperatura de anelamento 57 °C.

4.2.17.3 RT-PCR semi-quantitativa

Após padronizadas as temperaturas e número de ciclos dos *primers* CpOsm e EF1 α , procedeu-se à RT-PCR, a fim de avaliar o nível de expressão da osmotina e do gene EF1 α em calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a estresse salino em diferentes tempos de exposição ao sal. Os tempos analisados foram 0, 2, 12, 24 e 48 horas e 4, 7, 14 e 28 dias.

Os produtos das reações de RT (cDNA de fita simples) foram submetidos a reações de PCR utilizando *primers* degenerados para o gene da osmotina (CpOsmF e CpOsmR) e para o gene do fator de alongamento EF1 α (EF1 α F e EF1 α R). O número de ciclos utilizados para os diferentes genes foram distintos: utilizou-se 33 ciclos para a osmotina e 27 ciclos para EF1 α , isto em ambas as espécies estudadas. O procedimento utilizado para a obtenção da reação de PCR foi o indicado pelo fornecedor. O kit para realização da PCR foi GoTaq® DNA Polymerase da Promega.

Para a reação, pipetou-se 1 μ L de cDNA obtido pela transcrição reversa em microtubos de 0,2 mL. Esta amostra foi incubada em uma mistura reacional consistindo de: 0,1 μ L (0,5 U) de *GoTaq DNA Polymerase* 5 U/ μ L, 5 μ L de tampão 5x Colorless Reaction

Buffer, 1 μ L de uma mistura de dNTP 0,001 M, 1 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador na concentração de 5 μ M (senso e antisenso) e água desionizada estéril. Além das amostras testadas na reação de PCR, um controle negativo contendo todos os componentes da reação exceto DNA, foi sempre utilizado. Os ciclos reacionais consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 3 min, e uma série de 33 ciclos (para os *primers* da osmotina) ou 27 ciclos (para os *primers* EF1 α) nas seguintes temperaturas: 94 °C (etapa de desnaturação), 57,5 °C (etapa de anelamento dos *primers*) e 72 °C (extensão da fita), e todas essas etapas tiveram a duração de 1 minuto. Após esses ciclos, houve uma etapa de finalização, a qual consistiu de 4 minutos a 72 °C. Essa reação foi realizada no termociclador Mastercycler ep realplex 4S (Eppendorf®)

Os produtos das reações de PCR foram armazenados a -20 °C até uso posterior. Para análise dos produtos da reação, uma alíquota de 8 μ L foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%.

4.2.18 Produção de anticorpos anti-CpOsm nativa

O método de produção de anticorpos anti-osmotina foi descrito por Ramos *et al.* (2006). A primeira etapa para a produção de anticorpos anti-CpOsm consistiu na purificação da osmotina nativa de *C. procera* (CpOsm). Esta purificação foi realizada através do método descrito por Freitas *et al.* (2011). A fração proteica do látex de *C. procera* (PL) foi fracionada em três picos após cromatografia em coluna de CM-Sepharose *Fast Flow* a pH 5,0. O pico PII-CM-Sepharose (eluído com NaCl 0,2 M) foi aplicado em uma coluna de troca iônica Resource-S acoplada em um sistema de FPLC, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 6,0. Eletroforeses em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram realizadas para visualizar o grau de pureza das amostras.

Os anticorpos policlonais contra a osmotina nativa foram produzidos em coelho macho, da raça Nova Zelândia, de quatro meses de idade, obtido no Departamento de Zootecnia da UFC. A sensibilização foi induzida por uma dose inicial com CpOsm (0,5 mg em 0,5 mL de salina estéril) e adjuvante completo de Freud (0,5 mL), administrada por via intramuscular, na pata traseira do animal. Doses de reforço de 1 mg de CpOsm em 1 mL de solução salina, sem o adjuvante, foram posteriormente aplicadas por via subcutânea no dorso do animal nos dias 21, 35 e 42. Cortes nas extremidades das orelhas do coelho foram realizados e aproximadamente 10 a 15 mL de sangue foram coletados antes da primeira

sensibilização (dia 0) e das doses de reforço (dia 35 e 42). O sangue foi deixado em repouso em estufa a 37 °C, por 5 horas, para retração do coágulo. Posteriormente, o soro foi obtido após centrifugação a 2.000 x g, por 5 minutos, a 25 °C. O soro total resultante foi utilizado para os ensaios de *Dot blotting*.

4.2.19 Imunodeteccção de proteínas (*Dot blotting*)

Os testes de *Dot blotting* foram realizados com proteínas extraídas de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* cultivados em meio controle (Meio MS) e em meio MS suplementados com NaCl a 80 mM, nos tempos de 0 horas e 7 e 28 dias de contato com o meio.

A imunodeteccção de proteínas imobilizadas em membrana de nitrocelulose foi realizada de acordo com o procedimento originalmente descrito por Towbin *et al.* (1979). Para essa técnica, 20 µg de extrato proteico de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* dissolvido em 10 µL água foram adicionados à membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, GE Healthcare). Logo após, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora, composta de PBS (NaCl 0,13 M, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 5,3 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,4) contendo 5% de leite desnatado, sob agitação orbital constante de 40 rpm, a 25 °C por 2 horas. Decorrido esse período, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana foi lavada três vezes consecutivas em PBS contendo 5% de leite desnatado. Os anticorpos primários (anti-CpOsm nativa) foram adicionados em uma diluição de 1: 5.000 (v:v) na solução bloqueadora e a incubação foi realizada à temperatura ambiente, sob agitação constante, por 2 horas. A membrana foi então submetida a três lavagens (cada uma por 2 minutos, sob agitação) com PBS, para eliminação do excesso de anticorpo primário não ligado às proteínas retidas na membrana. Em seguida, o anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG de coelho, conjugada com fosfatase alcalina) foi adicionado à solução, em uma diluição de 1:5.000 (v:v), e o permanecendo em contato com a membrana por 2 horas, sob agitação constante, à temperatura de 25 °C. Finalmente, após um ciclo de três lavagens sucessivas idênticas às anteriores, a reação de revelação foi desenvolvida utilizando o substrato BCIP/NBT, que constituiu de uma solução de Tris-HCl 0,2 M, pH 9,0, NaCl 0,1 M, MgCl 2,5 mM, NBT 10 mg/mL e BCIP 25 mg/mL. As membranas foram deixadas sob agitação com a solução do substrato, até o aparecimento das bandas. A reação foi interrompida com a lavagem da membrana em água destilada.

4.2.20 Espectrometria de massas

Os testes de espectrometria de massas foram realizados com proteínas extraídas de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* cultivados em meio MS (controle) e meio MS suplementado com NaCl 80 mM, nos tempos de 0 horas, 7 e 28 dias de contato com o meio. A técnica utilizada foi de ionização por eletropulverização (*electrospray*), em um espectrômetro de massas do tipo SYNAPT HDMS (Waters Co., Milford, MA, EUA).

As amostras dos extratos proteicos dos calos foram submetidas ao processo de digestão com tripsina, para liberação de peptídeos e sua posterior identificação. Nesse ensaio, 50 µg de proteínas foram dissolvidas em 50 µL de água deionizada. Logo em seguida, esse material foi transferido para tubos de microcentrífuga, acrescido 10 µL de bicarbonato de amônio 50 mM, sendo a mistura agitada em vortex, e aquecida a 80 °C, durante 15 minutos. Em seguida, foi feita a adição de 2,5 µL de DTT 100 mM, sendo a mistura novamente agitada em vortex. Logo após, estas amostras foram aquecidas a 60 °C durante 30 minutos e foram adicionados 2,5 µL de iodoacetamida (IAA) 300 mM, e agitada em vortex. As amostras foram colocadas no escuro à temperatura ambiente, por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram digeridas pela adição de 1 µg de tripsina (Promega) e agitada em vortex. A digestão das proteínas pela tripsina foi realizada por 18 horas, a 37 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, a 4 °C durante 30 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para frascos apropriados (*Total Recovery vials*, Waters).

Os peptídeos obtidos foram analisados em espectrômetro de massas por ESI-Q-TOF acoplado a um sistema de cromatografia nano ACQUITY UPLC, utilizando separação por fase reversa em uma coluna do tipo BEH C18 com dimensões de 100 mm x 75 µm e tamanho da partícula de 1,7 µm, com um gradiente de 0 a 85% (v/v) de acetonitrila, contendo ácido fórmico 0,1% (v/v), a um fluxo de 400 nL/minuto. A coluna foi alimentada com 50 ng de amostra, contendo os peptídeos. Para todas as medições, o espectrômetro de massas foi operado no modo 'V', com uma potência de resolução de, pelo menos, 10.000 m/z. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização por *electrospray* no modo ESI (+), através da fonte NanoLockSpray. O canal de coleta do analito foi fechado a cada 30 segundos para passagem do íon de referência contendo o peptídeo GFP (Glu-fibrinopeptide). Os espectros de massas obtidos foram processados usando o software ProteinLynx Global Server v. 2.4 (Waters) e os arquivos PKL gerados foram consultados no bando de dados NCBI (National

Center for Biotechnology Information), usando a pesquisa do software MASCOT v.2.2 (Matrix Science – www.matrixscience.com).

4.2.21 Análise estatística

Os dados foram examinados utilizando a análise de variância (ANOVA). O teste de múltiplas comparações de Tukey foi utilizado para identificar as médias que diferiram no teste de ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. O programa utilizado foi o GraphPadPrism 6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos calos

Como fase inicial do experimento, foram utilizados protocolos para obtenção de calos de *C. procera* e *C. grandiflora*. Esses calos foram desenvolvidos com o intuito de servir como modelo de estudo para avaliar os processos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem nessas espécies quando submetidas a estresse salino.

O substrato utilizado para o processo de germinação das sementes foi eficiente para germinação de *C. procera* e *C. grandiflora*. Após 30 dias da semeadura, as sementes forneceram plântulas viáveis como fonte de explante para a obtenção dos calos, sendo o tamanho médio dessas plântulas de 4 cm. Após a aquisição das plântulas, utilizou-se segmentos de hipocótilo e cotilédones como fonte de explantes para formação dos calos.

Devido à proximidade botânica entre as espécies em estudo, a metodologia de indução de calos de *C. procera* já registrada na literatura foi testada e comprovou ser eficiente para obtenção de calos de *C. grandiflora*. Como resultado, observaram-se calos parcialmente friáveis e de coloração amarelada a partir de hipocótilos. Enquanto que a partir de explantes cotiledonares houve predominantemente a formação de raízes adventícias, com apenas sutil formação de calos. O início da formação de calos e raízes foi observado após 2 semanas da inoculação dos explantes no meio nutritivo. Após 4 semanas, os calos estavam bem desenvolvidos. Assim, observou-se uma melhor formação dos calos a partir de tecidos do hipocótilo, apresentando um peso de médio de 1 g cada calo. Esse padrão foi determinado nas duas espécies em estudo (Figura 6), sendo estes calos utilizados para dar continuidade ao experimento.

Os calos viáveis, com peso médio de 1 g e livre de contaminação, foram transferidos para um novo meio de cultura MS contendo concentrações crescentes de NaCl para induzir o estresse salino. O tempo de permanência dos calos no meio com sal foi de 28 dias, e em seguida foram avaliados alguns critérios do seu desenvolvimento e mecanismo de resposta ao estresse salino.

O meio de cultura MS é uma solução composta por macronutrientes e micronutrientes essenciais e compostos orgânicos. Estes elementos são sais necessários para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Com o intuito de verificar a força salina exercida

pelos íons neste meio de cultura, foi quantificada a osmolalidade dos meios utilizados. Observou-se que a osmolalidade aumentou com o incremento da concentração de NaCl no meio. Verificou-se também que o meio MS sem a adição de sais possuía uma osmolalidade de 89 mmol/kg, sendo essa consideravelmente elevada (Tabela 1).

Figura 6 - Calos de *C. procera* (A) e *C. grandiflora* (B) após quatro semanas de cultivo, obtidos a partir de explantes de hipocótilo e cotilédono.

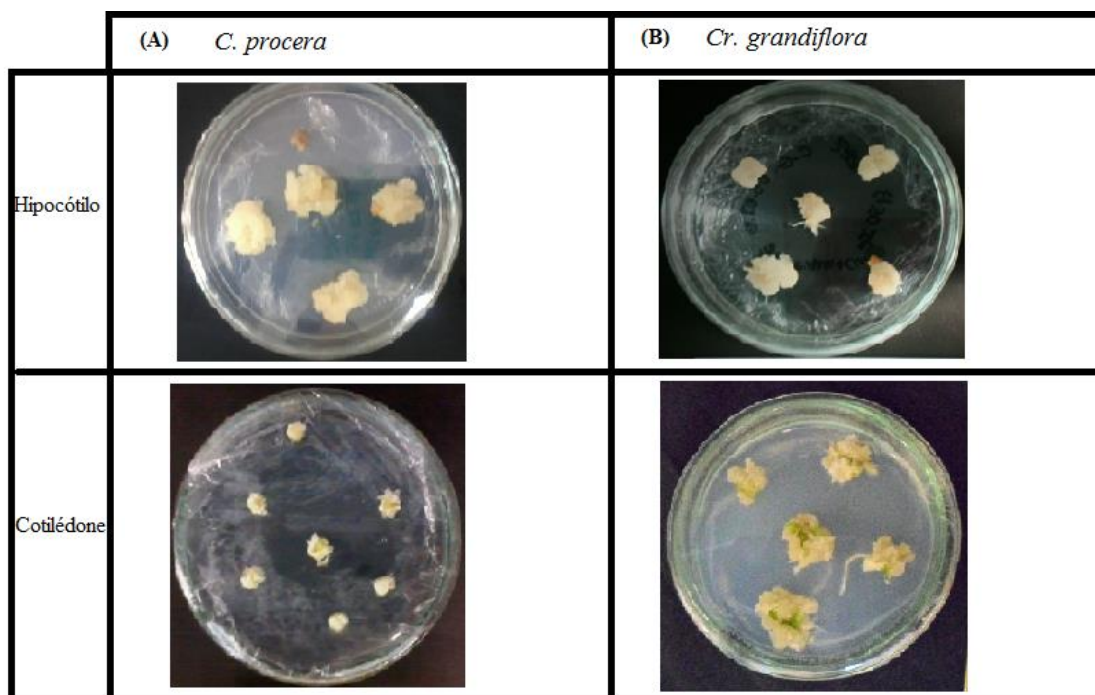


Tabela 1 - Osmolalidade do meio MS acrescido de concentrações crescentes de NaCl (0- 80 mM).

Concentração de NaCl no meio MS	0 mM	20 mM	40 mM	60 mM	80 mM
Osmolalidade (mmol/kg)	89	105	146	180	220

5.2 Crescimento dos calos

O ambiente salino causa uma série de danos à célula vegetal. Como resposta fisiológica final, a planta reduz o seu crescimento e sua produtividade. Com o intuito de avaliar possíveis danos causados pelo aumento da salinidade no meio de cultura, foi analisada a taxa de crescimento relativo (TCR) dos calos submetidos a 28 dias de cultivo no meio com

NaCl. Neste trabalho, a TCR, obtida através da massa fresca total dos calos antes e após a exposição ao estresse, foi afetada por concentrações elevadas de NaCl. Observou-se um decréscimo na taxa de crescimento dos calos das espécies em estudo à medida que ocorreu aumento da concentração de NaCl no meio, contudo só houve uma redução estatisticamente comprovada em calos tratados com NaCl 80 mM. Nessa concentração de NaCl, correspondente a uma osmolalidade de 220 mmol/kg, os calos sofreram reduções de ordem de 36% na taxa de crescimento em *C. procera* e 83% em *C. grandiflora*, quando foi feita a comparação com os tratamentos controle. Essa porcentagem reflete uma queda na TCR de 0,11 em calos controle para 0,07 em calos submetidos ao meio salino e de 0,101 no controle para 0,016 dos calos submetidos a estresse, nas espécies de *C. procera* e *C. grandiflora*, respectivamente (Figura 7).

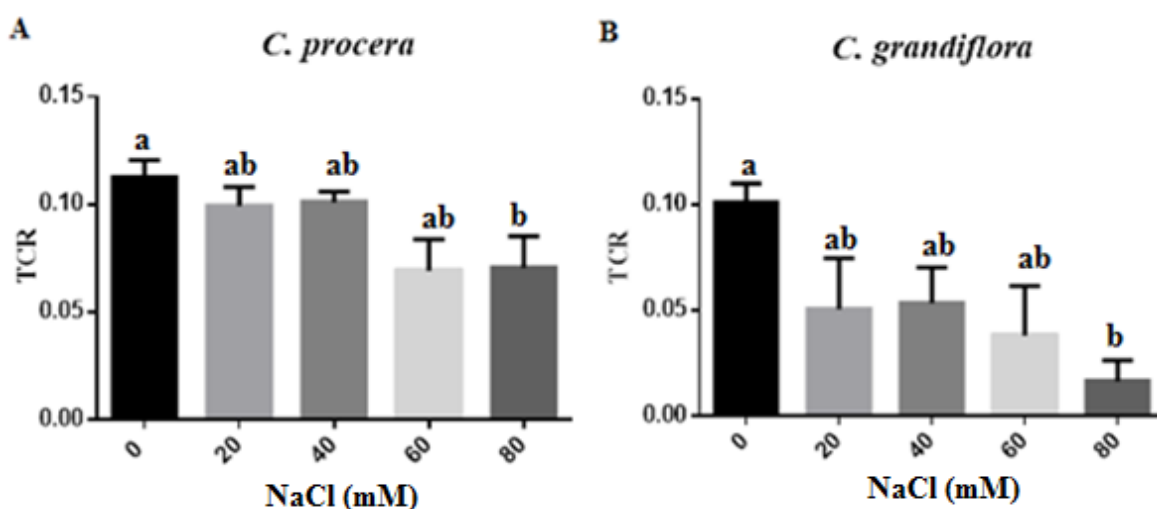
Esse padrão de redução de crescimento sob condições de estresse salino, foi relatado em vários trabalhos envolvendo calos de diferentes espécies, como arroz, cana-de-açúcar, trigo e niger (REDDY; VAIDYANATH,1985; BARAKAT; ABDEL-LATIF,1996; PATADE *et al.*, 2008; GHANE *et al.*, 2014). Reddy e Vaidyanath (1985) justificam que essa diminuição no crescimento dos calos está relacionada ao estresse osmótico e iônico causados pela grande quantidade de sal presente no meio de cultura. Além disso, as células cultivadas sob estresse tendem a crescer menos do que as cultivadas em meio sem agentes estressantes (CROUGHAN *et al.* 1981), pois as reservas energéticas são gastas com rotas que proporcionam a resistência ao estresse, desfavorecendo o crescimento (CUSHMAN *et al.* 1990). Essa justificativa também é aplicável quando analisada a redução do tamanho de folhas de plantas submetidas ao estresse salino. Munns (2002) relata que o gasto metabólico adicional nas plantas estressadas seria devido à produção de vários osmólitos compatíveis como, por exemplo, a prolina e certos açúcares.

Patade *et al.* (2008) apresentaram outra possível causa para diminuição do crescimento dos calos em meio de cultura com NaCl. Acredita-se que os íons Na^+ e Cl^- causem um desequilíbrio nutricional devido à competição com os nutrientes essenciais presentes no meio de cultura, que estão envolvidos em processos metabólicos de crescimento dos calos.

Neste trabalho, é provável que a redução no crescimento dos calos das espécies em estudo tenha sido devido à ocorrência de níveis tóxicos de íons e/ou um desbalanço nutricional causados pelos altos níveis de NaCl. Essa hipótese é plausível, pois foi

identificado um acúmulo de íons nos calos submetidos a estresse. Pode-se considerar ainda, que as células cultivadas em meio com sal também tiveram um maior gasto metabólico, já que elas intensificaram a produção de solutos compatíveis, desfavorecendo seu crescimento.

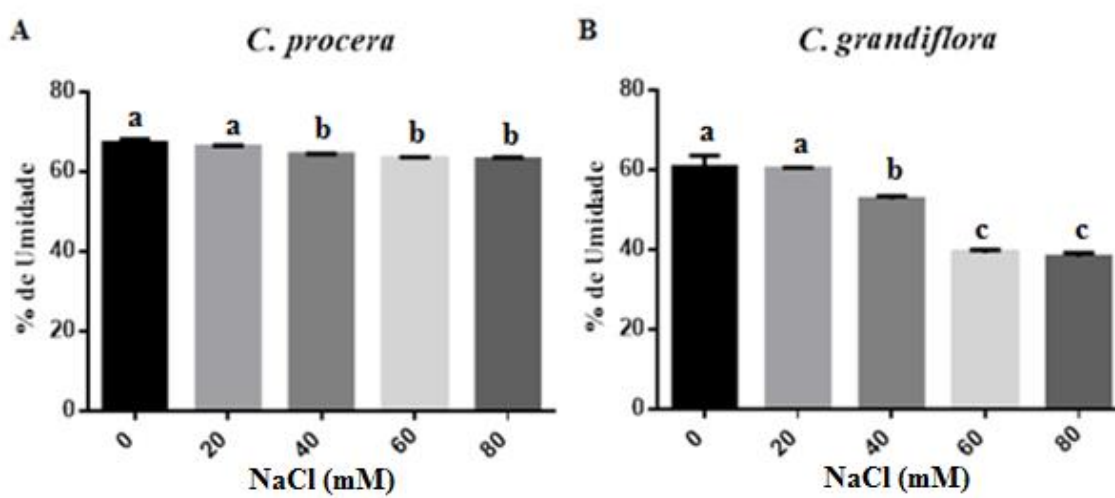
Figura 7 - Taxa de crescimento relativo (TCR) dos calos de *C. procera* (A) e *C. grandiflora* (B) submetidos a estresse salino em concentração crescente de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM de NaCl). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey a 0,05% de probabilidade. Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si.



5.3 Teor umidade

Após 28 dias em contato com o meio de cultura contendo NaCl, os calos do tratamento controle apresentaram um teor de umidade médio de 67% em *C. procera* e 60% em *C. grandiflora*. O estresse salino causado pela maior concentração de NaCl (80 mM) diminuiu o TRA para um valor médio de umidade de 63% em *C. procera* e 38% *C. grandiflora* (Figura 8). Assim, pode-se inferir que houve uma redução no TRA total de 6% e 39% em *C. procera* e *C. grandiflora*, respectivamente, quando comparados à porcentagem de água dos calos do tratamento controle com os tratados com NaCl 80 mM.

Figura 8 - Umidade dos calos de *C. procera* (A) e *C. grandiflora* (B) submetidos a estresse salino com concentração crescente de NaCl (0- 80 mM) no meio de cultura MS. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey a 0,05 % de probabilidade para confirmar a significância do resultado. Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si.



O teor relativo de água apresentou padrões diferenciados nas duas espécies. Em calos de *C. procera* houve uma menor redução no teor de água, assemelhando-se a valores encontrados em calos de espécies halófitas submetidas ao mesmo dano (SHARMA; RAMAWAT, 2013). O comportamento mais sensível de *C. grandiflora* foi similar ao registrado em calos de níger sob estresse com NaCl (GHANE *et al*, 2014). Sabe-se que essa diminuição do teor de umidade em plantas submetidas a estresse salino se dá pelo fato do excesso de sais presentes no solo agirem diminuindo o potencial osmótico e, conseqüentemente, o potencial hídrico do solo, provocando uma diminuição no gradiente de potencial hídrico entre o solo e a planta, dificultando, portanto, a absorção de água pelas plantas (PRISCO; GOMES-FILHO, 2010).

Uma possível hipótese para uma maior redução do teor de água dos calos de *C. grandiflora* quando submetidos a meio com NaCl é que eles não tenham produzido uma quantidade de solutos orgânicos suficiente para manutenção da osmorregulação celular, o que acabou dificultando os mecanismos de absorção de água do meio de cultura. Essa afirmativa é reforçada, quando ao se comparar as concentrações de açúcares solúveis totais e prolina entre

as espécies em estudo, pode-se perceber que a quantidade desses solutos é bem mais alta em *C. procera*, tornando esta espécie mais resistente a este tipo de dano.

5.4 Teores de sódio, potássio e cloreto

O desequilíbrio iônico é bastante relatado em estudos que avaliam os danos causados pelo estresse salino. Sabe-se que existe uma relação direta entre o equilíbrio iônico e a resistência de espécies à salinidade. Então, com o intuito de avaliar um possível desbalanço iônico, foram dosados os principais íons envolvidos no metabolismo celular. Para isso, foram determinadas os teores de sódio, cloreto e potássio (Figura 9).

Os teores de sódio nos calos foram aumentados com o acréscimo da concentração de NaCl no meio de cultura, sendo esse aumento significativo a partir de 20 mM de NaCl, nas duas espécies em estudo. A diferença entre o controle e o tratamento com NaCl 80 mM foi de 3,2 para 29,3 mM por grama de calos de *C. procera* e de 3,7 para 31,6 mM por grama de *C. grandiflora*. Em porcentagem podemos observar que houve um aumento de 98,9% em *C. procera* e 98,8% em *C. grandiflora* nos teores de sódio nos calos submetidos a NaCl 80 mM quando comparados com os calos do tratamento controle.

Os teores de cloreto em condições salinas aumentaram nos calos de ambas as espécies quando ocorrida a adição de NaCl no meio. Assim, o aumento médio dos teores de íons cloreto nos tratamentos com NaCl 80 mM foi de 98% e 96%, respectivamente, em relação aos controles, nas espécies *C. procera* e *C. grandiflora*.

O aumento na concentração de Na^+ e Cl^- nos tecidos vegetais quando ocorre incrementos de NaCl é bastante relatado na literatura (LIU; STADEN; 2000; ALVAREZ *et al.*, 2003; HOSSAIN *et al.*, 2007; QUEIROS *et al.*, 2007; PATADE *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2009). Muitas espécies vegetais acumulam íons inorgânicos dentro das células, com o intuito de baixar o potencial hídrico e garantir assim a absorção de água, para poder crescer em solos com excesso de sais (ZHAO *et al.*, 2009). Porém, neste estudo podemos verificar que o acúmulo destes sais mostrou um potencial tóxico, já que reduziu o acúmulo de biomassa e foi ineficiente para suprir o estado hídrico celular de *C. grandiflora*.

Os teores de potássio foram afetados pela salinidade nas duas espécies em estudo. Em *C. procera*, houve uma tendência de redução de K^+ de aproximadamente 43% na quantidade total desse íon quando comparado o controle com a concentração máxima de

NaCl. Já a média da redução em *C. grandiflora* foi de 18% nos calos tratados com NaCl 80 mM, quando comparados com o tratamento controle.

O decaimento de íons K^+ à medida que aumenta a salinidade é comumente encontrada na literatura como, no trabalho realizado por Gandonou *et al.* (2006). Esses pesquisadores analisaram variedades de calos de cana-de-açúcar selecionados em meio contendo NaCl, e os resultados observados mostraram a existência de uma tendência de diminuição dos íons de K^+ com o estresse salino. A justificativa mais abordada para esta causa seria a competição do K^+ com o Na^+ , já que estes possuem os raios atômicos semelhantes e a disponibilidade de Na^+ está em maior quantidade no meio (COSTA *et al.*, 2003; TRINDADE *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2007).

A relação Na^+/K^+ nos calos aumentou em função do estresse salino. Porém esse aumento foi mais evidenciado nos calos de *C. procera*. A porcentagem de aumento foi de 93,9% em *C. procera* e 90,2% em *C. grandiflora*, quando comparados os valores do tratamento controle com os calos tratados com NaCl 80 mM (Figura 10).

Um indicativo do estresse iônico são as alterações na relação Na^+/K^+ . Quando a célula vegetal está sob um desequilíbrio iônico, frequentemente observa-se um aumento dessa relação (MAATHUIS; AMTMANN,1999). Nos calos de ambas as espécies, foi constatado um acúmulo preferencial de Na^+ em detrimento ao K^+ , sugerindo que os calos estão sofrendo um desequilíbrio iônico causado pela alta concentração de NaCl.

Figura 9 - Teores dos íons Na^+ (A e B), Cl^- (C e D) e K^+ (E e F), em calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a concentrações crescentes de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey a 0,05% de probabilidade. Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si.

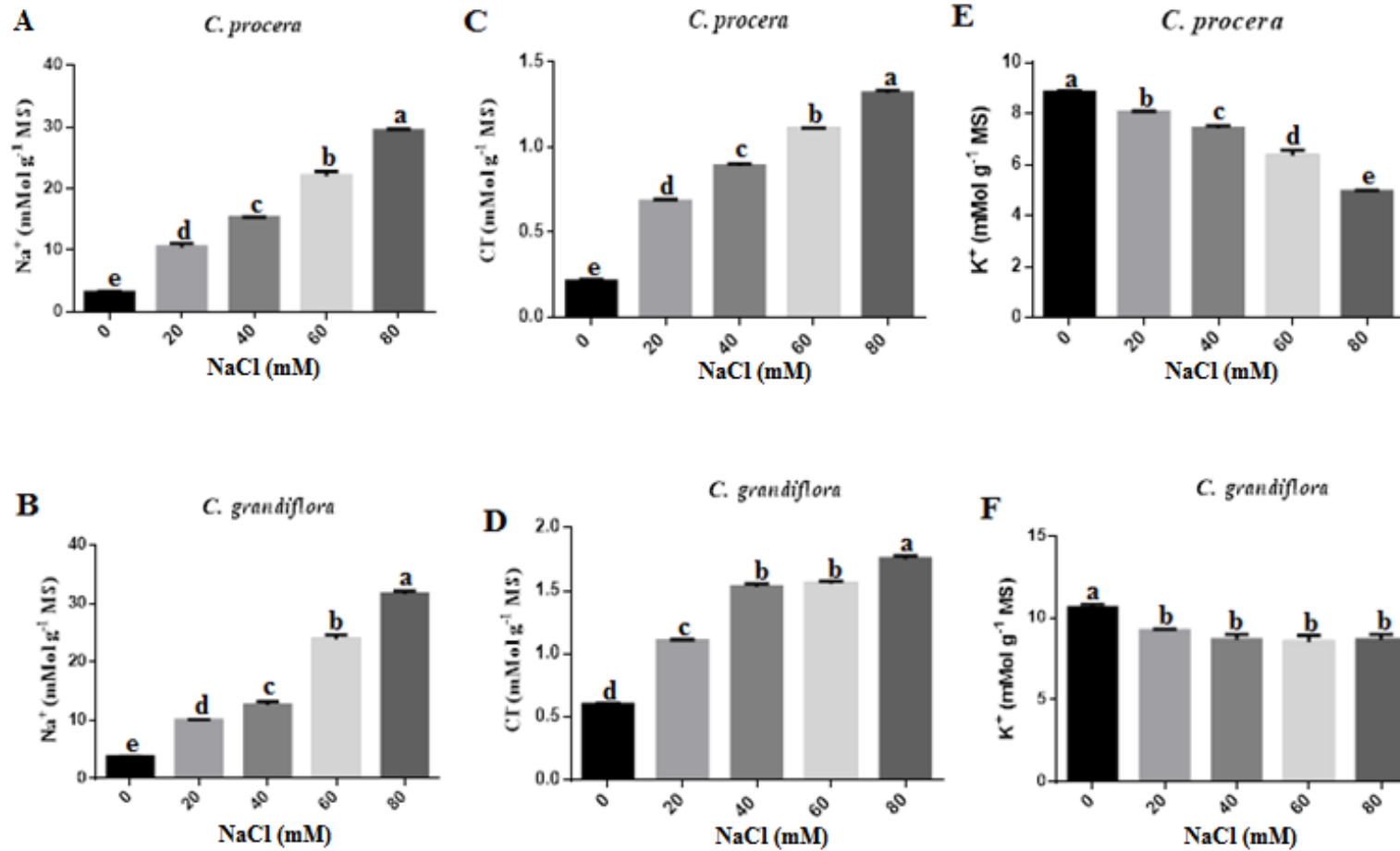
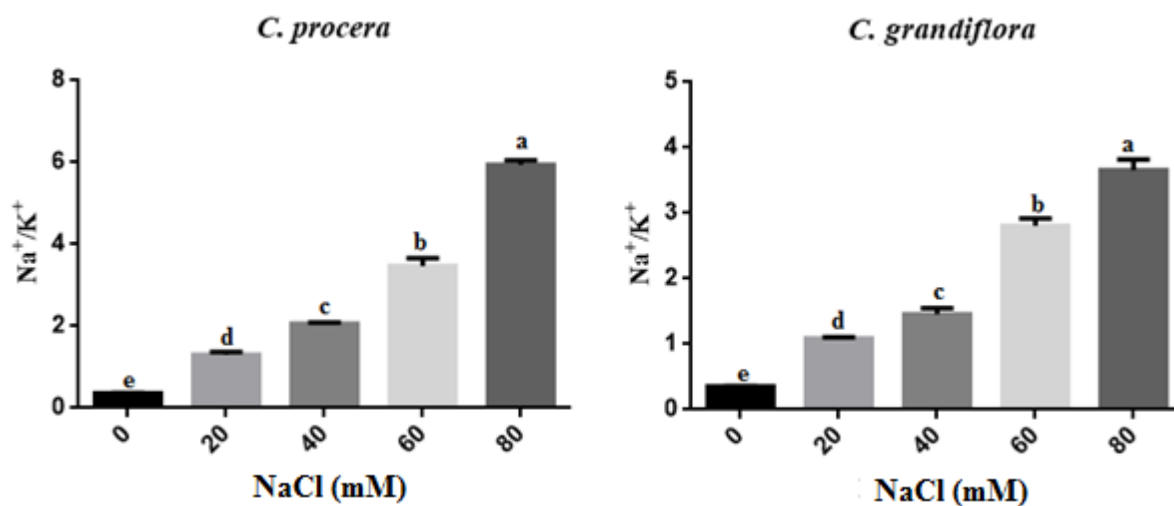


Figura 10 - Relação entre os íons Na^+/K^+ dos calos de *C. procera* (A) e *C. grandiflora* (B) submetidos a estresse salino com concentração crescente de (0, 20, 40, 60 e 80 mM) de NaCl. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey a 0,05% de probabilidade para confirmar a significância do resultado. Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si.



5.5 Teores de solutos orgânicos

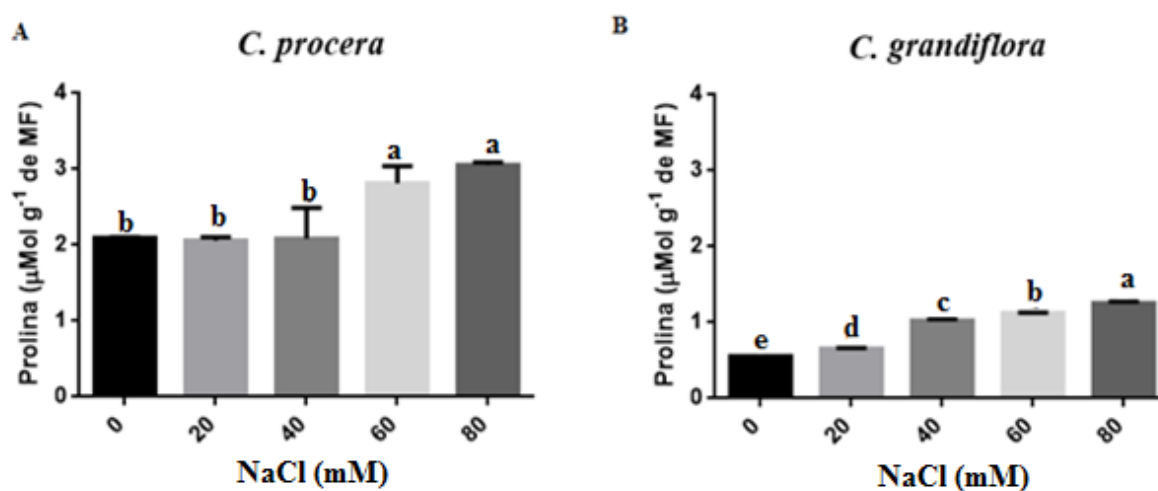
Uma das respostas metabólicas ao estresse salino é a síntese e acúmulo de solutos orgânicos compatíveis. Esses compostos osmoticamente ativos são açúcares, aminoácidos, entre outros metabólitos, sendo responsáveis pelo ajuste osmótico celular. Com o objetivo de avaliar a capacidade de produção desses compostos orgânicos, foram determinados os teores de prolina e açúcares solúveis totais nos calos em estudo.

A salinidade alterou os teores de prolina livre com uma tendência de aumento na produção de prolina nos calos cultivados em meio com sal. Contudo, o acúmulo de prolina foi maior em calos de *C. grandiflora* tratados com NaCl 80 mM. Esse acúmulo foi de 55,4% quando comparado ao controle. Já em *C. procera*, o aumento no teor de prolina foi menor, em torno de 26%, em relação ao controle (Figura 11).

Em plantas o acúmulo de prolina ocorre em várias espécies em resposta ao estresse salino (COSTA *et al.*, 2003). Este padrão de produção de prolina sob condições de estresse também foi registrado por pesquisadores que avaliam o estresse salino em calos (GANDONOU, 2006; PIQUERAS, 1996; HOSSAIN *et al.*, 2007). Valores semelhantes de produção de prolina foram encontrados em calos de espécies tolerantes à salinidade de cultivares selecionados de capim limão (PATNAIK; DEBATA, 1997). Os valores encontrados

foram próximos a 2,9 μM de prolina por grama de calos, estes valores aproximam-se dos teores de prolina registrados nos calos de *C. procera*. Em trabalho realizado por Sharma e Ramawat (2014), que estudaram a relação entre a concentração de prolina e o estresse salino em calos de plantas halófitas do deserto da Índia, os resultados obtidos mostraram a existência de calos de algumas espécies de halófitas que concentram quantidade semelhante ao encontrado em *C. procera* e outras que apresentam semelhança com *C. grandiflora*, quando expostas a NaCl a 80 mM.

Figura 9 - Teores de prolina em calos de *C. procera* (A) e *C. grandiflora* (B) submetidos a estresse salino com concentração crescente de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey a 0,05% de probabilidade. Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si.

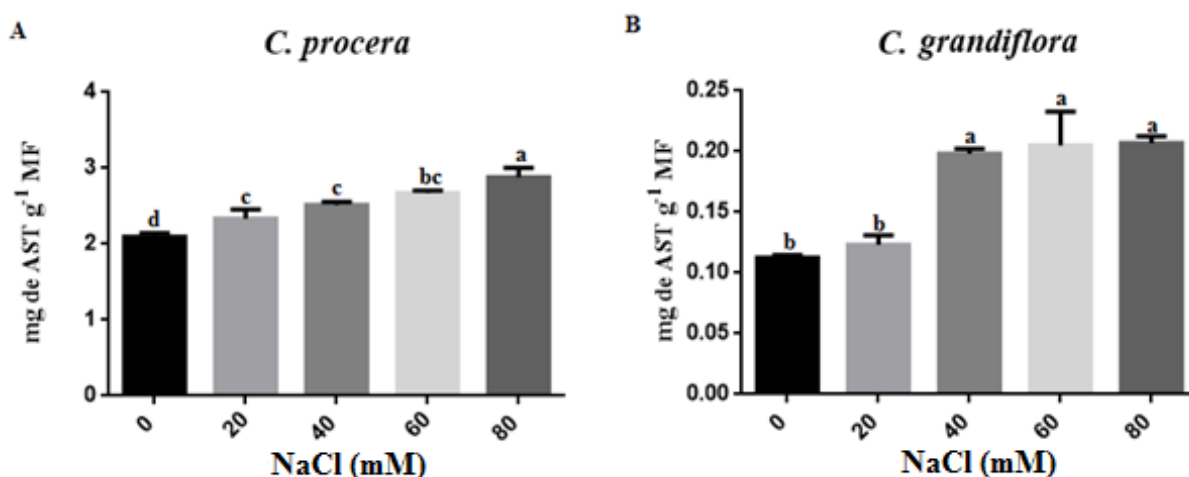


Os níveis crescentes de salinidade aumentaram os teores de açúcares solúveis nos calos das duas espécies. Os calos de *C. procera* apresentaram um aumento de 37% na concentração mais alta de sal (NaCl 80 mM) em relação ao controle, enquanto o acúmulo de açúcares nos calos de *C. grandiflora* foi de 45% no mesmo nível de salinidade (Figura 12). Observou-se também que a concentração de açúcares solúveis totais foi bem mais alta em *C. procera*, quando comparada com *C. grandiflora*.

Mudanças nos teores de carboidratos solúveis têm sido relatadas em plantas submetidas à salinidade, o que sugere um papel desses solutos na adaptação das mesmas ao estresse salino (GARG *et al.*, 2002; KEREPESI; GALIBA, 2000). Em calos, esta relação também é mantida, existindo uma tendência de calos de espécies tolerantes acumularem uma

concentração mais alta de açúcares solúveis quando comparada com calos de espécies sensíveis à salinidade (GANDONOU, 2006).

Figura 10 - Teores de açúcares solúveis totais (AST) dos calos de *C. procera* (A) e *C. grandiflora* (B) submetidos a estresse salino com concentração crescente de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey a 0,05% de probabilidade. Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si.



O acúmulo de osmólitos compatíveis sob condições de estresse salino é um indicativo que está ocorrendo algum dano osmótico às células. Como forma de mecanismo de defesa as células acumulam compostos orgânicos no citoplasma para proteção contra desidratação (LOKHANDE *et al.*, 2010). Neste estudo, o acúmulo destes solutos na espécie de *C. grandiflora* não mostrou eficiência no processo de osmorregulação, assim podemos sugerir que a produção destes solutos compatíveis está relacionada com outras funções de proteção nos calos de *C. grandiflora*.

Sabe-se que além do papel no ajuste osmótico celular, os osmólitos compatíveis também estão envolvidos na proteção de estruturas subcelulares, contra danos oxidativos causados por radicais livres (ATTIPALI *et al.*, 2004) e na manutenção das atividades de enzimas sob estresse salino (YOKOI *et al.*, 2002). Dessa forma, a síntese de compostos orgânicos em *C. grandiflora* pode estar relacionada a fatores como a proteção de macromoléculas celulares, estocagem de nutrientes, manutenção do pH celular, desintoxicação de células e minimização dos efeitos das espécies reativas de oxigênio (ASHRAF; HARRIS, 2004). Essa suposição é validada quando observados os dados de

peroxidação de lipídeos, mostrando que não houve uma tendência de dano de membrana, podendo esses compostos auxiliarem na estabilidade celular.

5.6 Atividade enzimática

O estresse salino envolve mecanismos complexos de aumento ou redução de atividade enzimática. Com o intuito de avaliar o comportamento das enzimas do estresse oxidativo, foi quantificada a atividade da catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e da peroxidase do guaiacol (G-POD).

A enzima CAT não foi detectada em nenhum dos ensaios realizados, sendo provavelmente inexistente nos calos das espécies em estudo. A atividade da APX foi detectada em ambas as espécies, porém ocorreu um aumento da atividade em condições estressantes apenas nos calos de *C. grandiflora*, sendo sua atividade aumentada em 73% nos calos submetidos a NaCl 80 mM em relação aos calos cultivadas no tratamento controle. A G-POD também foi detectada em ambas as espécies em estudo, porém o incremento de atividade sob condições de estresse só foi observado em calos de *C. grandiflora*, que apresentou um aumento de 62% na atividade dos calos submetidos a estresse a NaCl 80 mM em relação aos calos controle.

Entre os malefícios causados pela salinidade, o estresse oxidativo é bastante relatado, sendo esse estresse caracterizado pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Como forma de proteção, as plantas possuem uma variedade de enzimas do sistema antioxidativo, as quais desempenham um papel de desintoxicação das EROs (MITTLER, 2002). Comumente, a atividade dessas enzimas é afetada durante condições de salinidade, tendo uma tendência de aumento na sua atividade.

Em relação ao estudo feito sobre a ação das enzimas do estresse oxidativo em calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos à condições salinas podemos inferir muitas observações. A primeira observação faz referência ao fato da ausência da atividade da catalase. Esta enzima é capaz de converter o H_2O_2 em H_2O e oxigênio molecular, sendo comumente usada para proteção contra o estresse oxidativo. Freitas *et al.* (2010) relatam que a atividade da enzima não foi detectada no látex de *C. procera*. SILVA (2015) mostrou a ausência de atividade da catalase em calos de *C. grandiflora*. Assim podemos inferir que esta enzima não seria a via prioritária para degradação de H_2O_2 nas amostras em estudo.

Outra observação relevante seria o fato do aumento da atividade das enzimas APX e G-POD em calos de *C. grandiflora* submetidos a estresse salino, quando comparada com a atividade dos calos na condição controle. Ambas as enzimas apresentam a capacidade de converter H_2O_2 a água, porém elas oxidam diferentes substratos, sendo o ascorbato o substrato da APX e guaiacol o substrato da G-POD. Existem relatos de aumento na síntese destas enzimas em condições de estresse (ZHAO *et al.*, 2014). Diante disso, podemos afirmar que as células de *C. grandiflora* cultivadas em meio MS suplementado com NaCl sofreram dano oxidativo, sendo necessário o aumento na atividade destas enzimas, diferentemente do que ocorreu com as células de *C. procera*.

Além das enzimas do sistema antioxidativo, avaliou-se a atividade das enzimas proteases, para verificar uma possível relação delas com o estresse salino. Os resultados mostraram que não houve atividade proteolítica em calos de *C. grandiflora*, mas nos calos de *C. procera* uma baixa atividade proteolítica foi determinada. Os dados referentes às atividades enzimáticas estão representados na Tabela 6. A ausência de atividade proteolítica nos calos de *C. grandiflora* já foi registrada por SILVA (2015), que relatou a ausência destas enzimas através de vários métodos, como ensaio colorimétrico, zimograma, ELISA e espectrometria de massas. Nesse mesmo trabalho foi analisada a atividade proteolítica dos calos de *C. procera*, e os resultados encontrados assemelham-se com os obtidos neste trabalho.

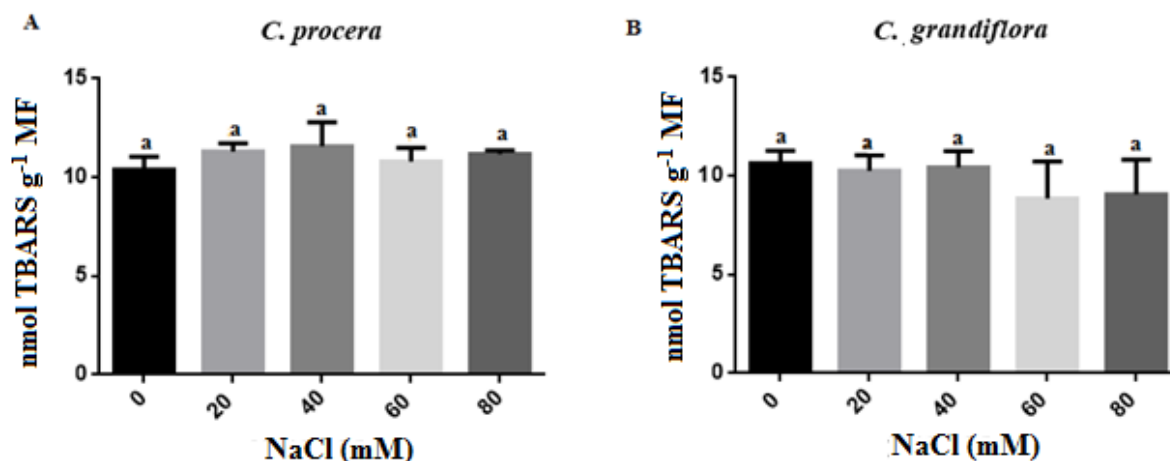
Tabela 2 - Atividade enzimática da APX, CAT, G-POD e atividade proteolítica em calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidos a estresse com concentrações crescentes de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey a 0,05 % de probabilidade. Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si.

<i>C. procera</i>					
	0 mM	20 mM	40 mM	60 mM	80 mM
APX ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$). $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	0,021131a	0,021429 a	0,021726a	0,021131a	0,022321a
Desvio padrão	0,003	0,002	0,002	0,001	0,002
CAT ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$). $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	ND	ND	ND	ND	ND
G-POD ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$). $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	0,193734a	0,18822a	0,185464a	0,185464a	0,185464a
Desvio padrão	0,003	0,003	0,007	0,007	0,007
Atividade proteolítica (UA/ μg)	0,13a	0,12a	0,14a	0,13a	0,11a
Desvio padrão	0,01	0,009	0,01	0,01	0,01
<i>C. grandiflora</i>					
	0 mM	20 mM	40 mM	60 mM	80 mM
APX ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$). $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	0,014286a	0,027679b	0,033631b	0,035714b	0,053571c
Desvio padrão	0,003	0,006	0,004	0,005	0,001
CAT ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$). $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	ND	ND	ND	ND	ND
Desvio padrão					
G-POD ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2$). $\text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$	0,368922a	0,979198b	0,958898b	0,959404b	0,980201b
Desvio padrão	0,019	0,001	0,009	0,032	0,0109
Atividade proteolítica (UA/ μg)	ND	ND	ND	ND	ND

5.7 Peroxidação de lipídeos de membrana

O método do TBARS é utilizado para avaliar danos oxidativos causados nos lipídios, em especial ácidos graxos insaturados de membranas. Os resultados mostram que não ocorreu a peroxidação de lipídios em calos submetidos ao tratamento com diferentes concentrações de NaCl, pois os níveis de TBARS foram estáveis, quando comparados às amostras do tratamento controle, sendo este padrão similar para as duas espécies em estudo (Figura 13). Os lipídeos são biomoléculas que desempenham um papel importante como componente estrutural das membranas celulares (PARIDA; DAS, 2005). Sabe-se que durante o estresse oxidativo os radicais livres induzem a peroxidação de lipídeos da membrana celular. Nesse trabalho não foi observado um aumento no nível de malondialdeído (MDA), indicando que as membranas das células dos calos de *C. procera* e *C. grandiflora* não foram afetadas. Esses resultados foram similares aos encontrados por Cori *et al.*(2013), que caracterizaram o estresse salino em calos de murta, mostrando que esse estresse não afetou a peroxidação de lipídeos dos calos. Assim, podemos inferir que o provável dano oxidativo, indicado pelo aumento das enzimas antioxidantes dos calos de *C. grandiflora*, não atingiu níveis danosos para membrana.

Figura 11 - Peroxidação de lipídeos em calos de *C. procera* (A) e *C. grandiflora* (B) submetidos a variadas concentrações de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de Tukey a 0,05% de probabilidade. Letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si.



5.8 Obtenção e determinação da qualidade do RNA

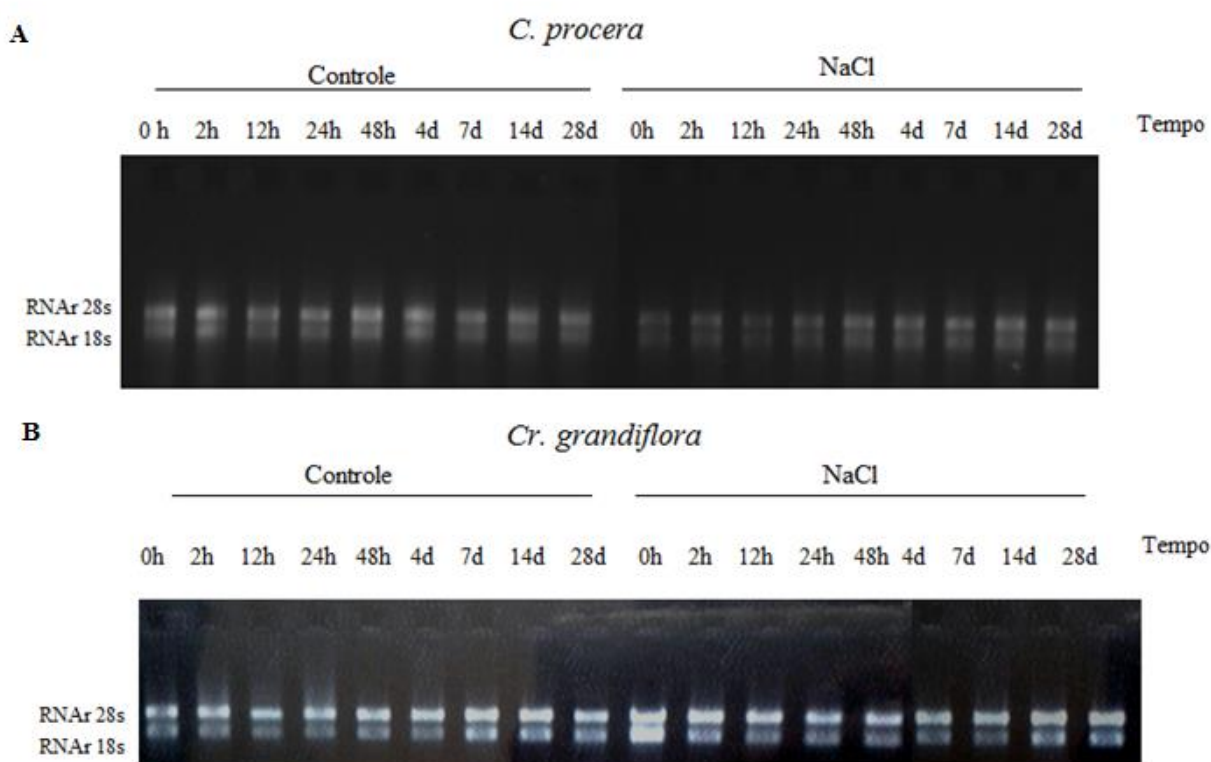
Para verificar a qualidade do RNA extraído de calos de *C. procera* e *C. grandiflora* foram avaliadas as leituras espectrofotométricas buscando uma possível contaminação com carboidratos e/ou proteínas. Com base nas relações 260/280 os resultados obtidos foram entre 1,9 e 2,1 e a relação 260/230, entre 2,2 e 2,8. Assim a qualidade do RNA extraído foi considerada boa, já que o padrão de qualidade do RNA é que os valores da relação 260/280 seja entre 1,8 e 2 e a razão 260/230 esteja acima de 2. A média de concentração do RNA total variou de 976 e 136 ng/μL (Tabela 3).

Em relação à integridade dessas biomoléculas, os perfis observados no gel de agarose demonstraram a integridade do RNA extraído, já que foram visualizadas as bandas do RNA ribossomal referentes às subunidades 18S e 28S (Figura 14).

Tabela 3 - Valores médios das concentrações e relações de absorvâncias dos RNAs extraídos de calos de *C. procera* e *C. grandiflora*, cultivados por 4 semanas em meio MS suplementado ou não com NaCl 80 mM.

Calos de <i>C. procera</i>						
Tempo	0 mM de NaCl			80 mM de NaCl		
	Concentração ng/ μ L	260/280	260/230	Concentração ng/ μ L	260/280	260/230
0 horas	544	2,14	2,14	589	2,12	2,22
2 horas	454	2,11	2,11	202	2,11	2,21
12 horas	168	1,91	1,91	498	2,14	2,52
24 horas	310	2,09	2,09	334	2,13	2,32
48 horas	348	2,13	2,13	372	2,13	2,31
4 dias	136	2,10	2,10	220	2,13	2,22
7 dias	178	2,14	2,14	164	2,11	2,31
14 dias	252	2,12	2,12	238	2,12	2,81
28 dias	193	2,11	2,11	153	1,93	2,54
Calos de <i>Cr. grandiflora</i>						
Tempo	0 mM de NaCl			80 mM de NaCl		
	Concentração ng/ μ L	260/280	260/230	Concentração ng/ μ L	260/280	260/230
0 horas	734	1,94	2,34	976	1,99	2,51
2 horas	664	2,01	2,34	890	2,12	2,53
12 horas	702	1,5	2,32	696	2,11	2,23
24 horas	430	2,1	2,23	666	2,14	2,33
48 horas	460	1,96	2,33	384	2,13	2,23
4 dias	358	2,01	2,23	372	2,11	2,43
7 dias	296	1,96	2,22	390	1,91	2,63
14 dias	265	1,96	2,22	236	2,09	2,63
28 dias	245	1,95	2,83	190	1,91	2,57

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose (1%), evidenciando as bandas do RNA ribossomal 18S e 28S. (A) amostras de RNA extraída de calos *C. procera* nos tempos de 0, 2, 12, 24 e 48 horas e 4, 7, 14 e 28 dias de exposição ao meio MS controle (nas bandas de 1-9) e ao meio MS com NaCl 80 mM (nas bandas de 10- 18); (B) amostras de RNA extraídas de calos *C. grandiflora* nos tempos de 0, 2, 12, 24 e 48 horas e 4, 7, 14 e 28 dias de exposição ao meio MS controle (nas bandas de 1-9) e ao meio MS com NaCl 80 mM (nas bandas de 10- 18).



5.9 Padronização da RT-PCR

A melhor temperatura de anelamento foi escolhida com base na realização de uma RT-PCR usando um gradiente de temperatura (Figura 15). Como resultados podemos verificar que ambos os *primers* tiveram uma faixa de amplificação bastante similar. O EF1 α foi entre 52-57 °C e a osmotina entre 53-57 °C, contudo a temperatura que foi selecionada para as análises posteriores foi a de 57 °C para ambos os *primers*.

Para verificar o melhor número de ciclos, foram realizadas sucessivas RT-PCRs com diferentes ciclos de amplificação, à temperatura de anelamento de 57 °C (Figura 16). A quantidade de ciclos selecionados para cada par de *primers* variou, sendo de 27 ciclos para o EF1 α e 33 ciclos para a equencia codificadora da osmotina.

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da amplificação da PCR do cDNA de *C. procera* com temperatura de anelamento em gradiente a 52, 53, 54, 55, 56 e 57 °C. (A) Amplificação usando os *primers* EF1 α ; (B) amplificação usando os *primers* CpOsm. O poço M, contém o marcador Φ X174 RF DNA/*Hae*III.

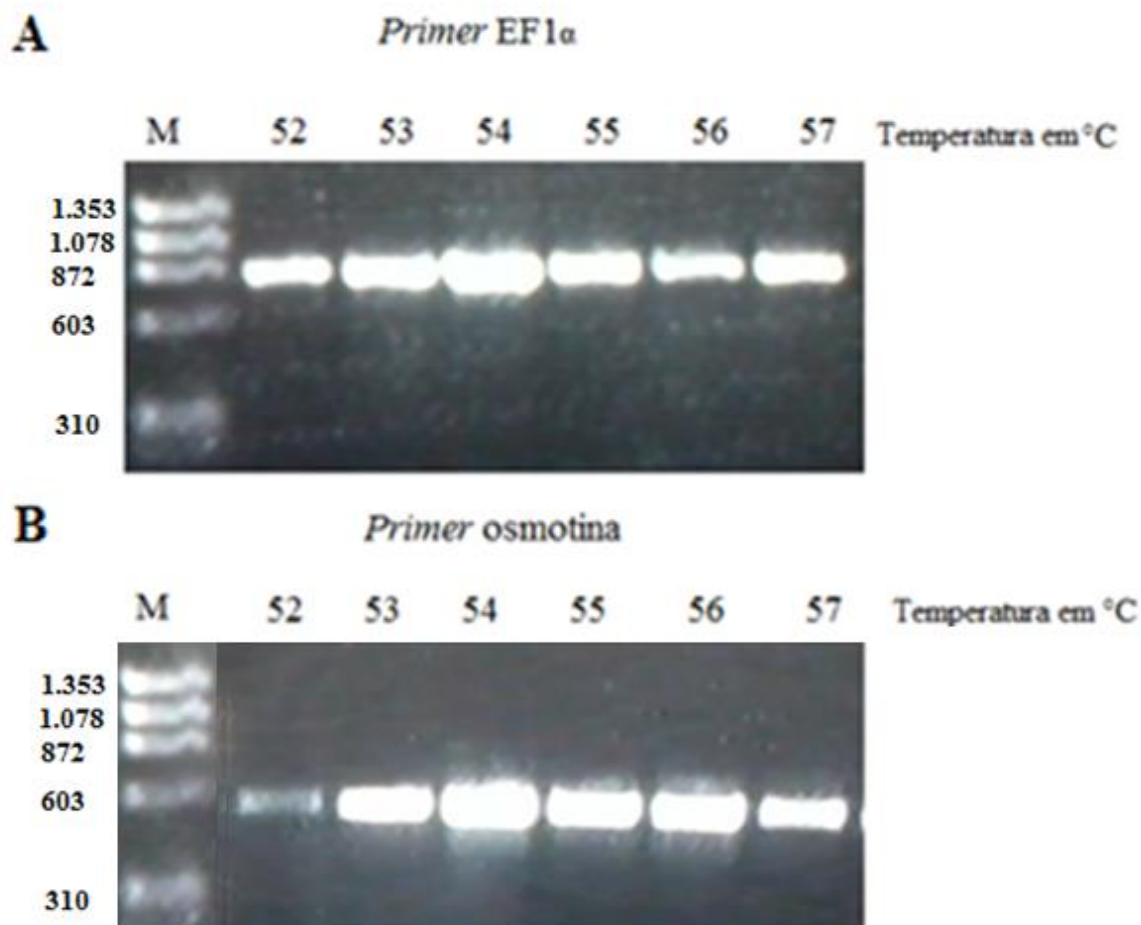
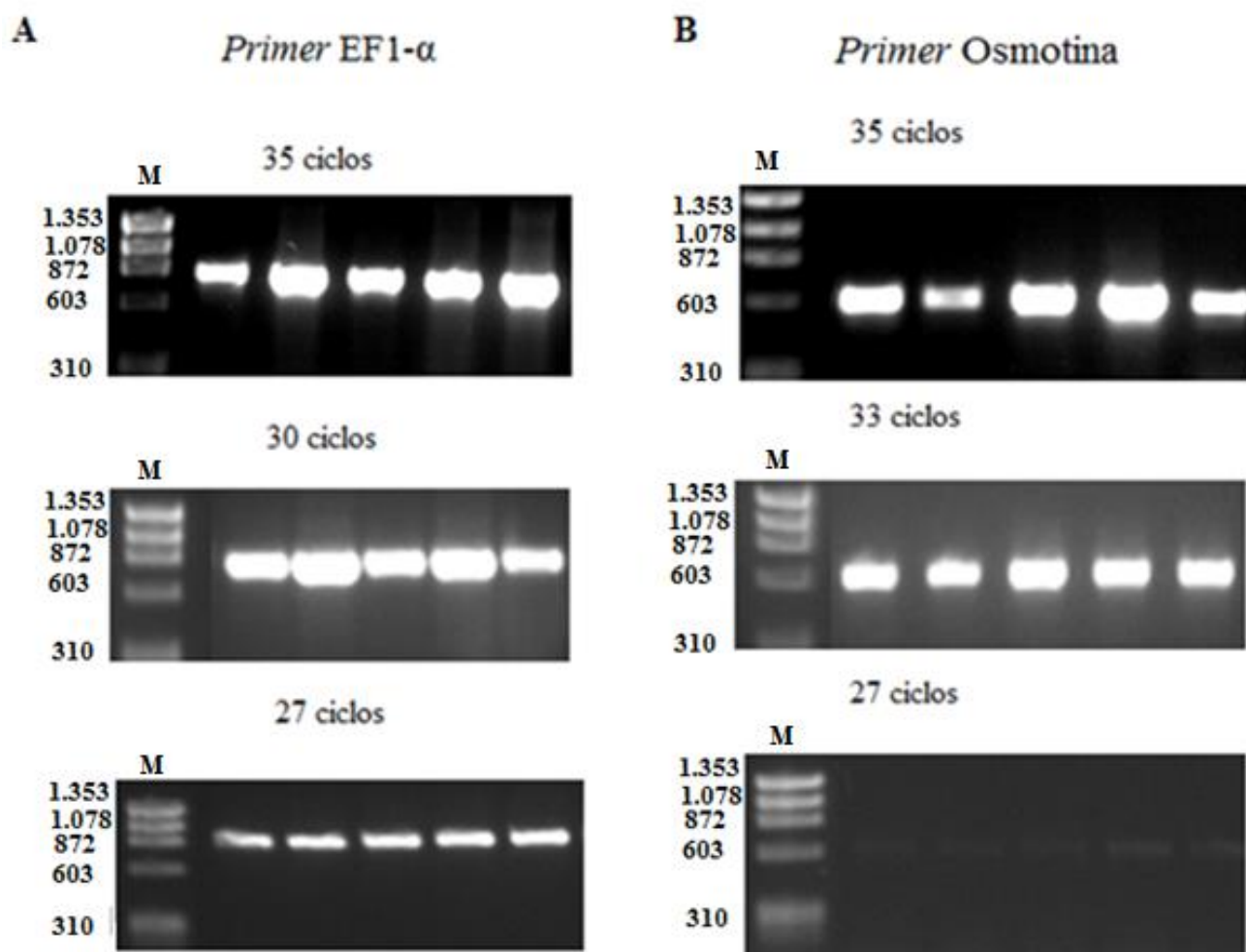


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 1% com o produto da amplificação da PCR do cDNA de *C. procera*. Foi realizada uma quantidade variada de ciclos com a temperatura de anelamento de 57°C utilizando os *primers* EF1 α (A) e os *primers* da osmotina (B). O poço M, refere-se ao marcador Φ X174 RF DNA/*Hae*III.



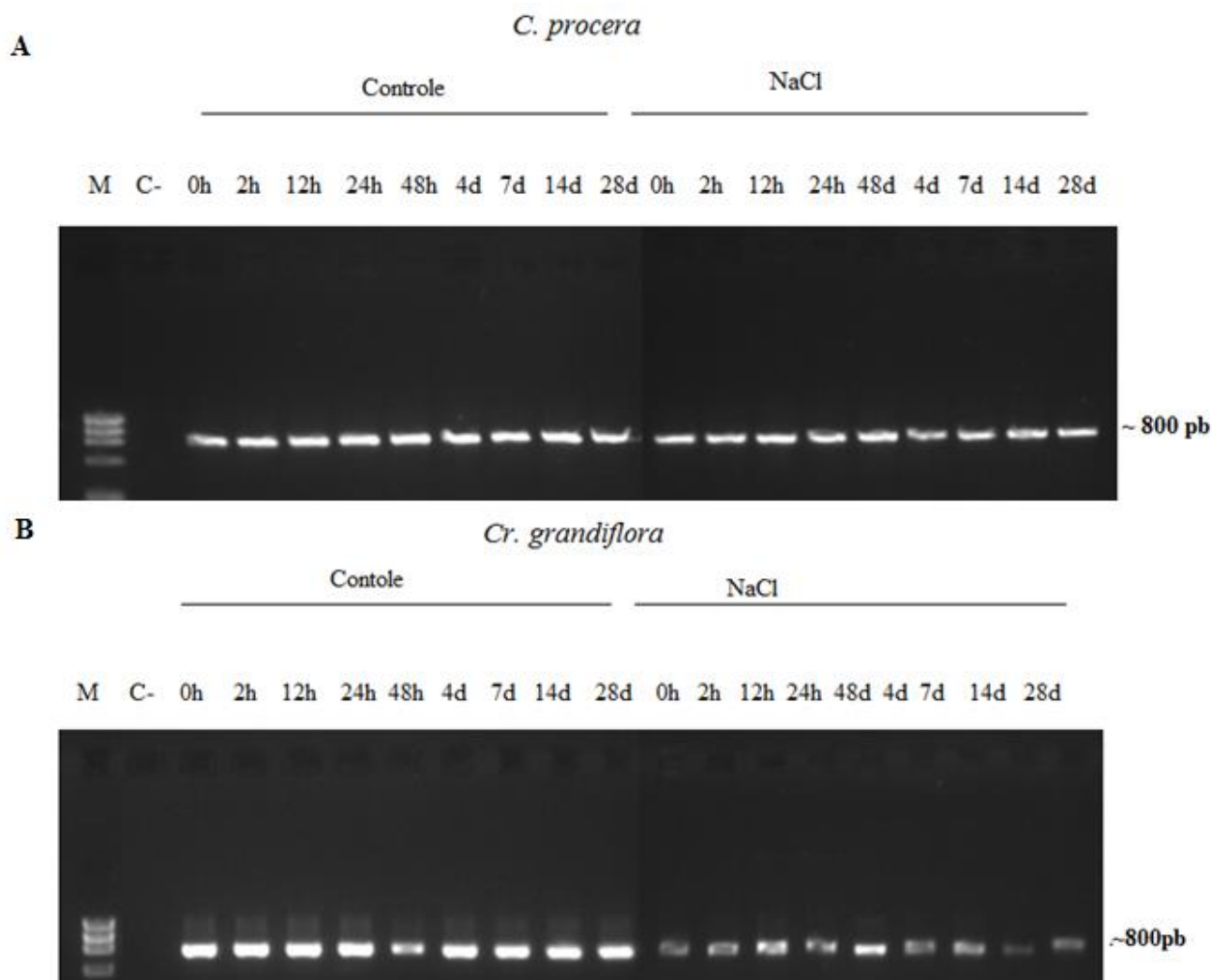
5.10 Qualidade e padronização do cDNA obtido pela reação de transcrição reversa

Para confirmar a integridade, a qualidade e a homogeneidade dos cDNAs sintetizados, uma amplificação prévia foi realizada empregando-se *primers* degenerados para o gene que codifica o fator de alongação *EF1 α* . Assim, utilizou-se todas as amostras de cDNA produzidas para certificar que o padrão de expressão apresentava-se homogêneo.

O *EF1 α* é utilizado como um controle constitutivo. Os genes *EF1 α* são altamente expressos em todos os tecidos de plantas, sendo considerados genes “Housekeeping” e, portanto, são usados para normalizar experimentos de análise da expressão gênica (SARAIVA, 2013).

A banda referente ao *amplicon* do gene EF1 α , usado para as reações, foi evidenciada nas diferentes amostras analisadas, demonstrando boa qualidade e uma homogeneidade entre as amostras do cDNA produzidos (Figura 17).

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose (1%), evidenciando a banda do *amplicon* para o gene EF1 α amplificado a partir de cDNA de calos (A) de *C. procera* nos tempos de 0, 2, 12, 24 e 48 horas e 4, 7, 14 e 28 dias de exposição ao meio MS controle (nas bandas de 3-11) e ao meio MS com NaCl 80 mM (nas bandas de 12-20); (B) de *Cr. grandiflora* nos tempos de 0, 2, 12, 24 e 48 horas e 4, 7, 14 e 28 dias de exposição ao meio MS controle (nas bandas de 3-11) e ao meio MS com 80 mM de NaCl (nas bandas de 12-20). O poço C-, refere-se ao controle negativo da reação. O poço M, refere-se ao marcador Φ X174 RF DNA/*Hae*III fragments, no qual possui fragmentos de 1.353, 1.078, 872, 603 e 310 pares de bases.



5.11 Relação entre as osmotinas e o estresse salino

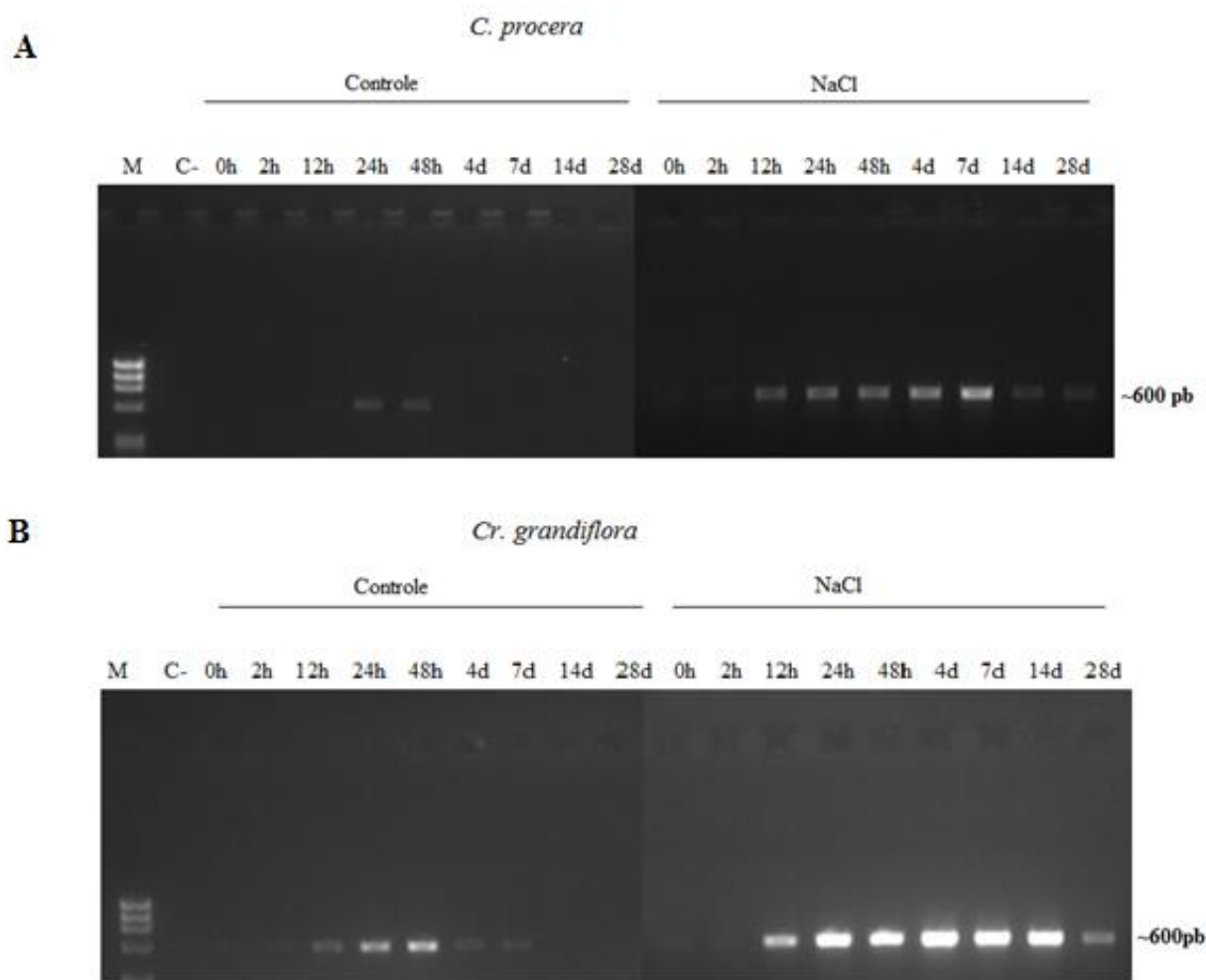
5.11.1 Análise da transcrição de osmotinas

Os resultados mostram que o gene da osmotina teve uma expressão induzida pelo contato com o meio de cultura MS, porém esta indução foi mais evidente e prolongada quando os calos foram submetidos a meio MS suplementado com NaCl. Esse padrão foi registrado para ambas as espécies (Figura 18).

Em *C. procera*, os transcritos da osmotina começaram a ser observados a partir de 12 horas de contato com o meio contendo NaCl 80 mM, e os transcritos tendem a acumular-se até o 7º dia de contato com o estresse, tendo uma redução de produção no 14º e 28º dia. No meio MS controle, foi observado o aparecimento de uma banda de menor intensidade nos tempos de 24 e 48 horas.

Os resultados mostram que nos calos de *C. grandiflora*, os transcritos da osmotina começaram a ser observados a partir de 12 horas de contato com o meio contendo NaCl 80 mM e o RNAm mostrou um pico de acúmulo a partir de 24 horas sendo mantido até o 14º dia de contato com o estresse, tendo uma diminuição no 28º dia. Observou-se também que o meio de cultura MS sem NaCl induziu os transcritos de osmotina entre o tempo de 12 horas a 7 dias de contato com o meio.

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose (1%), evidenciando a banda do *amplicon* do gene da osmotina amplificado a partir de cDNA de calos (A) de *C. procera* nos tempos de 0, 2, 12, 24 e 48 horas e 4, 7, 14 e 28 dias de exposição ao meio MS controle (nas bandas de 3-11) e ao meio MS com NaCl 80 mM (nas bandas de 12-20); (B) de *Cr. grandiflora* nos tempos de 0, 2, 12, 24 e 48 horas e 4, 7, 14 e 28 dias de exposição ao meio MS controle (nas bandas de 3-11) e ao meio MS com NaCl 80 mM (nas bandas de 12-20). O poço C-, refere-se ao controle negativo da reação. O poço M, refere-se ao marcador Φ X174 RF DNA/*Hae*III fragments, no qual possui fragmentos de 1.353, 1.078, 872, 603 e 310 pares de bases.

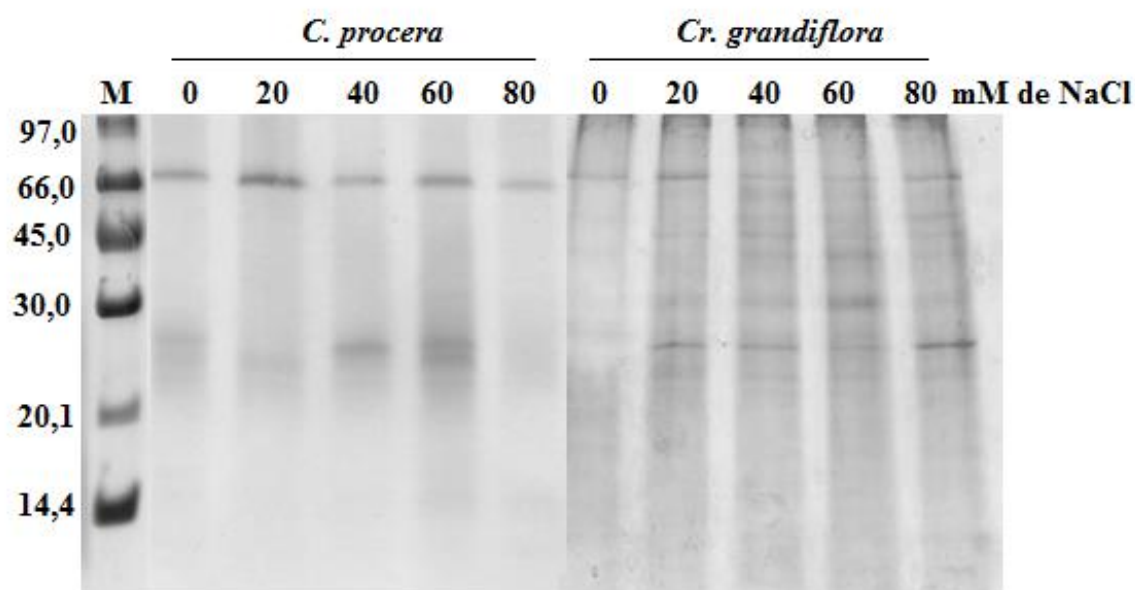


5.11.2 Avaliação da presença de osmotinas

Foram analisadas os extratos proteicos dos calos de *C. procera* e *C. grandiflora* submetidas a 28 dias de contato com concentrações crescentes de NaCl (0, 20, 40, 60 e 80 mM de NaCl), por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os resultados indicam a presença de proteínas de variadas massas moleculares, tendo a proteína mais predominante detectada em

uma massa próxima de 66 kDa, porém não foi apresentada a banda próxima a 22 kDa, referente à osmotina, em nenhuma das espécies em estudo (Figura 19).

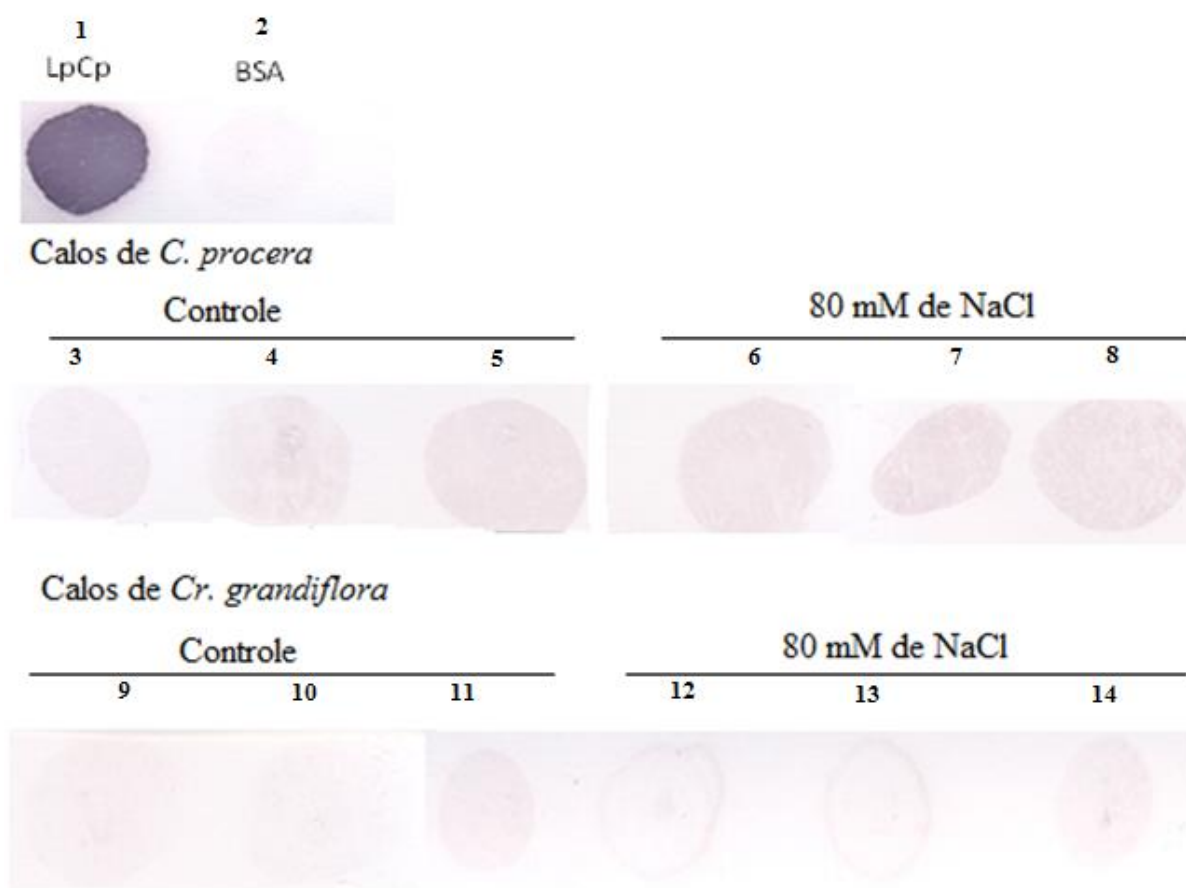
Figura 17 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%). Foram aplicadas 50 µg das amostras dos extratos proteicos e o gel foi corado com Comassie Brilliant Blue R-250. Os poços 2- 6 são referentes aos extratos proteicos de calos de *C. procera* após 28 dias de tratamento em meio contendo NaCl a 0, 20, 40, 60 e 80 mM. Os poços 7- 11 são referentes aos extratos proteicos de calos de *Cr. grandiflora* após 28 dias de tratamento em meio contendo NaCl a 0, 20, 40, 60 e 80 mM.



Como foi observado, os géis de eletroforese não indicavam a presença da osmotina madura em calos de *C. procera* e *Cr. grandiflora* submetidos ao cultivo em meio MS e suplementados com NaCl (0 a 80 mM). Com intuito de comprovar a existência desta proteína foi realizada a técnica de *Dot blotting*, com anticorpos policlonais anti-osmotina de *C. procera*.

O *Dot blotting* demonstrou que não houve um reconhecimento específico do anticorpo anti-osmotina no extrato proteico dos calos de ambas as espécies, sendo observada apenas uma fraca reação não específica nos calos de *C. procera* (Figura 20).

Figura 18 - *Dot Blotting* de extratos proteicos de calos de *C. procera* e *C. grandiflora*. Os círculos representam: (1) controle positivo- proteínas do látex de *C. procera*, (2) controle negativo- BSA, proteínas dos calos de *C. procera* (3) 0 horas de contato com o meio controle, (4) 7 dias de contato com o meio controle, (5) 28 dias de contato com o meio controle, (6) 0 horas de contato com 80 mM de NaCl, (7) 7 dias de contato com o meio com 80 mM de NaCl, (8) 28 dias de contato com 80 mM de NaCl; proteínas dos calos de *Cr.grandiflora* (9) 0 horas de contato com o meio controle, (10) 7 dias de contato com o meio controle, (11) 28 dias de contato com o meio controle, (12) 0 horas de contato com 80 mM de NaCl, (13) 7 dias de contato com o meio com 80 mM de NaCl, (14) 28 dias de contato com 80 mM de NaCl



Com o intuito de verificar a presença da osmotina por uma ferramenta mais sensível, foi realizada a espectrometria de massas das amostras de *C. procera* e *C. grandiflora*. Para isso, coletou-se proteínas dos tempos que houve o pico de transcrição de osmotinas. Os resultados não foram conclusivos. Apesar disso, os resultados mostram que não houve a detecção da proteína osmotina em nenhuma das amostras, sendo predominante o aparecimento de proteínas do tipo *Housekeeping* e de peroxidases (Tabela 4).

Em calos de *C. procera* foram identificadas doze proteínas, entre elas, sete peroxidases com massa molecular variando de 37 kDa a 40 kDa; uma protease cisteínica com massa molecular semelhante a 40 kDa; e outras proteínas do metabolismo basal. A presença de proteases e peroxidase por esta técnica corroboram com os ensaios *in vitro*, já que foi observado por ensaio colorimétrico a atividade dessas enzimas.

Nos calos de *C. grandiflora*, foram detectadas sete proteínas, dentre elas se destacam cinco peroxidases com massas moleculares variando de 40 a 37 kDa; um inibidor de protease com massa molecular de 23 kDa e uma pectina metil esterase com massa molecular de 35 kDa. Ensaio colorimétrico realizados com esse material indicaram a presença da atividade de peroxidase. Estudos realizados por SILVA (2015), indicam a presença de inibidor de proteases em amostras proteicas de calos de *C. grandiflora*.

A presença de peroxidases nos calos de ambas as espécies pode estar associada à importância do papel fisiológico dessa proteína, uma vez que as peroxidases estão presentes em quase todos os organismos vivos (HIRAGA *et al.*, 2001). Nas plantas, elas estão envolvidas em diferentes papéis fisiológicos: lignificação da parede celular, ligação cruzada entre proteínas de parede celular, tolerância à salinidade, senescência e defesa contra patógenos (HIRAGA *et al.*, 2001). As peroxidases são classificadas como pertencente à família 9 de proteínas relacionadas à patogênese (van LOON *et al.*, 2006). Sabe-se da existência de peroxidases no látex de *C. procera* (FREITAS, 2009) e no látex de *C. grandiflora* (FREITAS, 2010), o que leva a supor que estas enzimas estejam envolvidas em processos de defesa destas espécies.

Tabela 4 - Lista de proteínas identificadas por espectrometria de massas ESI-QUAD-TOF a partir de extratos proteicos de calos de *C. procera* e *C. grandiflora*, submetidos a 0 horas 7 e 28 dias de contato com o meio MS controle e adicionado de 80 mM de NaCl. Estas foram caracterizadas pela massa molecular e pI teóricos, sequências dos peptídeos incomuns, o número de entrada no NCBI, e a origem das proteínas.

Amostras	Teórico		Score	ID	Sequência de Peptídeo	Descrição e origem das Proteínas Identificadas
	Massa Molecular	pI				
Calos <i>C. procera</i> Controle 0 horas	38	8.4	97	gi 703103599	DIGQAAGLLR DSVFLSNGPDYAVPLGR	Peroxidase 12 (<i>Morus notabilis</i>)
	87	6.7	95	gi 974782	YLFAGVVDGR FALESFWDGK	Metionina sintase independente de cobalamina (<i>Solenostemon scutellarioides</i>)
	39	5.53	95	gi 218138216	DIGQAAGLLR DSVFLSGGPDYEVPPLGR	Peroxidase 4 (<i>Litchi chinensis</i>)
	38	5.28	94	gi 702382306	DIGQAAGLLR DSVFLSGGPEYDVPLGR	Peroxidase-like 12 (<i>Eucalyptus grandis</i>)
	21	9.8	72	gi 168828727	SLPIAAGLLR SLPDAAGLLR	Fator de transcrição R2R3-Myb14 (<i>Pinus taeda</i>)
	39	6.56	60	gi 218157	VAPEVIAEYTVR	Aldolase citoplasmática (<i>Oryza sativa Japonica</i>)
	35	8.9	57	gi 565386264	MGQLNVLTGSKGEIR	Malato desidrogenase, mitocondrial-like (<i>Solanum tuberosum</i>)
	39	8.42	55	gi 55057256	MGQLNVLTGSKGEIR	Peroxidase (<i>Picea abies</i>)
Calos <i>C. procera</i> Controle 7 dias	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Calos <i>C. procera</i> Controle	38	8.46	79	gi 703103599	DIGQAAGLLR DSVFLSNGPDYAVPLGR	Peroxidase 12 (<i>Morus notabilis</i>)

28 dias	40	4.77	59	gi 26452046	VVTIDGYEDVPR	Protease cisteínica RD21A (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
Calos <i>C. procera</i> 80 mM de NaCl 0 horas	85	5.9	198	gi 8134568	FALESFWDGK YLFAGVVDGR AGINVIQIDEAALR YGAGIGPGVYDIHSPR	Metionina sintase independente da vitamina B12 (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>)
	38	6.4	124	gi 2213867	GILAADESTGTIGK VAPEVIAEYTVR	Aldolase frutose-bifosfato (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>)
	35	8.9	80	gi 565386264	LALYDIAGTPGVAADVS HINTR DDLFNINAGIVK	Malato desidrogenase, mitocondrial (<i>Solanum tuberosum</i>)
	39	8.4	62	gi 55057256	MGQLNVLTGSKGEIR	Peroxidase (<i>Picea abies</i>)
	40	5.8	62	gi 9931567	MGQLDVLTSQGEIR	Peroxidase classe III (<i>Pinus sylvestris</i>)
	39	7.5	60	gi 563426020	DSVFLSGGPDYDLPLGR	Prx02 (<i>Brunfelsia pauciflora var</i>)
Calos <i>C. procera</i> 80 mM de NaCl 7 dias	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Calos <i>C. procera</i> 80 mM de NaCl 28 dias	39	6.5	76	gi 218157	VAPEVIAEYTVR	Aldolase citoplasmática (<i>Oryza sativa Japonica Group</i>)
	37	7.5	67	gi 223931156	DPTMDQTFNLR YYVDLMNR	Peroxidase (<i>Doritis pulcherrima</i>)
Calos de <i>C. grandiflora</i> Controle 0 horas	39	7.5	100	gi 563426020	DSVFLSGGPDYDLPLGR YYVDLMNR	Prx02 (<i>Brunfelsia pauciflora var</i>)
	39	5.5	84	gi 218138216	DSVFLSGGPDYEVPLGR YYVDLMNR	Peroxidase 4 (<i>Litchi chinensis</i>)
	37	7.5	67	gi 223931156	DPTMDQTFNLR YYVDLMNR	Peroxidase (<i>Doritis pulcherrima</i>)
Calos de <i>C.</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<i>grandiflora</i> Controle 7 dias							
Calos de <i>grandiflora</i> Controle 28 dias	C.	ND	ND	ND	ND	ND	
Calos de <i>grandiflora</i> 80 mM de NaCl 0 horas	C.	39	7.5	76	gi 563426020	DSVFLSGGPDYDLPLGR	Prx02 (<i>Brunfelsia pauciflora</i> var)
		39	5.5	59	gi 218138216	DSVFLSGGPDYEVPLGR	Peroxidase 4 (<i>Litchi chinensis</i>)
Calos de <i>grandiflora</i> 80 mM de NaCl 7 dias	C.	39	5.5	131	gi 218138216	DSVFLSGGPDYEVPLGR YYVDLMNR YYVDLMNR QGLFTSDQDLYTDKR	Peroxidase 4 (<i>Litchi chinensis</i>)
		39	7.5	111	gi 563426020	DSVFLSGGPDYDLPLGR YYVDLMNR	Prx02 (<i>Brunfelsia pauciflora</i> var)
Calos de <i>grandiflora</i> 80 mM de NaCl 28 dias	C.	38	5.2	104	gi 702382306	DIGQAAGLLR DSVFLSGGPEYDVPLGR	Peroxidase- like 12 (<i>Eucalyptus grandis</i>)
		37	7.5	97	gi 223931156	DPTMDQTFNNLR YYVDLMNR	Peroxidase (<i>Doritis pulcherrima</i>)
		40	6.9	75	gi 720015983	DIGQAAGLLR MGQLIVLTGTQGEIR	Peroxidase-like 12 (<i>Nelumbo nucifera</i>)
		35	6.6	56	gi 160419153	SVVDGWTTFR	Pectina metil esterase (<i>Actinidia deliciosa</i>)
		23	4.9	54	gi 35187106	VSTD LNIK	Inibidor de tripsina Kunitz 4 (<i>Populus trichocarpa</i>)

Como mecanismos de defesa à salinidade as plantas alteram a transcrição de gene e intensificam a produção de proteínas relacionadas à proteção ao estresse salino. Uma proteína comumente relacionada ao estresse salino é a osmotina. Neste estudo, foi observado à indução na produção de transcritos de osmotinas à medida que os calos de *C. procera* e *C. grandiflora* foram transferidos para um novo meio de cultura. Porém, a expressão da osmotina foi mais evidente e prolongada quando os calos foram transferidos para meio de cultura MS adicionado de 80 mM de NaCl, no qual possuía um osmolaridade 2,5 vezes maior que o meio controle.

Muitos trabalhos relatam a indução da osmotina sob condições de estresse salino. Onishi e colaboradores (2006) estudaram o comportamento da expressão da osmotina de soja em concentrações elevadas de NaCl. Os resultados apontam que transcritos desta proteína foram induzidos sob condições estressantes, porém a intensidade e o período de indução foi dependente do tecido em estudo. O autor justifica a indução rápida de transcrição da osmotina ao fato do elevado acúmulo de Na^+/Cl^- que ocorre na soja, já que em tecidos que não acumularam íons não houve a expressão. Assim esses íons seriam sinalizadores do estresse salino para transcrição da osmotina.

Estudos realizados com a osmotina identificada na pimenta, demonstraram a indução de transcritos por vários tipos de estresse incluindo o estresse salino causado por NaCl. Neste trabalho, os autores sugeriram que o sinal indutor da transcrição do RNAm seria o estresse osmótico, causado por NaCl e/ou déficit hídrico (HONG *et al.*, 2004). Estas observações sobre os sinalizadores do estresse para síntese de transcritos de osmotinas podem ser associadas com a regulação dos transcritos de osmotinas nas espécies em estudo, já que os calos sofreram um estresse osmótico e acúmulo de íons.

Estudos com expressão da osmotina mostram que ela ajuda a sobrevivência das plantas em condições de estresse salino, porém o mecanismo de ação preciso da mesma ainda não foi relatado na literatura (PARKHI *et al.*, 2009). Acredita-se que a função da osmotina seja de soluto compatível, aumentando o potencial osmótico das células (VIKTOROVA, 2012).

Outro fato descrito na literatura é que a osmotina induz de alguma forma o acúmulo de prolina (ABDIN, 2011). Como já foi discutido, houve um acúmulo na concentração de prolina dos calos submetidos a estresse nas duas espécies em estudo. Este

acúmulo de prolina pode estar relacionado à produção de osmotina, sendo necessárias investigações mais específicas para afirmar uma possível correlação.

Em relação aos resultados referentes à produção da proteína osmotina, podemos afirmar que não foram conclusivos. Nestes, não observamos a presença de osmotina através das técnicas de eletroforese, *Dot blotting* e espectrometria de massas. Resultados obtidos por LaRosa e colaboradores (1992) também citam as dificuldades de estabelecer relações entre o nível de transcrição da osmotina com a produção da proteína madura. Hipotetizamos que o não reconhecimento da osmotina por anticorpos se dá devido à pequena concentração de osmotina que foi acumulada em resposta a indutores. Desta forma, este trabalho não conseguiu estabelecer uma relação entre transcritos de osmotinas e proteínas maduras. Mas, acredita-se que esta proteína possua alguma relação com a proteção ao estresse salino, já que foi vista a indução da transcrição dos seus respectivos genes.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que os mecanismos de tolerância à salinidade foram diferentes entre as espécies em estudo. Os calos de *Calotropis procera* apresentaram um menor dano quando expostos a concentrações elevadas de sal, quando comparados com os calos de *Cryptostegia grandiflora*. A salinidade causou um desequilíbrio iônico em ambas as espécies, e elas desenvolveram mecanismos de ajuste osmótico. Foi evidente a existência de uma relação das osmotinas destas espécies com a proteção a condições de salinidade, já que o estresse salino favoreceu o aumento da transcrição dos genes destas. As proteínas correspondentes aos genes de osmotinas não foram detectadas pelas técnicas utilizadas.

REFERÊNCIAS

- ABDIN, M.Z.; KIRAN, U.; ALAM, A. Analysis of osmotin, a PR protein as metabolic modulator in plants. **Bioinforma**, v. 5, p. 336-340, 2011.
- AKTAS, H.; ABAK, K.; CAKMAK, I. Genotypic variation in the response of pepper to salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 260-266, 2006.
- ALBUQUERQUE, T.M.; ALENCAR, N.M.N.; FIGUEIREDO, J.G.; FIGUEIREDO, I.S.T.; TEIXEIRA, C.M.; BITENCOURT, F.S.; SECCO, D.D.; ARAUJO, E.S.; LEAO, A.M.C.A.; RAMOS, M.V. Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**, v. 53, p.15-23, 2009.
- ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, J.S.; MESQUITA, R.O.; LIMA, M.W.; VALE, M.R.; ETHELLES, J.P.; FREITAS, C.D.T.; RAMOS, M.V. Pro- and antiinflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflammation Research**, v. 55, p. 559-564, 2006.
- ALVAREZ, I.; TOMARO, M.L.; BENAVIDES, M.P. Changes in polyamines, proline and ethylene in sunflower calluses treated with NaCl. **Plant Cell Tiss**, v.74, p. 51-59, 2003.
- AMTMANN, A.; SANDERS, D. Mechanism of Na⁺ uptake by plant cells. **Advances in Botanical Research**, v. 29, p. 75-112, 1999.
- ANDRADE, S.R.M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Planaltina: Embrapa, v.1, p. 1- 14, 2002.
- AOKI, Y.; TAKAHASHI, S.; TAKAYAMA, D.; OGATA, Y.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; ASAWATREERATANAKUL, K.; WITITSUWANNAKUL, D.; WITITSUWANNAKUL, R.; SHIBATA, D.; KOYAMA, T.; NAKAYAMA, T. Identification of laticifer-specific genes and their promoter regions from a natural rubber producing plant *Hevea brasiliensis*. **Plant Science**, v. 225, p. 1-8, 2014.
- APSE, M. P.; BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 146-150, 2002.
- ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v.82, p.1227- 1238, 2002.
- ARYA, S.; KUMAR, V.L. Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 4, p. 228-232, 2005.
- ASHRAF, M., FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206–216, 2007.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, p. 3-16, 2004.

ATTIPALI, R.R.; KOLLURU, V.C.; MUNUSAMY, V. Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **J Plant Physiol**, v. 161, p.1189-1202, 2004.

AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENEAS-FILHO, J.; MEDEIROS, J.-V. R.; GOMES-FILHO, E. Hydrogen peroxide pretreatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.1114-1122, 2005.

AZEVEDO-NETO, A. D.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T. Salinity and oxidative stress. In: KHAN, N. A.; SINGH, S. (eds.). Abiotic stress and plant responses. New Delhi: I.K. International, c.4, v.1, p.57-82, 2008

BARAKAT, M.N; ABDEL-LATIF, T.H. In vitro selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration. **Euphytica**, v.91, p. 127–140, 1996.

BARTHAKUR, S.; BABU, V.; BANSAL, K.C. OVER-expression of osmotina induces proline accumulation and confers tolerance to osmotic stress in transgenic tobacco. **J. Plant Biochem. Biotechnol.**, v.10, p. 31-37, 2001.

BATES,L.S.;WALDREN,R.P., TEARE,J.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and soil**, v.39, p.205-207,1973.

BEERS, R.F.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring thebreakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J. Biol. Chem**, v. 195, p.133-140, 1952.

BLUMWALD, E.; AHARON, G. S.; APSE, M. P. Sodium transport in plant cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1465, p. 140-151, 2000.

BORSANI, O., VALPUESTA, V., BOTELLA, M.A.. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 73, p. 101–115, 2003.

BOUTRAA, T. Effects of water stress on root growth, water use efficiency, leaf area and chlorophyll content in the desert shrub *Calotropis procera*. **J. Int. Environmental Application & Science**, v. 5, p. 124-132, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**., v. 72, p. 248-254, 1976.

BRESSAN, R.A.; BOHNERT, H.J.; HASEGAWA, P.M. Genetic engineering for salinitystress tolerance. **Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology**, v. 1, p. 347-384, 2008.

CANAVEZE, Y. Estrutura, origem e desenvolvimento de laticíferos e coléteres em plantas de *tabernaemontana catharinensis* a.dc. (rauvolfioideae, apocynaceae) em diferentes fases do

desenvolvimento vegetativo. 2012. 113f. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Instituto de Biociências. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, São Paulo, 2012.

CANÇADO, G.M.A.; RIBEIRO, A.P.; FREITAS, G.F.; SÁ, M.E.L.; SILVA, H.E.; PASQUAL, M.; VAL, A.D.B.; NUNES, C.F. Cultivo de plantas *in vitro* e suas aplicações. **Informe Agropecuário**, v.30, p.64-74, 2009.

CAVALHEIRO, M.G. Caracterização Bioquímica Parcial do Látex de *Cryptostegia grandiflora* R. Br. e Ação Contra o Vetor da Dengue. 2010. 127p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Departamento de bioquímica e biologia molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2010.

CHAKRABORTY, K.; SAIRAM, R.K.; BHATTACHARYA, R.C. Differential expression of salt overly sensitive pathway genes determines salinity stress tolerance in Brassica genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 51, p. 90-101, 2012.

CHOEDON, T., MATHAN, G., ARYA, S., KUMAR, V.L., KUMAR, V. Anticancer and cytotoxic properties of the *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 12, p. 2517-2522, 2006.

CORI, P.; LUCIOLI, S.; FRATTARELLI, A.; NOTA, P.; TEL-OR, E.; BENYAMINI, E.; GOTTLIEB, H.; CABONI, E.; FORNI, C. Characterization of the response of in vitro cultured *Myrtus communis* L. plants to high concentrations of NaCl. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 420- 426, 2013.

COSTA, J. H. ; MOTA, E. F. ; CAMBURSANO, M. V. ; LAUXMANN, M. A. ; OLIVEIRA, L. M. N. ; SILVA LIMA, M. G. ; ORELLANO, E. G. ; FERNANDES DE MELO, D. Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (VuAox1 and 2b) genes in *Vigna unguiculata*. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 561-570, 2010.

COSTA, P.H.A.; SILVA, J.V.; BEZERRA, M.A.; ENÉAS FILHO, J.; PRISCO, J.T.; GOMES FILHO, E. Crescimento e níveis de solutos orgânicos e inorgânicos em cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos à salinidade. **Revista Brasil. Bot.**, v. 26, p. 289-297, 2003.

COSTA, R.G.; MEDEIROS, A.N.; ALVES, A.R.; MEDEIROS, G.R. Perspectivas de utilização da flor-de-seda (*Calotropis procera*) na produção animal. **Revista Caatinga**, v. 22, p. 1-9, 2009.

CROUGHAN, T.P.; STAVAREK, S.J.; RAINS, D.W. In vitro development of salt resistance of plants. **Environ Exp Bot**, v. 21, p. 317-324, 1981.

CUSHMAN, J.C.; DE ROCHER, E.J.; BOHNERT, H.J. Gene expression during adaptation to salt stress. In: KATTERMAN, E., Environmental Injury to Plants. **Academic Press**, v.23, p.173-203, 1990.

D'SOUZAA RJ, VARUNA M, MASIHB J, PAUL MS. Identification of *Calotropis procera* L. as a potential phytoaccumulator of heavy metals from contaminated soils in urban North Central India. **J Hazard Mater**, v. 184, p. 457-464, 2010.

DEWAN, S.; KUMAR, S.; KUMAR, V.L. Antipyretic effect of latex of *Calotropis procera*. **Ind J Pharmacol**, v. 32, p. 247-252, 2000b.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **J Ethnopharmacology**, v. 73, p. 307-311, 2000a.

DOAK, A.; DEVEZE, M.; MARCH, N.; OSMOND, R.; MCKENZIE. **Rubber Vine Management: control methods and case studies**. The State of Queensland (Department of Natural Resources, Mines and Energy), 2004.

EHSANZADEH, P.; NEKOONAM, M.S.; AZHAR, J.N.; POURHADIAN, H.; SHAYDAEE, S. Growth, chlorophyll, and cation concentration of tetraploid wheat on a solution high in sodium chloride salt: hulled versus free-threshing genotypes. **J. Plant Nutri.**, v. 32, p. 58–70, 2009.

FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 307-319, 2004.

FLOWERS, T. J.; TROKE, P. F.; YEO, A. R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 28, p. 89-121, 1977.

FREITAS, C. D. T. Identificação, purificação, caracterização e atividade biológica de proteínas do látex de *Calotropis procera* envolvidas na defesa da planta. Tese (Doutorado em bioquímica). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, 2009.

FREITAS, C. D. T.; NOGUEIRA, F. C. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; DOMONT, G. B.; RAMOS, M. V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 738-743, 2011a.

FREITAS, C. D. T.; LOPES, J. L. S.; BELTRAMINI, L. M.; OLIVEIRA, R. S. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; RAMOS, M. V. Osmotin from *Calotropis procera* latex: New insights into structure and antifungal properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 2501-2507, 2011b.

FREITAS, C.D.T.; SOUZA, D.P.; ARAUJO, E.S.; CAVALHEIRO, M.G; OLIVEIRA L.S.; RAMOS, M.V. Anti-oxidative and proteolytic activities and protein profile of laticifer cells of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**; v. 22, p.11-22, 2010.

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

GARCIA, G.O.; FERREIRA, P.A.;MIRANDA, G.V.; NEVES, J.C.L; MORAES, W.B.; SANTOS,D.B. Teores foliares dos macronutrientes catiônicos e suas relações com o sódio em plantas de milho sob estresse salino. **IDESIA**, v. 25, p. 93-116, 2007.

GARG, A. K.; KIM, J. -K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; CHOI, Y. D.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance to different abiotic stresses. **PAS**, v. 99, p. 15898-15903, 2002.

GEORGE, E. F., HALL, M. A., DE KLERK, G.J. **Plant Propagation by Tissue Culture**, v.1, p. 1-28, 2008.

GHANE, S.G.; LOKHANDE, V.H.; NIKAM, T.D. Growth, Physiological, and Biochemical Responses in Relation to Salinity Tolerance for *In Vitro* Selection in Oil Seed Crop *Guizotia abyssinica* Cass. **J. Crop Sci. Biotech**, v. 17, p. 11-20, 2014.

GHOULAM, C.; AHMED, F.; KHALID, F. Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 139-150, 2001.

GOMES, S.M. Morfo-anatomia de frutos secos em espécies de Apocynaceae: significado ecológico e evolutivo. **Acta bot. bras.**, v.22, p. 521-534. 2008.

GONDIM, F. A.; GOMES-FILHO, E. ; **COSTA, J. H.**; MENDES ALENCAR, N. L.; PRISCO, J. T. Catalase plays a key role in salt stress acclimation induced by hydrogen peroxide pretreatment in maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 62-71, 2012.

GOSSET, D.R.; MILLHOLLON, E.P.; LUCAS, M.C. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. **Crop Science**, v. 34, p. 706-714, 1994

GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 31, p. 149-190, 1980.

GRICE, A.C.; RADFORD, I.J.; ABBOTT, B.N. Regional and landscape-scale patterns of shrub invasion in tropical savannas. **Biological Invasions**, v. 2, p.187-205, 2000

GUO, W.L., WU, R., ZHANG, Y.F., LIU, X.M., WANG, H.Y., GONG, L., ZHANG, Z.H., LIU, B. Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. **Plant Cell Rep.**, v. 26, p. 1297–1307, 2007.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. **International Journal of Genomics**, v.1, p. 1-18, 2014.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? The secret of life of laticifers. **Trends in Plant Sciences**, v. 12, p. 631-639, 2008.

HASEGAWA, P. M. Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 92, p. 19-31, 2013.

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

HASSAN, L.M.; GALAL, T.M.; FARAHAT, A.E.; EL-MIDANY, M.M. The biology of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. **Trees**, v. 29, p 1-10, 2015.

HASSAN, N.M.; SERAG, M.S.; EL-FEKY, F.M.; NEMAT ALLA, M.M. In vitro selection of mung bean and tomato for improving tolerance to NaCl. **Ann. Appl. Biol.**, v. 152, p. 319–330, 2008.

HASSAN, N.S.; WILKINS, D.A. In vitro selection for salt tolerant lines in *Lycopersicon peruvianum*. **Plant Cell Rep.**, v.7, p.463–466, 1988.

HE, S.; HAN, Y.; WANG, Y.; ZHAI, H.; LIU, Q. In vitro selection and identification of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants tolerant to NaCl. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 96, p. 69–74, 2009.

HEATH, R.L.; PACKER. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I.kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.125, p. 189- 198, 1968.

HERRERA, O.; MAJOR, I. Visitantes Perigosos no Nordeste – Brasil Tropical. **Ciência Hoje**, v. 38, p.42-44, 2006.

HIRAGA, S., SASAKI, K., ITO, K., OHASHI, Y., MATSUI H. A Large Family of Class III Plant Peroxidases. **Plant and Cell Physiology.**, v. 42, p. 62-468. 2001.

HONG, J. K.; JUNG, H. W.; LEE, B. K.; LEE, S. C.; LEE, Y. K.; HWANG, B. K. An osmotin-like protein gene, *caosm1*, from pepper: differential expression and in situ localization of its mrna during pathogen infection and abiotic stress. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 64, p. 301-310, 2004.

HOSSAIN, Z.; MANDAL, A.K.A.; DATTA, S.K.; BISWAS, A.K. Development of NaCl tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line. **J. Biotechnol.**, v. 129, p. 658–667, 2007.

HUSAINI, A. M.; ABDIN, A. Z. Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress. **Plant Science**, v. 174, p. 446-455, 2008.

IKEUCHI, M.; SUGIMOTO, K.; IWASE, A. Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. **The Plant Cell**, v. 25, p. 3159–3173, 2013.

KANESAKI, Y., SUZUKI, I., ALLAKHVERDIEV, S.I., MIKAMI, K., MURATA, N. Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 290, p. 339–348, 2002.

KEKWICK, R.G.O. Latex and Laticifers. **Encyclopedia of Life Science**; Nature Publishing Group, 1-6, 2002.

KEREPESI, I.; BANYAI-STEFANOVITS, E.; GALIBA, G. Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 131-133, 2004.

KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Crop Science**, v. 40, p. 482-487, 2000.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2 ed. São Paulo: Editora BASF, 978 p., 1999.

KOEHLER, L.H. Differentiation of Carbohydrates by Anthrone Reaction Rate and Color Intensity. **Anal. Chem.**, v. 24, p. 1576–1579, 1952.

KONISHI, M.; SUGIYAMA, M. Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v.130, p. 637–5647, 2003.

KONO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1510-1530, 2011.

KUMAR, H.S.; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex *Calotropis procera*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 44, p. 123-125, 1994.

KUMAR, V. L.; CHAUDHARY, P.; OLIVEIRA, R. M.; RAMOS, M. V. *Calotropis procera* latex proteins ameliorate functional limitations associated with adjuvant induced inflammation in rat. **Musculoskeletal Biology**, v. 1, p. 1, 2014.

LA ROSA, P.C.; CHEN, Z.; NELSON, D.E.; SINGH, N.K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Osmotin gene expression is posttranscriptionally regulated. **Plant Physiol.**, v. 100, p.409-415, 1992.

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

LARHSINE, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.B.; WATALEB, C.S.; BOUSAID, M.; BEKKOUCHE, K. MARKOUK, M.; JANA, M. Screening of antibacterial and antiparasitic activities of six Moroccan medicinal plants. **Therapie**, v. 54, p.763-765, 1999.

LAURENCE, M. B.; VRIET, C.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; VAN DAMME, E. J. M.; ROUGE, P. A molecular basis for the endo- β -1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. **Biochimie**, v.85, p.123-131, 2003.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant and Cell Environment**, v.25, p.275-294, 2002.

LI, X.; YU, X.; WANG, N.; FENG, Q.; DONG, Z.; LIU, L.; SHEN, J.; LIU, B. Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum*). **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v.90, p.153–168, 2007.

LIMA-FILHO, J.V.; PATRIOTA, J.M.; SILVA, A.F.B.; FILHO, N.T.; OLIVEIRA, R.S.B.; ALENCAR, N.M.N.; RAMOS, M.V. Proteins from latex of *Calotropis procera* prevent septic shock due to lethal infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 327-334, 2010.

LIU, J. J.; STURROCK, R.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant Cell Reports.**, v. 29, p. 419-436, 2010.

LIU, T.; STADEN, J.V. Selection and characterization of sodium chloride-tolerant callus of *Glycine max* (L.) Merr cv. Acme. **Plant Growth Reg.**, v. 31, p. 195–207, 2000.

LOKHANDE, V.H.; NIKAM, T.D.; PENNA, S. Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 102, p. 17–25, 2010.

LOPES, K. L. B.; THADEO, M.; AZEVEDO, A. A.; SOARES, A. A.; MEIRA, R. M. S. A. Articulated laticifers in the vegetative organs of *Mandevilla atrovioleacea* (Apocynaceae, Apocynoideae). **Botany**, v. 87, p. 202-209, 2009.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2. ed. São Paulo: Instituto Planatarum, p. 250, 1999.

LU, S.; PENG, X.; GUO, Z.; ZHANG, G.; WANG, Z.; WANG, C.; PANG, C.; FAN, Z.; WANG, J. In vitro selection of salinity tolerant variants from triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* and *C. dactylon*) and their physiological responses to salt and drought stress. **Plant Cell Rep.**, v. 26, p. 1413–1420, 2007.

MAATHUIS, F. J. M.; AMTMANN, A. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. **Annals of Botany**, v. 84, p. 123-133, 1999.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity, drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139-158, 2005.

MAHLBERG, P. G. Laticifers: an historical perspective. **Bot. Rev.**, v. 59, p. 1–23, 1993.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: princípios e aplicações. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989.

MANSOUR, M. M. F.; SALAMA, K. H. A.; AL-MUTAWA, M. M. Transport proteins and salt tolerance in plants. **Plant Science**, v. 164, p. 891-900, 2003.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A. ; McKEE, R. A . Técnicas de cultura de tecidos. In: MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A . Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**, p. 101-181, 1994.

MARSHALL O. Per primer v 1. 1. 20. 2003-2011.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v.7, p. 405-410, 2002.

- MOHAMED, M.A.H.; HARRIS, P.J.C.; HENDERSON, J. In vitro selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. *Plant Sci.*, v. 159, p. 213–222, 2000.
- MONDAL, T.K., KUNDU, P.K., AHUJA, P.S. Gene silencing: a problem in transgenic research. ***Curr. Sci.***, v. 72, p. 699–700, 1997.
- MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. ***Phytologist***, v. 167, p. 645–663, 2005.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. ***Plant, Cell and Environment***, v. 25, p. 239–250, 2002.
- 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 bioassays with tobacco tissue cultures. ***Physiologia Plantarum***, v.15, p.473–497, 1962.
- MURTI Y, YOGI B, PATHAK D. Pharmacognostic standardization of leaves of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Asclepiadaceae). ***Int J Ayur Res***, v. 1, p. 14–17, 2010.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidases in spinach chloroplasts. ***Plant Cell Physiol.***, v. 22, p. 867–880, 1981.
- NARASIMHAN, M. L.; COCA, M. A.; JIN, J. B.; YAMAUCHI, T.; ITO, Y.; KADOWAKI, T.; KIM, K. K.; PARDO, J. M.; DAMSZ, B.; HASEGAWA, P. M.; YUN, D. J.; BRESSAN, R. A. Osmotin is a homolog of mammalian adiponectin and controls apoptosis in yeast through a homolog of mammalian adiponectin receptor. ***Molecular Cell***, v. 17, p. 611–611, 2005.
- NELSON, D.E.; RAGHOTHAMA, K.G.; SINGH, N.K.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Analysis of structure and transcriptional activation of an osmotin gene. ***Plant Mol. Biol.***, v. 19, p. 577–588, 1992.
- NEUMANN, P.M.; AZAIZEH, H.; LEON, D. Hardening of root cell walls: A growth inhibitory response to salinity stress. ***Plant, Cell and Environment***, v. 16, p. 15–24, 1994.
- NIU, X.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; PARDO, J. M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. ***Plant Physiology***, v. 109, p. 735–742, 1995.
- NOBÉCOURT, P. Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. ***Compt. Rendus Soc. Biol.***, p. 1270–1271, 1939.
- NOORI, S. A. S.; SOKHANSANJ, A. Wheat plants containing an osmotin gene show enhanced ability to produce roots at high NaCl concentration. ***Russian Journal of Plant Physiology***, v. 55, p. 256–258, 2008.
- OLIVEIRA, J.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; BEZERRA, D.P.; ALENCAR, N.M.N.; MARINHO-FILHO, J.D.B.; FIGUEIREDO, I.S.T.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; ALVES,

A.P.N.N.; RAMOS, M.V. In vivo growth inhibition of sarcoma by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 382, p. 139-149, 2010.

OLIVEIRA, R.S.B. Expressão heteróloga, caracterização cristalográfica e análise funcional de uma osmotina antifúngica de *Calotropis procera*. 2014. 127p. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Departamento de bioquímica e biologia molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

ONISHI, M.; TACHI, H.; KOJIMA, T.; SHIRAIWA, M.; TAKAHARA, H. Molecular cloning and characterization of a novel salt-inducible gene encoding an acidic isoform of pr-5 protein in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 574-580, 2006.

ORCUTT, D.M.; NILSEN, E.T. *Physiology of Plants Under Stress*. New York, John Wiley e Sons, 2000.

PARIDA, A., DAS, A.B., DAS, P. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. **J. Plant Biol.**, v. 45, p. 28–36, 2002.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324–349, 2005.

PARKHI, V.; KUMAR, V.; SUNILKUMAR, G.; CAMPBELL, L.M.; SINGH, N.K.; RATHORE, K.S. Expression of apoplastically secreted tobacco osmotin in cotton confers drought tolerance. **Mol. Breed.**, v.23, p. 625-639, 2009.

PATADE, V.W.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. **Plant Growth Regul**, v. 55, p. 169–173, 2008.

PATNAIK, J.; DEBATA, B.K. In vitro selection of NaCl tolerant callus lines of *Cymbopogon martinii*(Roxb.) Wats. **Plant Science**, v. 124, p. 203–210, 1997.

PÉREZ-CLEMENTE, R.M.; GÓMEZ-CADENAS, A. *In vitro* tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions. In: LEVA, A; RINALDI, M.R.R. **Recent advances in plant in vitro culture**, p 92–108, 2012.

PICKARD, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytologist**, v.177, p.877-888, 2008.

PIQUERAS, A., HERNANDEZ, J.A., OLMOS, E., HELLIN, E., SEVILLA, F. Changes in antioxidante enzymes and organic solutes associated with adaptation of citrus cells to salt stress. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 45, p. 53–60, 1996.

PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: Gheyi, H. R.; Dias, N. S.; Lacerda, C. F. (eds.). *Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados*. Fortaleza: INCT Sal, p. 143-159, 2010.

PUROHIT, M., SRIVASTAVA, S., SRIVASTAVA, P.S. Stress tolerant plants through tissue culture. In: SRIVASTAVA, P.S. *Plant Tissue Culture and Molecular Biology: Application and Prospects*. **Narosa Publishing House, New Delhi**, p. 554–578, 1998.

QUEIROS, F.; FIDALGO, F.; SANTOS, I.; SALEMA, R. In vitro selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. **Biol. Plant.**, v.51, p.728–734, 2007.

RAI, M.K.; KALIA, R.K.; SINGH, R., GANGOLA, M.P., DHAWAN, A.K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection—An overview of the recent progress. **Environmental and Experimental Botany**, v.71, p.89-98, 2011.

RAJAM, M. V.; CHANDOLA, N.; GOUD, P. S.; SINGH, D.; KASHYAP, V.; CHOUDHARY, M. L.; SIHACHAKR, D. Thaumatin gene confers resistance to fungal pathogens as well as tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. **Biologia Plantarum**, v.51, p.135-141, 2007.

RAMOS, M. V. ; SOUZA, D. P. ; GOMES, M. T. R. ; FREITAS, C. D. T. ; CARVALHO, C. P. S. ; JÚNIOR, P. A. V. R. ; SALAS, C. E. . A Phytopathogenic Cysteine Peptidase from Latex of Wild Rubber Vine *Cryptostegia grandiflora*. **The Protein Journal**, v.33, p.199-209, 2014.

RAMOS, M.V.; BANDEIRA, G.P.; FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALENCAR, N.M.N.; SOUSA, P.A.S.; CARVALHO, A.F.U. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**; v.1001, p.503-510, 2006.

RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; FREIRE, E.A.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; ARAUJO, E.S.; FREITAS, C.D.T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Anthropod-plant interactions**, v.4, p.57-67, 2010.

RAMOS, M.V.; PEREIRA, D.A.; SOUZA, D.P.; ARAUJO, E.S.; FREITAS, C.D.T.; CAVALHEIRO, M.G.; MATOS, M.P.V.; CARVALHO, A.F.U. Potential of laticifer fluids for inhibiting *Aedes aegypti* larval development: Evidence for the involvement of proteolytic activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, p.815-812, 2009b.

RAMOS, M.V.; AGUIAR, V.C.; XAVIER, A.A.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; BANDEIRA, G. P.; ALENCAR, N.M.N. Latex proteins from the plant *Calotropis procera* are partially digested upon in vitro enzymatic action and are not immunologically detected in fecal material. **Fitoterapia**, v.77, p.251-256, 2006.

RASIK, A.M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H.K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 68, p. 261-266, 1999.

REDDY, P.J.; VAIDYANATH, K. In vitro characterization of salt stress effects and the selection of salt tolerant plants in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor Appl Genet**, v. 71, p. 757-760, 1986.

REISS, E.; SCHLESIER, B.; BRANDT, W. cDNA sequences, MALDI-TOF analyses, and molecular modelling of barley PR-5 proteins. **Phytochemistry**, v. 67, p.1856-1864, 2006

RENGEL, Z. The role of calcium in salt toxicity. **Plant Cell Environment**, v. 15, p.625-632, 1992.

RICHARDS, L.A. (ED.). **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. Washington: US, Department of Agriculture, Handbook 60, 160p, 1954.

ROSHANDEL, P.; FLOWERS, T. The ionic effects of NaCl on physiology and gene expression in rice genotypes differing in salt tolerance. **Plant and Soil**, v. 315, p. 135-147, 2009.

SABBAH, S.; TAL, M. Development of callus and suspension cultures of potato resistant to NaCl and mannitol and their response to stress. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 21, p. 119-124, 1990.

SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Current Science**, v. 86, p. 407-421, 2004.

SAIRAM, R.K.; DESHMUKH, P.S.; SAXENA, D.C. Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. **Biologia Plantarum**, v.41, p.387-394, 1998

SAKHANOKHO, H.F., KELLEY, R.Y. Influence of salicylic acid on *in vitro* propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv 'Luna Red') African **Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 1474-1481, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, vol. I. 2 edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMREEN, U.; HUSSAIN, F.; SHER, Z. Allelopathic potential of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. **Pak J Pl Sci**, v. 15, p.7-14, 2009.

SANGRAULA, H.; DEWANS, S.; KUMAR, V.L. Evaluation of Antiinflammatory activity of the latex of *Calotropis procera* in different models of inflammation. **Inflammopharmacol**, v. 9, p. 257-264, 2002.

SARAIVA, K.D.A. Caracterização, análise filogenética e perfil de expressão da família multigênica do fator de alongação 1 alfa (EF1 α) DE SOJA [*Glycine max* (L.) MERR.]: detecção de genes normalizadores para qPCR . 2013. 127p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Departamento de bioquímica e biologia molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

SCANDALIOS, J. G. The rise of ROS. **Trends in Biochemical Science**, v.27, p.483-486, 2002.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 333-341, 2002.

SHARMA, G.K. *Calotropis procera* and *Calotropis gigantea*. **Indian Journal Veterinary Science and Animal Husbandry**, v. 4, p. 63-74, 1934.

SHARMA, P.; DEVI, J.; SHARMA, J. In vitro hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal Ethnopharmacology**, v.74, p 239-243, 2001.

SHARMA, V.; RAMAWAT, K.G. Salt stress enhanced antioxidant response in callus of three halophytes (*Salsola baryosma*, *Trianthema triquetra*, *Zygophyllum simplex*) of Thar Desert. **Biologia**, v. 62, p. 178- 185, 2014

SHI, H.; QUINTERO, F. J.; PARDO, J. M.; ZHU, J. K. The Putative Plasma Membrane Na⁺/H⁺ Antiporter SOS1 Controls Long- Distance Na⁺ Transport in Plants. **The Plant Cell**, v.14, p.465-477, 2002.

SHI, H; ZHU, J. -K. Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. **Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 543-550, 2002.

SHUBHADA NIKHARGE. FLICKR. Disponível em:<
<http://flickrhivemind.net/Tags/rubbervine/Interesting>> Acesso em: 17/12/2014.

SILVEIRA, J.A.G. ; FERREIRA-SILVA, S.L. ; SILVA, E.N. ; VIÉGAS, R.A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia em Salinidade. (Org.). Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados. 1a.ed.Campina Grande: INCTSal, p. 161-180, 2010.

SINGH, M.; JAISWAL, U.; JAISWAL, V.S. In vitro selection of NaCl-tolerant callus line and regeneration of plantlets in a bamboo (*Dendrocalamus strictus* Nees.). **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**, v. 39, p. 229–233, 2003.

SINGH, N. K.; BRACKER, C. A.; HASEGAWA, P. M.; HANDA, A. K.; BUCKEL, S.; HERMODSON, M. A. Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. **Plant Physiology**, v.85, p.529-36, 1987.

SKERRETT, M.; TYERMANN, S. D. A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. **Planta**, v.192, p.295-305, 1994.

SKOOG F, MILLER CO.; Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symp Soc Exp Biol**, v.11, p.118–131, 1957.

SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.214-219, 1998.

SOUZA, D. P. ; Freitas, Cleverson D.T. ; Pereira, Danielle A. ; Nogueira, F.C. ; Salas, C.E. ; RAMOS, M. V. . Laticifer proteins play a defensive role against hemibiotrophic and necrotrophic phytophagous. **Planta**, v.1, p.1-11, 2011.

SOUZA, D.P. Caracterização molecular e correlações estruturais com adiponectina humana de uma proteína purificada do látex de *Cryptostegia grandiflora*. 2014. 127p. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Departamento de bioquímica e biologia molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

STINTIZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v.75, p.687-706, 1993.

SUBROTO T.; VRIES, H.; SCHURINGA, J. J.; SOEDJANAATMADJA, U. M. S.; HOFSTEENGED, J.; JEKEL, P. A.; BEINTEMA, J. J. Enzymatic and structural studies on processed proteins from the vacuolar (luteoid-body) fraction of latex of *Hevea brasiliensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p.1047-1055, 2001.

SURI, S.S., RAMAWAT, K.G.; In vitro hormone regulation of laticifer differentiation in *Calotropis procera*. **Annals of Botany**, v.75, p. 477- 480, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4a ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAL, M. In vitro selection for salt tolerance in crop plants: Theoretical and practical considerations. **In Vitro Cell Dev. Biol. Plant**, v. 30, p. 175–180,1994.

TEAKLE, N. L.; TYERMAN, S. D. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 566-589, 2010.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Annals of Botany**, v. 91, p. 503-527, 2003.

TEXEIRA, F.M.; RAMOS,M.V.; SOARES,A.A.; OLIVEIRA, R.S.B.; FILHO, L.C.P.A.; CARVALHO, C.P.S. *In vitro* tissue culture of the medicinal shrub *Calotropis procera* to produce pharmacologically active proteins from plant látex. **Process biochemistry**, p. 1118-1124, 2011.

TOWBIN, H.; STAEBENLIN, T.; GORDON, J. Eletrophorese transfer of proteins from polyacrilamide gel to nitrocellulose sheet: produces and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA (PNAS)**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRINDADE, A.R.; LACERDA, C.F.; GOMES FILHO, E.; PRISCO, J.T.; BEZERRA, M.A.; Influência do acúmulo e distribuição de íons sobre a aclimação de plantas de sorgo e feijão-de-corda, ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, p.804-810, 2006.

TURKAN, I. ; DEMIRAL, T. Recent developments in understanding salinity tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 2-9, 2009.

TYERMANN, S. D.; SKERRETT, I. M. Root ion channels and salinity. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 175-235, 1999.

URAO, T.; YAKUBOV, B.; SATOH, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. A transmembrane hybrid-type histine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. **The Plant Cell**, v. 11, p. 1743-1754, 1999.

URBANEK,H; HUZNIAK-GEBAROWSKA; HERKA,K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologica Plantarum**, v.13,p. 43-50, 1991.

VAN LOON L. C., VAN STRIEN E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85 – 97, 1999.

VAN LOON L.C.; PIETERSE, C.M.J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annu. Rev. Phytopathol**, v. 44, p.135–62, 2006.

VIANA, C.A. Caracterização bioquímica da atividade pró-coagulante de proteases de fluidos laticíferos. 2011. 120p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Departamento de bioquímica e biologia molecular. Universidade federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2011.

VIANA, C. A.; OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, C. D. T.; ALENCAR, N. M. N. ; CARVALHO, C. P. S.; NISHI, B. C. ; RAMOS, M. V. Thrombin and plasmin-like activities in the latices of *Cryptostegia grandiflora* and *Plumeria rubra*. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v. 24, p. 13-22, 2013.

VIKTOROVA, J.; KRASNY, L.; KAMLAR, M.; NOVAKOVA, M.; MACKOVA, M.; MACEK, M. Osmotin, a Pathogenesis-Related Protein. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, p. 672-681, 2012.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 123-132, 2005.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia biosfera**, v.6, p. 1-23, 2010

XAVIER-FILHO J.; CAMPOS, F.A.P.; ARY, M.B.; SILVA, C.P.; CARVALHO, M.M.M.; MACEDO, M.L.M.; LEMOS, F.J.A.; Grant, G. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*, **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v. 37, p. 1139-1143, 1989.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, p. 131-139, 2002.

YAMAGUCHI, T.; BLUMWALD, E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 615-620, 2005.

YANG, Y.L.; SHI, R.X.; WEI, X.L.; FAN, Q.; AN; L.Z. Effect of salinity on antioxidant enzymes in calli of the halophyte *Nitraria tangutorum* Bobr. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 102, p. 387–395, 2010.

YEO, A. R.; FLOWERS, S. A.; RAO, G.; WELFARE, K.; SENANAYAKE, N.; FLOWERS, T. J. Silicon reduces sodium uptake in rice (*Oriza sativa* L.) in saline conditions and this is accounted for by a reduction in the transpirational by pass flow. **Plant Cell and Environment**, v. 22, p. 559-565, 1999.

YOKOI, S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. The Japan International Centre for Agricultural Sciences (JIRCAS) Working Report. In: IWANAGA, M. Genetic engineering of

crop plants for abiotic stress. Salt stress tolerance of plants. **Japan International Centre for Agricultural Sciences**, p. 25- 33, 2002.

ZHANG, Y.; WANG, L.; LIU, Y.; ZHANG, G.; WEI, Q.; ZHANG, W. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. **Planta**, v. 224, p. 545-555, 2006.

ZHAO, X.; TAN, H.J.; LIU, Y.B., LI, X.R., CHEN, G.X. Effect of salt stress on growth and osmotic regulation in *Thellungiella* and *Arabidopsis* callus. **Plant Cell Tiss.**, v. 98, p. 97-103, 2009.

ZHAO, X.X.; HUANG, L.K.; ZHANG, X.Q.; LI, Z.; PENG, Y. Effects of Heat Acclimation on Photosynthesis, Antioxidant Enzyme Activities, and Gene Expression in Orchardgrass under Heat Stress. **Molecules**, v. 19, p. 13564-13576, 2014.

ZHU, B.; CHEN, T. H. H.; LI, P. H. Expression of three osmotin-like protein genes in response to osmotic stress and fungal infection in potato. **Plant Molecular Biology**, v. 28, p. 17-26, 1995.

ZHU, J. K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 441-445, 2003.

ZOU, J.; LIU, A.; CHEN, X.; ZHOU, X; GAO, G.; WANG, W; ZHANG, X. Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 851- 861, 2009.