

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**MECANISMOS DE PROTEÇÃO OXIDATIVA CONTRA ESTRESSES
ISOLADOS E COMBINADOS DE SECA, SALINIDADE E
TEMPERATURA ELEVADA EM CAJUEIRO**

SÉRGIO LUIZ FERREIRA DA SILVA

**FORTALEZA
2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**MECANISMOS DE PROTEÇÃO OXIDATIVA CONTRA ESTRESSES
ISOLADOS E COMBINADOS DE SECA, SALINIDADE E
TEMPERATURA ELEVADA EM CAJUEIRO**

SÉRGIO LUIZ FERREIRA DA SILVA

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

**FORTALEZA - CEARÁ
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

S583m Silva, Sérgio Luiz Ferreira da.

Mecanismos de proteção oxidativa contra estresses isolados e combinados de seca, salinidade e temperatura elevada em cajueiro / Sérgio Luiz Ferreira da Silva. – 2008.
174 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica , Fortaleza, 2008.

Orientação: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira.

1. Caju. 2. Proteção oxidativa. I. Título.

CDD 572

Tese de Doutorado apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, área de concentração Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra a disposição dos interessados na Biblioteca desta Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que feita de acordo com as normas da ética científica.

Tese aprovada em ____ / ____ / ____

Sérgio Luiz Ferreira da Silva

Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, Dr.
UFC/DBBM - Orientador

José Tadeu Abreu de Oliveira, PhD
UFC/DBBM - Conselheiro

Enéas Gomes Filho, Dr.
UFC/DBBM – Conselheiro

Rafael Vasconcelos Ribeiro, Dr.
Instituto Agronômico de Campinas - Conselheiro

Ricardo Almeida Viégas, Dr.
UFCG/DEF - Conselheiro

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por iluminar os meus caminhos e me fortalecer diante de todas as decisões as quais tenho que tomar ao longo da minha vida;

Ao Prof. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, pela orientação dessa Tese e inestimável contribuição para minha formação profissional;

Ao Prof. José Tadeu Abreu de Oliveira, pela sua participação na banca de avaliação e valiosas sugestões para a melhoria da qualidade desse trabalho;

Ao Prof. Ricardo Almeida Viégas, pela sua participação na banca de avaliação e valiosas sugestões para a melhoria da qualidade desse trabalho;

Ao Prof. Enéas Gomes Filho, pela sua participação na banca de avaliação e valiosas sugestões para a melhoria da qualidade desse trabalho;

Ao Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro, pela sua participação na banca de avaliação e valiosas sugestões para a melhoria da qualidade desse trabalho;

A Prof. Cristiane Elizabeth Costa de Macêdo, pela sua valiosa contribuição na elaboração desse trabalho;

Ao Adilton, pelo auxílio nos trabalhos realizados na bancada;

Aos colegas do LABPLANT, Abel, Marcelo, Iza, Tânia, Jean, Sandro, Lucilene, Luiz Aguiar, João Paulo, Josemir, Eduardo, Batista e Christine, pela convivência saudável e espírito de companheirismo;

A minha namorada Lucília, pelo seu amor, dedicação, atenção e incentivo nas horas mais difíceis durante o meu curso de Doutorado;

Aos professores do departamento de Bioquímica da UFC, pelos exemplos de profissionalismo e contribuição para a minha formação profissional;

A todos os funcionários do departamento de Bioquímica, pela atenção e dedicação em atender da melhor forma possível as necessidades dos estudantes;

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio financeiro das seguintes instituições:

- Universidade Federal do Ceará - UFC
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
- Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa – FUNCAP
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Sumário

Lista de tabelas.....	viii
Lista de figuras.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. Introdução e revisão de literatura.....	1
1.1. Estresses abióticos múltiplos.....	4
1.1.1. Aspectos fisiológicos.....	4
1.1.2. Aspectos moleculares.....	7
1.2. Antioxidantes enzimáticos.....	10
1.2.1. Dismutases de superóxidos (SODs).....	10
1.2.2. Peroxidases de ascorbato (APXs).....	13
1.2.3. Catalases (CATs).....	15
1.3. Antioxidantes não enzimáticos.....	17
1.3.1. Ácido ascórbico.....	17
1.3.2. Glutathiona.....	19
2. Justificativa.....	23
3. Bibliografia.....	24
4. Objetivos.....	32
4.1. Objetivo geral.....	32
4.1.1. Objetivos específicos.....	32
5. Estratégia experimental.....	33
CAPÍTULO – I.....	34
<i>PROTEÇÃO OXIDATIVA EM FOLHAS DE PLÂNTULAS DE CAJUEIRO</i>	34
<i>SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO.....</i>	34
Introdução.....	35
Material e métodos.....	37
Resultados.....	44
Discussão.....	53
Bibliografia.....	58
CAPÍTULO – II.....	62
<i>PROTEÇÃO OXIDATIVA EM FOLHAS DE PLÂNTULAS DE CAJUEIRO SUBMETIDAS</i>	62
<i>A SECA.....</i>	62
Introdução.....	63
Material e métodos.....	65
Resultados.....	70
Discussão.....	78
Bibliografia.....	83
CAPÍTULO – III.....	87
<i>RESPOSTA OXIDATIVA EM FOLHAS DE PLÂNTULAS DE CAJUEIRO SUBMETIDAS</i>	87
<i>A TEMPERATURAS ELEVADAS.....</i>	87
Introdução.....	88
Material e métodos.....	90
Resultados.....	95
Discussão.....	104
Bibliografia.....	108
CAPÍTULO – IV.....	112
<i>RESPOSTA OXIDATIVA EM FOLHAS DE PLÂNTULAS DE CAJUEIRO AOS</i>	112
<i>ESTRESSES COMBINADOS DE SALINIDADE E DE TEMPERATURA</i>	112
<i>ELEVADA.....</i>	112
Introdução.....	113
Material e métodos.....	115
Resultados.....	120
Discussão.....	128

Bibliografia.....	133
CAPÍTULO – V.....	137
RESPOSTA OXIDATIVA EM FOLHAS DE PLÂNTULAS DE CAJUEIRO AOS ESTRESSES COMBINADOS DE SECA E DE TEMPERATURA ELEVADA.....	137
Introdução.....	138
Material e métodos.....	140
Resultados.....	145
Discussão.....	153
Bibliografia.....	158
6. Síntese e Considerações Finais.....	161

Lista de tabelas

Tabela 1 Conteúdos de ascorbato total (ASA+DHA), reduzido (ASA), oxidado (DHA) e balanço do estado redox do ascorbato (ASA/DHA) em plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (Controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl, durante 15 dias.

Tabela 2 Conteúdos da glutaciona total (GSH+GSSG), reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e balanço do estado redox da glutaciona (GSH/GSSG) em plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (Controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl, durante 15 dias.

Tabela 3 Conteúdos de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e TABRS, e dano de membrana em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) ou submetidas ao estresse hídrico durante 10, 15 e 20 dias.

Tabela 4 Conteúdo ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) do ascorbato total (ASA+DHA), reduzido (ASA) e oxidado (DHA), e balanço redox (ASA/DHA) do ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) e submetidas a 10, 15 e 20 dias de estresse hídrico.

Tabela 5 Conteúdo ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) da glutaciona total (GSH+GSSG), reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e balanço redox (GSH/GSSG) da glutaciona em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) e submetidas a 10, 15 e 20 dias de estresse hídrico.

Tabela 6 Conteúdos do ascorbato total (ASA+DHA), reduzido (ASA), oxidado (DHA) e balanço redox do ascorbato (ASA/DHA) em folhas de plântulas de cajueiro expostas a temperaturas crescentes, durante 12 horas.

Tabela 7 Conteúdos da glutaciona total (GSH+GSSG), reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e balanço redox da glutaciona (GSH/GSSG) em folhas de plântulas de cajueiro expostas a temperatura crescente, durante 12 horas.

Tabela 8 Conteúdos de ascorbato total (ASA+DHA), reduzido (ASA), oxidado (DHA) e balanço do estado redox do ascorbato (ASA/DHA) em plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e temperatura elevada.

Tabela 9 Conteúdos de glutaciona total (GSH+GSSG), reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e balanço do estado redox da glutaciona (GSH/GSSG) em plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e temperatura elevada.

Tabela 10 Conteúdos de ascorbato total (ASA+DHA), reduzido (ASA), oxidado (DHA) e balanço redox (ASA/DHA) em plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de alta temperatura.

Tabela 11 Conteúdos de glutaciona total (GSH+GSSG), reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e balanço redox (GSH/GSSG) em folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e alta temperatura.

Lista de figuras

Figura 1 Diagramas mostrando o número de transcritos que apresentaram aumento (A) ou redução (B) da expressão em plantas de *Arabidopsis* submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e calor. São considerados apenas os transcritos que aumentaram ou diminuíram 1,5 vezes, ou mais, comparado às plantas não estressadas. (Adaptado de Rizhsky et al., 2004).

Figura 2 Componentes do sistema redox do ascorbato na celular vegetal. Ácido ascórbico (ASA); Ácido dehidroascórbico (DHA); Ácido monodehidroascórbico (MDHA). (Adaptado de Noctor e Foyer, 1998)

Figura 3 Ciclo do ascorbato-glutationa na célula vegetal. APX – Peroxidases de ascorbato; MDHA – Redutase de monodehidroascorbato; DHAR – Redutase de dehidroascorbato; GR – Redutase de glutaciona. (Adaptado de Foyer e Noctor, 2000).

Figura 4 (A) Transpiração, (B) resistência estomática, (C) conteúdo relativo de água e (D) correlação da massa seca de folhas com a resistência estomática em plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl (50, 100, 150 e 200 mM), durante 15 dias. Os valores são médias de três repetições obtidas de dois experimentos independentes.

Figura 5 (A) Conteúdos de sódio, (B) cloreto, (C) TBARS e (D) peróxido de hidrogênio em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl (50, 100, 150 e 200 mM), durante 15 dias. Os valores são médias de três repetições, obtidas de dois experimentos independentes.

Figura 6 (A) Conteúdo de proteína solúvel e atividade das enzimas oxidativas (B) dismutases de superóxido, (C) catalases e (D) peroxidases de ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl (50, 100, 150 e 200 mM), durante 15 dias. Os valores são médias de três repetições obtidas de dois experimentos independentes.

Figura 7 (A) SDS-PAGE, zimograma para (B) SODs e (C) CATs e (D) Imunoblot para CATs de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl (50, 100, 150 e 200 mM), durante 15 dias. O zimograma da (B) SOD mostra as diferentes isoformas dessa enzima após inibição específica com H₂O₂ ou KCN. Em todas as eletroforeses foram aplicados 20 µl de extrato protéico em cada poço, ±40 µg de proteína, exceto para o zimograma da SOD que foram aplicados 10 µl (±20 µg de proteína).

Figura 8 (A) Transpiração, (B) resistência estomática, (C) correlação entre transpiração e umidade do substrato e (D) conteúdo relativo de água de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) ou submetidas ao estresse hídrico durante 20 dias. Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas entre os tempos e minúsculas dentro de cada tempo, não diferem a 0,05 de probabilidade.

Figura 9 (A) Conteúdo de proteína solúvel e atividade das enzimas (B) dismutase de superóxido, (C) catalase e (D) peroxidase de ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) ou submetidas ao estresse hídrico durante 20 dias. Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas entre os tempos e minúsculas dentro de cada tempo, não diferem a 0,05 de probabilidade.

Figura 10 (A) SDS-PAGE e zimograma para (B) dismutases do superóxido e (C) catalases de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) ou submetidas ao estresse hídrico durante 20 dias. Os poços C1, C2, C3 e S1, S2 e S3, representam os tratamento controle e estresses aos 10, 15 e 20 dias, respectivamente. Em todas as eletroforeses foram aplicados 20µl de extrato protéico em cada poço, ± 40 µg de proteína, exceto para o zimograma da SOD que foi aplicado apenas 10µl, ± 20 µg de proteína.

Figura 11 Aspecto visual das plântulas de cajueiro submetidas às temperaturas de 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C, durante 12 horas. O detalhe demonstra a perda de turgor das folhas e do segmento apical do caule ocorrido a partir das 9 horas de exposição das plântulas ao tratamento de 50 °C.

Figura 12 (A) Transpiração, (B) resistência estomática, (C) conteúdo relativo de água e (D) dano de membrana em plântulas de cajueiro submetidas a temperaturas crescentes, 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C, durante 12 horas. Os dados são médias de três repetições independentes.

Figura 13 (A) Conteúdo e (B) coramento histoquímico *in situ* do H₂O₂, e (C) conteúdo de TBARS em folhas de plântulas de cajueiro submetidas as temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C, durante 12 horas. Os dados são médias de três repetições independentes.

Figura 14 (A) Conteúdo de proteína solúvel e atividades das enzimas (B) dismutase de superóxido, (C) catalase e (D) peroxidase de ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro submetidas a temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C, durante 12 horas. Os dados são médias de três repetições independentes.

Figura 15 (A) SDS-PAGE e zimograma para (B) dismutases de superóxido e (C) catalases em folhas de plântulas de cajueiro submetidas as temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C, durante 12 horas. Em todas as eletroforeses foram aplicados 20µl de extrato protéico em cada poço, ±40 µg de proteína, exceto para o zimograma da SOD que foram aplicados 10 µl, ±20 µg de proteína.

Figura 16 (A) Transpiração, (B) conteúdo relativo de água, (C) dano de membrana e (D) conteúdo de sódio em folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada. (Controle); (NaCl – 12 dias a 100 mM); (45 °C – 12 h em 45 °C); (NaCl+45 °C – 12 dias a 100 mM + 12 h em 45 °C).

Figura 17 (A) Conteúdo de peróxidos de hidrogênio e (B) TBARS em folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de alta temperatura. (Controle); (NaCl – 12 dias a 100 mM); (45 °C – 12 h em 45 °C); (NaCl+45 °C – 12 dias a 100 mM + 12 h em 45 °C).

Figura 18 (A) Conteúdo de proteína solúvel e atividade das enzimas (B) dismutase do superóxido, (C) catalases e (D) peroxidase do ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada. (Controle); (NaCl – 12 dias a 100 mM); (45 °C – 12 h em 45 °C); (NaCl+45 °C – 12 dias a 100 mM + 12 h em 45 °C).

Figura 19 (A) SDS-PAGE e zimograma para (B) SOD e (C) CAT de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura alta. (Controle); (NaCl – 12 dias a 100 mM); (45 °C – 12 h em 45 °C); (NaCl+45 °C – 12 dias a 100 mM + 12 h em 45 °C). Para o SDS-PAGE e o zimograma da CAT foram aplicados 20 µl de extrato protéico por poço e para o zimograma da SOD 10 µl.

Figura 20 (A) Transpiração, (B) resistência estomática, (C) dano de membrana e (D) conteúdo relativo de água em plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de alta temperatura. (Controle); (Seca = suspensão da rega por 20 dias); (45 °C = 12 h em 45 °C); (Seca+ 45 °C = suspensão da rega por 12 dias + 12 h em 45 °C).

Figura 21 (A) Conteúdos de peróxido de hidrogênio e (B) TBARS em folhas de plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de alta temperatura. (Controle); (Seca = suspensão da rega por 20 dias); (45 °C = 12 h em 45 °C); (Seca+45 °C = suspensão da rega por 12 dias + 12 h em 45 °C).

Figura 22 (A) Conteúdo de proteína solúvel e atividade das enzimas (B) dismutase de superóxido (C) catalase e (D) peroxidase de ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e alta temperatura. (Controle); (Seca = suspensão da rega por 20 dias); (45 °C = 12 h em 45 °C); (Seca+45 °C = suspensão da rega por 12 dias + 12 h em 45 °C).

Figura 23 (A) SDS-PAGE e zimograma para (B) dismutase de superóxido e (C) catalase de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de alta temperatura. M – marcador de peso molecular; (Controle); (Seca = suspensão da rega por 20 dias); (45°C = 12 h em 45°C); (Seca+45°C = suspensão da rega por 12 dias + 12 h em 45°C). Em todas as eletroforeses foram aplicados 20µl de extrato protéico em cada poço, ± 40 µg de proteína.

MECANISMOS DE PROTEÇÃO OXIDATIVA CONTRA ESTRESSES ISOLADOS E COMBINADOS DE SECA, SALINIDADE E TEMPERATURA ELEVADA EM CAJUEIRO

Autor: Sérgio Luiz Ferreira da Silva

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

RESUMO

No presente estudo foram caracterizados diferentes mecanismos de proteção oxidativa do cajueiro, espécie adaptada ao semi-árido, frente aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino, hídrico e temperatura elevada. Para tanto, foram realizados estudos para avaliar as alterações oxidativas induzidas pelos estresses salino, hídrico, temperatura elevada e pelas combinações dos estresses salino e hídrico com temperaturas elevadas na espécie. Os resultados demonstram que o cajueiro apresenta alta capacidade de proteção oxidativa frente os estresses salino e hídrico. Essa proteção está associada à restrição estomática, manutenção do *status* hídrico e eficiente interação dos sistemas antioxidantes enzimático e não enzimáticos, impedindo o acúmulo de H₂O₂ e a peroxidação de lipídios. Durante o estresse salino, as enzimas SOD, CAT e os antioxidantes ASA e GSH foram os principais responsáveis pela proteção oxidativa, enquanto sob condições de seca ocorreu predominância das enzimas SOD e APX, associadas aos sistemas ASA e GSH. Temperaturas acima de 35 °C induzem estresse oxidativo na espécie, atribuído ao acúmulo de H₂O₂ e a peroxidação de lipídios, provavelmente associada à indução de fotorrespiração. O estresse térmico apresentou intensa modulação dos sistemas de proteção oxidativa enzimático (SOD-CAT-APX) e não enzimático (ASA e GSH), indicando o papel desses antioxidantes na proteção oxidativa durante temperaturas elevadas. As plântulas submetidas à combinação de salinidade e temperatura elevada apresentaram maior restrição estomática, comparadas àquelas expostas a combinação de seca e temperatura alta. Esse resultado indica que o estresse salino pode levar a maior limitação da dissipação de calor, via fluxo transpiratório, que o estresse hídrico, durante exposição de plantas a temperaturas elevadas. A salinidade limitou a atividade da APX nas plântulas submetidas ao estresse térmico, sugerindo que o estresse salino pode afetar o papel da APX na proteção oxidativa durante temperaturas elevadas. Durante a exposição das plântulas a temperaturas elevadas o estresse hídrico limitou mais a atividade dos sistemas antioxidantes SOD-CAT-APX e ASA e GSH, comparado ao estresse salino. Essa restrição ocorreu associada ao maior nível de injúrias oxidativas nas plântulas expostas a combinação de seca e calor. Os resultados demonstram que temperaturas elevadas é o principal estresse abiótico que causa dano oxidativo na espécie e que a combinação dos estresses hídrico e temperatura elevada está mais associada a dano oxidativo do que a combinação de salinidade e temperatura alta. No geral, os resultados mostram que as alterações oxidativas atribuídas à combinação de seca e calor ou salinidade e calor, são distintas daquelas associadas aos estresses isolados. Indicam ainda, que as mudanças induzidas pela combinação de seca e calor ou salinidade e calor não podem ser estimadas com base nos efeitos isolados dos respectivos estresses.

Palavras-Chave: Estresses abióticos, Proteção oxidativa, Cajueiro.

OXIDATIVE PROTECTION MECHANISMS AGAINST ESPECIFIC AND COMBINATED DROUGHT, SALINITY AND HEAT STRESSES IN CASHEW

Author: Sérgio Luiz Ferreira da Silva

Adviser: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

ABSTRACT

In the present study, different biochemical and physiological mechanisms associated with oxidative protection were characterized in a semi-arid adapted species (cashew) submitted to drought, salinity and heat applied individually or in combination. The results demonstrate that cashew show high antioxidant capacity against the isolated effects of drought and salinity. This antioxidant protection is associated with the maintenance of the water status and the efficient interaction of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems, avoiding H_2O_2 accumulation and lipid peroxidation. The activity of SOD and CAT, as the ASA and GSH antioxidants play a central role in oxidative protection in salt-treated plants, while the activity of SOD and APX associated with ASA and GSH are essential in plants exposed to drought. Oxidative stress is induced in cashew plants submitted to temperatures above $35\text{ }^\circ\text{C}$, as indicated by H_2O_2 accumulation and lipid peroxidation, which may be due to enhanced photorespiration. The antioxidant enzymatic (SOD-CAT-APX) and nonenzymatic (ASA e GSH) systems are intensively modulated by heat stress. Salt-pretreated plants show higher stomatic restriction under heat stress than those previously exposed to drought. This results evidence that salt stress limits heat dissipation through transpiration more than drought when plants are exposed to high temperatures. APX activity is reduced in salt-pretreated plants under heat stress in comparison with drought-pretreated plants, suggesting that salinity could prominently affect the antioxidant role of this enzyme. Conversely, the antioxidant systems are dramatically restricted in drought-pretreated plants in relation to those initially exposed to salinity when these plants are subjected to high temperatures. This restriction may be associated with high oxidative injuries in plants exposed to drought followed by heat stress. According to the results of this work, high temperatures applied individually or in combination with drought enable oxidative stress more than salt stress associated with heat. In general, oxidative changes induced by drought and heat or salinity and heat are distinct from those triggered by these factors applied individually, as the metabolic alterations caused by combined stresses could not be estimated from the specific responses to drought, salinity or heat.

Keywords: Abiotic stresses, oxidative protection, cashew.

1. Introdução e revisão de literatura

O conhecimento das interações moleculares, bioquímicas e fisiológicas, responsáveis pela rápida aclimação das culturas as flutuações ambientais, é essencial para a adoção de estratégias competitivas de manejo da produção agrícola. Esse interesse se torna ainda mais relevante, quando o cultivo é realizado em áreas marcadas pela presença de múltiplos fatores adversos a produtividade agrícola. No semi-árido do Nordeste brasileiro predominam componentes ambientais extremamente adversos ao desempenho das culturas, como déficit hídrico, excesso de sais no solo e na água, e altas temperaturas e luminosidade. Esses fatores estão presentes de forma isolada e/ou combinada, em intensidades variadas, podendo resultar em uma multiplicidade de estresses, onde determinado fator abiótico pode potencializar o efeito dos demais (Munns, 2002; Mittler, 2006).

Comprometendo ainda mais este panorama, estão os estudos e a recente preocupação da comunidade científica acerca do aquecimento global (Salvucci e Crafts-Brandner, 2004). Le Houérou, em um estudo de 1996, afirmou que, devido à duplicação do conteúdo de CO₂ na nossa atmosfera, haverá um possível aumento de 1 a 3 °C na temperatura das regiões áridas e semi-áridas nos próximos 50 anos. Dados do Painel Intergovernamental de Mudança Climática indicam acréscimos de 0,3 °C da temperatura por década, resultando em aumentos de 1 a 3 °C para os anos de 2025 e 2100, respectivamente (Jones et al., 1999). Além disso, haverá também um significativo aumento na evapo-transpiração e decréscimo na precipitação média anual entre 4 e 5%. A partir deste aquecimento, estão sendo previstos riscos de grandes ciclos de seca intercalados por grandes enchentes, principalmente na região Intertropical (FAO, 2007), onde está situado o Nordeste brasileiro.

Estresses ambientais tais como baixas e altas temperaturas, excesso de luz, seca e salinidade são responsáveis por perdas de produtividade das culturas agrícolas no mundo todo (Xiong e Zhu, 2002). Tais condições podem influenciar negativamente a sobrevivência, a produção e acumulação de biomassa e a produção de grãos, resultando em perdas significativas de rendimento da maioria das culturas economicamente importantes (Grover et al., 2001). Os diferentes ecossistemas mundiais são afetados por diferentes fatores de estresse abióticos específicos, e em diferentes amplitudes. Tais problemas ambientais, aliados as

técnicas ultrapassadas e inconscientes de cultivo, comumente praticadas, causam enormes prejuízos econômicos e sociais, que vão desde a perda de investimentos no setor agrícola até ao aumento do desemprego, da pobreza e do êxodo rural.

Associado aos efeitos primários, induzidos por estresses ambientais sobre o metabolismo vegetal, com reflexos diretos na produtividade, ocorrem danos secundários como geração excessiva de espécies reativas de oxigênio. O acúmulo excessivo dessas espécies reativas de oxigênio (EROs) como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$), no ambiente celular, é amplamente relatado como um dos principais distúrbios metabólicos responsáveis por danos significativos nas plantas, sob condições ambientais adversas (Mittler, 2002). As EROs são moléculas extremamente reativas e podem causar danos metabólicos irreversíveis, pela oxidação de ácidos nucleicos, desnaturação de proteínas e peroxidação de lipídios, podendo resultar em perda de viabilidade celular, comprometendo de forma drástica o desempenho e a produtividade vegetal (Neill et al., 2002).

As EROs estão presentes na célula vegetal como subprodutos normais do metabolismo aeróbico e de processos fotooxidativos (Noctor e Foyer, 1998). Entretanto, sob condições adversas, como estresse hídrico, salino e temperaturas elevadas, sua produção pode ser significativamente aumentada (Vaidyanathan et al., 2003; Guo et al., 2006). A proteção oxidativa na célula vegetal é realizada por um complexo sistema de defesa, o qual envolve mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. O sistema não enzimático é constituído principalmente por componentes hidrofílicos, como o ácido ascórbico (ASA) e a glutathiona (GSH), enquanto que a proteção enzimática é composta por um complexo sistema de enzimas, presentes em várias organelas e atuando de forma coordenada na proteção oxidativa. As principais enzimas oxidativas são as dismutases do superóxido (SOD), catalases (CAT), peroxidases de ascorbato (APX), redutases da glutathiona (GR), redutases do monodehidroascorbato (MDHAR) e redutases do dehidroascorbato (DHAR) (Foyer e Noctor, 2003).

A SOD é essencial na eliminação do $O_2^{\cdot-}$ produzido principalmente durante o processo fotooxidativo, nos cloroplastos, e sua ação resulta na formação de H_2O_2 e O_2 . O peróxido de hidrogênio é rapidamente eliminado pelas catalases e diversas classes de peroxidases localizadas em diferentes compartimentos celulares (Shigeoka et al., 2002). As peroxidases do ascorbato, presentes no cloroplasto e

citosol, são exemplos de peroxidases que auxiliam na remoção do excesso de H₂O₂ celular, utilizando o ascorbato reduzido como doador específico de elétrons (Asada, 1999). O ascorbato na reação da APX, durante a eliminação do peróxido de hidrogênio, é convertido para a forma oxidada e rapidamente regenerado pelo ciclo metabólico do ascorbato-glutationa, onde as enzimas GR, MDHAR e DHAR atuam de forma sincronizada utilizando NADPH e GSH como poder redutor (Foyer e Noctor, 2005).

Diversos estudos relatam o aumento da geração de EROs, com concomitante indução do sistema de proteção oxidativa, enzimático e não enzimático, em diversas espécies de culturas agrícolas, quando submetidas a diferentes estresses abióticos. Vaidyanathan et al. (2003), trabalhando com dois cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) diferindo na resistência à salinidade, observaram que o cultivar resistente (Pokkali) apresentou menor peroxidação de lipídios, associada a maior atividade das enzimas oxidativas SOD, CAT e GR, comparado ao sensível (IR-28). Cultivares de milho (*Setaria itálica*), contrastantes na resistência a salinidade, apresentaram resultados similares, em que o resistente apresentou melhor integridade de membranas associado a maior expressão e atividade das enzimas SOD e APX, comparado ao sensível (Sreenivasulu et al., 2000). Em algodão (*Gossypium hirsutum*), foi demonstrado que a resistência ao estresse salino está associada a melhor performance fotossintética e a uma maior eficiência do sistema antioxidante SOD, GR e POD (Meloni et al., 2003).

O aumento significativo da indução do sistema enzimático SOD, CAT e APX observado em folhas de dois cultivares de *Citrus*, expostos ao estresse de alta temperatura por longo tempo (\pm 20 dias), foi correlacionado com a maior proteção oxidativa e à maior resistência diferenciada dos genótipos ao estresse térmico (Guo et al., 2006a). Quando cinco cultivares de trigo, apresentando resistência diferenciada ao estresse térmico, foram submetidos ao estresse de alta temperatura, foi observado que os genótipos mais resistentes apresentaram maior atividade do sistema enzimático de remoção de EROs, associado a menores índices de injúrias oxidativas, comparado aos sensíveis (Almeselmani et al., 2006).

A proteção contra os danos oxidativos induzidos pelo estresse hídrico em diferentes espécies vegetais também está relacionada com a indução dos sistemas de proteção enzimáticos e não enzimáticos. Em plantas de *Vigna unguiculata* submetidas ao estresse hídrico, foram verificados aumentos significativos na

atividade das enzimas SOD, CAT e APX, em tecidos de raízes, caules e folhas, demonstrando o possível papel dessas enzimas na proteção oxidativa dos diferentes tecidos e órgãos (Manivannan et al., 2007). Em arroz (*Oryza sativa* L), genótipos mais resistentes ao estresse hídrico apresentaram maior indução do sistema SOD, CAT e APX, associada ao menor acúmulo de radical superóxido, peróxido de hidrogênio e conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), comparado aos sensíveis, após exposição das plântulas a doses crescentes de polietilenoglicol (PEG-6000) (Sharma e Dubey, 2005; Guo et al., 2006b).

A literatura atual registra um grande e crescente número de estudos acerca dos impactos negativos de diferentes estresses abióticos sobre o desempenho vegetal. Esses estudos relatam geralmente, os efeitos isolados de um fator de estresse sobre diferentes aspectos metabólicos. No entanto, sob condições de campo, as plantas estão expostas a uma multiplicidade de estresses que atuam de forma simultânea, contribuindo para perdas significativas de rendimento das culturas. Estudos recentes evidenciam que respostas metabólicas, induzidas por estresses abióticos de forma isolada, não representam um somatório capaz de caracterizar um padrão de respostas comuns à multiplicidade desses estresses (Rizhsky et al., 2002; Rizhsky et al., 2004; Kotak et al., 2007). As alterações metabólicas induzidas pela exposição simultânea a estresses como seca e calor, por exemplo, são únicas, e não podem ser obtidas a partir dos efeitos isolados dos respectivos estresses (Mittler, 2006).

Portanto, estudos utilizando abordagens experimentais mais amplas, capazes de testar e avaliar os efeitos isolados e combinados de determinados fatores adversos, são indispensáveis para uma compreensão mais precisa e detalhada das interações ambientais que afetam negativamente o desempenho vegetal.

1.1. Estresses abióticos múltiplos

1.1.1. Aspectos fisiológicos

Estresses abióticos, como salinidade, seca e temperaturas extremas, são exemplos de diferentes fatores ambientais responsáveis por perdas significativas da produção agrícola, em diversas partes de mundo (Munns, 2002). Isoladamente, esses estresses afetam, severamente, importantes aspectos bioquímicos, fisiológicos e moleculares da maioria das espécies vegetais, particularmente das

culturas agrícolas, e por esta razão são intensamente estudados (Wahid et al., 2007; Cattivelli et al., 2008; Munns e Tester, 2008). No geral, os estudos utilizam abordagens experimentais que avaliam os efeitos isolados desses estresses no metabolismo vegetal, sem considerar os diferentes aspectos que envolvem as interações entre os próprios estresses e com o ambiente, nas respostas metabólicas (Mittler, 2006).

Apesar da grande contribuição desses trabalhos para a compreensão atual dos diferentes distúrbios metabólicos atribuídos aos estresses abióticos, esses estudos são, ainda, relativamente limitados e não explicam, completamente, os diferentes tipos de interações desses estresses sobre o metabolismo vegetal. No campo, as culturas e as demais espécies estão expostas a uma combinação variada de diversos fatores abióticos, os quais interagem fortemente, resultando numa combinação múltipla de fatores adversos que afetam a produtividade (Munns, 2002; Mittler, 2002). Recentes estudos têm mostrado que as respostas moleculares e metabólicas atribuídas aos efeitos combinados dos estresses de seca e de alta temperatura, por exemplo, são únicas, e não podem ser obtidas com base nas respostas associadas aos seus efeitos isolados (Rizhsky et al., 2004; Mittler, 2006).

O número de estudos que visa avaliar os efeitos combinados dos estresses abióticos sobre o metabolismo vegetal é relativamente menor que aqueles relacionados aos efeitos isolados dos fatores abióticos. Os poucos estudos existentes indicam que as combinações de estresses de seca e de alta temperatura são mais prejudiciais ao desempenho das culturas do milho, cevada e sorgo, comparado aos efeitos isolados desses estresses (Heyne e Brunson, 1940; Savin e Nicolas, 1996; Jiang e Huang, 2001). Machado e Paulsen (2001), em estudo realizado com plantas de sorgo e trigo, demonstraram que a combinação dos estresses de seca a calor afeta mais severamente o estado hídrico e o ajustamento osmótico das plantas, que esses estresses isoladamente.

A combinação dos estresses de seca, salino e de alta temperatura é um exemplo de condição ambiental que comumente ocorre nas áreas agrícolas do mundo todo, particularmente nas regiões áridas e semi-áridas. A combinação da seca com alta temperatura é um caso típico de interação ambiental onde um fator abiótico possui interação antagônica sobre o outro. Por exemplo, em plantas submetidas ao estresse de temperatura elevada ocorre aumento da condutância estomática, resposta que está associada à dissipação de calor e redução da

temperatura foliar (Rizhsky et al., 2002; Wahid et al., 2007). No entanto, sob condições de estresse hídrico, o aumento da condutância será limitado pela restrição de água do solo e nessas condições o efeito do estresse térmico no metabolismo celular será potencializado (Rizhsky et al., 2004).

Esse tipo de antagonismo pode ser similar ao que ocorre em plantas submetidas aos estresses de salinidade e/ou metais pesados, quando combinados com a exposição a temperaturas elevadas. Durante a combinação desses fatores, o aumento da condutância estomática resultará no incremento da taxa de absorção e do fluxo desses íons para a parte aérea das plantas, acarretando aumento da concentração iônica no tecido vegetal e conseqüentemente ocorrerá toxicidade iônica (Mittler, 2006). Outro exemplo de antagonismo entre estresses é a interação de baixa temperatura e/ou de seca com luminosidade alta. Nessas interações, a limitação da disponibilidade de CO₂ para o processo fotossintético, induzida por frio e seca, resulta no aumento da produção de EROs, pela desvio de elétrons da cadeia transportadora de elétrons (CTE) cloroplástica para a fotorredução do oxigênio molecular, causando estresse oxidativo (Mittler, 2002).

A caracterização dos distúrbios fisiológicos ocorridos em plantas de *Nicotiana tabacum*, submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de alta temperatura, revelou que os distúrbios induzidos pela combinação dos estresses possuem aspectos distintos daqueles atribuídos aos efeitos isolados dos respectivos estresses. O tratamento de alta temperatura estimulou a respiração, a condutância estomática e aumentou a temperatura foliar das plantas, enquanto que o estresse hídrico resultou na redução da respiração, da fotossíntese e da condutância estomática. Por outro lado, a combinação da seca com a temperatura elevada intensificou a respiração e a temperatura foliar, comparado ao estresse térmico isolado, e reduziu ainda mais a fotossíntese, comparado ao estresse de seca isoladamente (Rizhsky et al., 2002).

Estudo realizado com *Arabidopsis*, utilizando à mesma abordagem, revelou comportamento similar ao de *Nicotiana tabacum*. O aumento da temperatura induziu a respiração e a condutância estomática e a seca reduziu a fotossíntese e a condutância estomática das plantas, enquanto que a combinação dos dois estresses intensificou a respiração e a redução da fotossíntese, comparado ao estresse hídrico (Rizhsky et al., 2004). Os resultados obtidos com essas duas espécies, *Nicotiana* e *Arabidopsis*, demonstram um padrão comum de respostas aos efeitos isolados e

combinados de seca e calor, demonstrando que a combinação desses estresses está associada a fortes alterações da fotossíntese e da respiração, afetando ainda a condutância estomática e temperatura foliar, alterações que não podem ser explicadas pelos efeitos isolados desses estresses.

Uma das respostas bem documentadas em plantas expostas a estresses abióticos é o intenso acúmulo de osmoprotetores de baixo peso molecular, como prolina, glicinabetaina e açúcares (Bray et al., 2000). Plantas de fumo transformadas, apresentando conteúdo de prolina entre 10 e 18 vezes maior, exibiram melhor resistência à salinidade (Kishor et al., 1995). Sob condições de seca moderada ocorre acúmulo de prolina e glicinabetaina, enquanto sob condições de seca severa ocorre acúmulo preferencial de sacarose (Hoekstra et al., 2001). Em plantas de fumo submetidas à seca foi observado acúmulo de prolina, enquanto naquelas expostas à combinação de seca e temperatura elevada ocorreu acúmulo de sacarose, indicando que a combinação desses estresses induz um tipo diferente de ajustamento celular, onde a sacarose passam a ser o principal osmoprotetor (Rizhsky et al., 2004).

1.1.2. Aspectos moleculares

Além do pouco entendimento dos aspectos fisiológicos relacionados aos mecanismos de aclimação a estresses abióticos múltiplos, pouco se conhece acerca das interações moleculares envolvidas na proteção celular sob condições de dois ou mais estresses distintos (Mittler, 2006). A limitação do atual estado do conhecimento deve-se ao fato da maioria dos estudos realizados enfocarem somente o entendimento das vias de percepção e transdução de sinal associadas a um estímulo em particular, não contemplando as diversas interações existentes para a modulação das respostas celulares aos diferentes estímulos (Kotak et al., 2007). Esse fato decorre, em parte, da falta de abordagens experimentais mais avançadas, capazes de avaliar vários estímulos simultaneamente.

Estudo realizado com plantas de *Arabidopsis*, expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e alta temperatura, revelou que o padrão de expressão gênica na combinação dos estresses não reflete diretamente seus efeitos isolados (Rizhsky et al., 2004). O estresse hídrico aumentou a expressão de 1075 transcritos, dos quais 596 foram aumentados exclusivamente pelo efeito da seca e 450 foram igualmente induzidos pela combinação dos estresses de seca e calor

(Figura 1). O estresse de calor induziu a expressão de 262 transcritos, dos quais 108 foram induzidos somente pelo calor e 124 foram igualmente induzidos pela combinação de seca e calor. Na plantas expostas à combinação dos estresses ocorreu o aumento da expressão de 1057 transcritos, dos quais 450 e 124 foram comuns aos efeitos da seca e calor, respectivamente (Figura 1).

Além da alteração do padrão de indução dos diferentes transcritos em resposta aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e alta temperatura, o padrão de repressão gênica também foi avaliado (Rizhsky et al., 2004). O estresse hídrico inibiu a expressão de 496 transcritos, dos quais 169 foram inibidos exclusivamente pela seca, enquanto que 279 foram igualmente inibidos pelo estresse hídrico e pela combinação dos estresses de seca e calor (Figura 1). O estresse de calor resultou na inibição de 279 transcritos, dos quais 100 exclusivamente atribuídos ao calor e 131 ocorreram em comum à combinação dos estresses. A combinação dos estresses resultou na inibição da expressão de 776 transcritos, sendo 318 exclusivamente pela combinação e 279 e 131 em comum com os estresses de seca e calor, respectivamente (Figura 1).

Dos diferentes transcritos que apresentaram expressão aumentada pelos estresses de seca, calor e combinação de seca e calor, 29 foram induzidos simultaneamente nas três situações, sugerindo uma via metabólica comum de resposta para essas diferentes condições ambientais (Bowler e Fluhr, 2000). A similaridade de respostas moleculares envolvidas com fenômenos de percepção e transdução de sinal, para diferentes estresses abióticos existentes na célula vegetal, podem explicar, em parte, o mecanismo de “tolerância cruzada” que ocorre entre estresses distintos (Seki et al., 2001; Chen et al., 2002). Esse mecanismo pode resultar em interações sinérgicas entre estresses, quando a pré-exposição da planta a um nível moderado de determinado fator abiótico, pode conferir resistência aumentada para um nível mais intenso do próprio estresse, ou para outro um estresse distinto (Bowler e Fluhr, 2000).

Em plantas, a produção de EROs é uma alteração metabólica comum induzida pelos estresses salino, hídrico e de alta temperatura, e a proteção oxidativa na célula vegetal ocorre por mecanismos antioxidantes aparentemente comuns para esses diferentes estresses (Mittler, 2002). No entanto, estudo realizado por Rizhsky et al. (2002), analisando o perfil de expressão gênica de enzimas oxidativas em resposta aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e calor, revelou

um panorama bastante intrigante. Sob condições de calor, predominou a expressão dos RNAm para as enzimas APX citosólica e peroxidases de tiorredoxinas. Durante o estresse hídrico ocorreu indução preferencial dos RNAm das CATs e peroxidases de glutaciona, enquanto que na combinação dos estresses ocorreu a indução de RNAm das enzimas AOX, GPX, GR, Cu/Zn-SOD e glutaciona S-transferases.

Portanto, apesar de preliminares e do número relativamente reduzido de estudos envolvendo a combinação de dois ou mais estresses abióticos, na literatura atual, os resultados são contundentes e demonstram que o metabolismo é diferentemente afetado pelos efeitos isolados e combinados dos fatores abióticos. Os estudos demonstram, ainda, que os mecanismos de proteção ou defesa para uma combinação de estresses podem ser distintos daqueles atribuídos aos fatores isolados, podendo responder, exclusivamente, a combinação (Rizhsky et al., 2002). Por fim, os estudos envolvendo os diferentes aspectos metabólicos, em plantas, indicam, cada vez mais, que a combinação de estresses deve ser considerada como um novo estado do estresse abiótico em plantas, e não simplesmente uma combinação de estresses (Mittler, 2006).

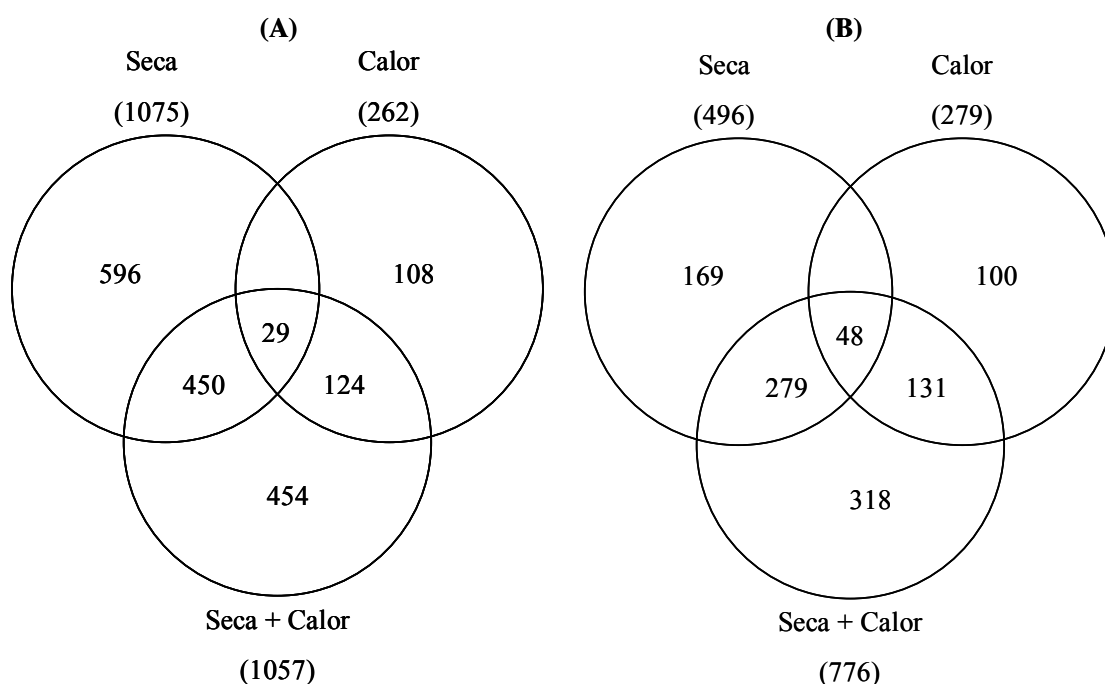


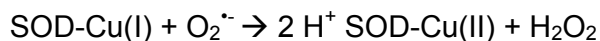
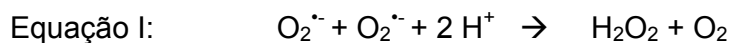
Figura 1 Diagramas mostrando o número de transcritos que apresentaram aumento (A) ou redução (B) da expressão em plantas de *Arabidopsis* submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e calor. São considerados apenas os transcritos que aumentaram ou diminuíram 1,5 vezes, ou mais, comparado às plantas não estressadas. (Adaptado de Rizhsky et al., 2004).

1.2. Antioxidantes enzimáticos

1.2.1. Dismutases do superóxido

A produção do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pode ocorrer em qualquer sítio celular que possui cadeia de transporte de elétrons, como as mitocôndrias e os cloroplastos, além daqueles onde ocorrem reações redox, como os microsossomos, glioxissomos, peroxissomos, apoplasto e citosol (Foyer e Noctor, 2005). Na célula, as enzimas antioxidativas dismutases do superóxido (SODs), são responsáveis pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 e O_2 (Equações I e II), sendo consideradas a primeira linha de defesa antioxidativa enzimática. Em plantas, as SODs podem ser encontradas em todos os compartimentos da célula capazes de produzir EROs, particularmente em cloroplastos, mitocôndria e peroxissomos, os principais sítios de produção de EROs na célula vegetal (Jiménez et al., 1997; Foyer e Noctor, 2000; Alscher et al., 2002).

As dismutases do superóxido constituem uma família de metalo-proteínas que está subdividida em três grupos distintos, dependendo do co-fator enzimático: Fe-SOD, Mn-SOD e Cu/Zn-SOD, localizadas em diferentes compartimentos celulares. As isoformas Fe-SOD estão localizadas nos cloroplastos, enquanto as Mn-SOD podem ser encontradas nas mitocôndrias e peroxissomos. As isoformas Cu/Zn-SOD podem ser encontradas simultaneamente nos cloroplastos, citosol e no espaço extracelular (Alscher et al., 2002). O estudo da seqüência de aminoácidos dos diferentes tipos de SODs sugere que as isoformas Fe-SOD e Mn-SOD são originadas de um ancestral comum, enquanto a Cu/Zn-SOD não apresenta similaridade de seqüência com as demais isoformas, indicando origem evolucionária distinta (Smith e Doolittle, 1992).



Nos cloroplastos, assim como em outros compartimentos celulares, o excesso de radical superóxido produzido é rapidamente eliminado pela SOD (Foyer e Noctor, 2000). Nessa organela, o $O_2^{\cdot-}$ foto-produzido pode reagir espontaneamente com moléculas antioxidantes de baixo peso molecular, como o ascorbato e glutatona, presentes em altas concentrações no estroma dos cloroplastos, ou com íons

metálicos como o Mn^+ . No entanto, a contribuição desses antioxidantes na remoção do excesso de $O_2^{\cdot-}$ é limitada comparada à SOD, em função da sua baixa reatividade com o $O_2^{\cdot-}$. Essa limitação faz das SODs cloroplásticas o principal mecanismo de proteção foto-oxidativa sob condições que estimulam a produção de EROs nessa organela (Noctor e Foyer, 1998).

Na maioria das espécies vegetais a Cu/Zn-SOD é a principal isoforma da dismutase do superóxido presente no cloroplasto, embora espécies como o fumo apresentem predominância da Fe-SOD. Nas plantas contendo a isoforma Fe-SOD como a principal SOD cloroplástica foi observado que sua localização ocorre exclusivamente no estroma (Van et al., 1996; Arisi et al., 1998). A isoforma Cu/Zn-SOD é uma proteína composta de duas subunidades (homodímero) de 16 kDa, apresentando um átomo de Cu^{+2} e outro de Zn^{+2} , ligados a cada uma das unidades (Asada, 1999). As enzimas Cu/Zn-SOD e Fe-SOD apresentam boa solubilidade no meio celular. No entanto, estudos de imunolocalização indicam que a maior parte da Cu/Zn-SOD está associada à membrana do tilacóide, próxima ao complexo do PSI, um dos principais pontos de produção do radical superóxido (Nijs et al., 1991).

Além de participar da eliminação de EROs, geradas durante o metabolismo aeróbico, diversos estudos demonstram o papel das SODs na proteção de danos oxidativos induzidos por estresses abióticos em várias espécies vegetais. O aumento significativo de atividade da SOD em folhas de dois cultivares de citros, expostos ao estresse de alta temperatura, foi correlacionado com a proteção oxidativa e a resistência diferenciada dos genótipos ao estresse térmico (Guo et al., 2006a). Quando cinco cultivares de trigo, apresentando resistência diferenciada ao calor, foram submetidos ao estresse de alta temperatura foi observado que os genótipos mais resistentes apresentaram maior indução de atividade da SOD, associada a menor injúria oxidativa, comparado aos sensíveis (Almeselmani et al., 2006).

Outros estudos demonstram o papel das SODs na proteção de injúrias oxidativas induzidas pelo estresse salino. Amor et al. (2006), trabalhando com duas variedades de uma espécie halófito (*Cakile marítima*) contrastantes na resistência a salinidade, demonstraram que o material mais resistente apresentou maior indução do sistema SOD-CAT-APX, associado à maior eliminação do peróxido de hidrogênio e menor nível de peroxidação de lipídios e danos de membrana. O incremento de atividade da SOD, em resposta a salinidade, ocorreu associado com a resistência diferenciada ao estresse salino em genótipos de diferentes culturas agrícolas, como

arroz (Lee et al., 2001; Vaidynathan et al., 2003; Demiral e Türkan, 2005), citros (Arbona et al., 2003), algodão (Meloni et al., 2003) e milho (Sreenivasulu et al., 2000).

A proteção contra danos oxidativos induzidos pelo estresse hídrico, em diferentes espécies vegetais, está relacionada com o aumento de atividade da SOD. Em plantas de *V. unguiculata* submetidas ao estresse hídrico, foi verificado aumento significativo de atividade da SOD em tecidos de raízes, caules e folhas, demonstrando o papel dessa enzima na proteção oxidativa nos diferentes tecidos e órgãos (Manivannan et al., 2007). Em arroz, os genótipos mais resistentes ao estresse hídrico apresentaram maior atividade da SOD, associada a menores conteúdos de radical superóxido, peróxido de hidrogênio e TBARS, comparado aos sensíveis, após exposição a doses crescentes de PEG-6000 (Sharma e Dubey, 2005; Guo et al., 2006b).

A atividade das SODs é modulada por estresses ambientais como gases poluentes (O_3), radiações e metais pesados. Em clones de Poplar (*Populus alba*) apresentando sensibilidade diferenciada ao estresse oxidativo, foi observada maior indução de atividade das isoformas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD no genótipo sensível, após exposição a uma dose aguda (150mM) de ozônio por 48 horas (Bernardi et al., 2004). Plantas de ervilha, cultivadas em meio hidropônico e submetidas a 50 μ M de $CdCl_2$, durante 14 dias, apresentaram redução na expressão e atividade das isoformas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD (Romero-Puertas et al., 2007). Mutantes de ervilha deficientes na síntese de ascorbato apresentaram intenso aumento de atividade da SOD após exposição à radiação UV por 32 h, indicando o papel dessa enzima na proteção de danos oxidativos induzidos por essa radiação (Gao e Zhang, 2008).

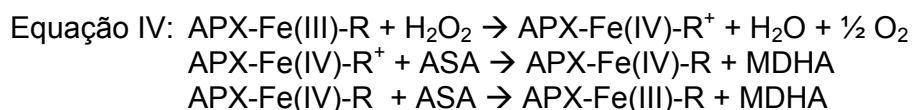
Estudos utilizando plantas transformadas, apresentando aumento em expressão da SOD, demonstram a essencialidade dessa enzima na proteção oxidativa. Plantas de tabaco super-expressando um gene de ervilha para a Cu/Zn-SOD, apresentaram maior resistência ao estresse fotooxidativo induzido por alta luminosidade, sob condições de temperaturas baixas a moderadas (Grupta et al., 1993). Uma marcante redução na necrose foliar em plantas de tabaco foi observada após a expressão aumentada de SOD citosólica, quando expostas ao estresse oxidativo induzido por ozônio (Pitcher e Zilinskas, 1996). Plantas de *Arabidopsis* super-expressando uma SOD mitocondrial (Mn-SOD) apresentaram maior

resistência ao estresse salino (150 mM de NaCl) comparadas às plantas não transformadas (Wang et al., 2004).

1.2.2. Peroxidases de ascorbato

As enzimas peroxidases do ascorbato (APXs) compõem uma família de isoenzimas com características bastante distintas, localizadas em diversos sítios celulares, como citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e glioxissomos (Shigeoka et al, 2002). As APX cloroplásticas estão localizadas no estroma (sAPX) e nos tilacóides (tAPX). As isoformas citosólicas (cAPX) estão solúveis no citosol, enquanto aquelas presentes nos microcorpos e nas mitocôndrias (mAPX/mitAPX) estão associadas às membranas dessas organelas (Asada, 1992). As APX cloroplásticas são monômeros com massa molecular de 37,2 kDa, as de mitocôndria e dos microcorpos possuem 31 kDa (Leonardis et al., 2000), e a APX citosólica é um homodímero com subunidades de 28 kDa (Miyake et al., 1993).

Apesar dessas diferenças, todas as APXs utilizam o ascorbato (ASA) como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 para H_2O e O_2 (Asada et al., 1992). No geral, a enzima APX utiliza dois elétrons intermediários, localizados no átomo de Fe^{+3} e em um resíduo de triptofano, para catalisar a redução do H_2O_2 (Equações III e IV). O ciclo de reação inicia-se pela transferência dos elétrons do Fe^{+3} e do resíduo de triptofano do complexo reduzido APX-Fe(III)-R para o H_2O_2 , resultando no complexo oxidado APX-Fe(IV)-R⁺. Em seguida, ocorre a regeneração do estado redox do grupo R, pelo consumo de uma molécula de ASA, seguido da regeneração do complexo APX-Fe(III), pelo consumo da segunda molécula de ASA. Ao final da reação para cada duas moléculas de ASA oxidada (MDHA) uma de H_2O_2 reduzida (Noctor e Foyer, 1998).



As peroxidases do ascorbato possuem importante papel na proteção contra o estresse oxidativo induzido por diferentes estresses abióticos. Song et al. (2005), realizaram o fracionamento celular e estudaram os efeitos de diferentes estresses abióticos na atividade das isoformas de APXs localizadas em diferentes

compartimentos celulares de folhas de melão. Os resultados demonstraram que a tAPX (tilacóide) não foi afetada pelos tratamentos de alta temperatura, peróxido de hidrogênio e metil vilogen, durante 4 dias de tratamento. No entanto, a atividade das sAPX (estroma), mAPx (membrana) e cAPX (citosólica) foi estimulada por todos tratamentos, particularmente pela alta temperatura, que aumentou em 2 e 3 vezes a atividade da cAPX e sAPX, respectivamente, ao final dos quatro dias de tratamento.

O estresse salino possui a capacidade de modular a atividade das peroxidases de ascorbato. A atividade da APX em folhas de plantas de batata submetidas a 100 e 200 mM de NaCl, durante 30 dias, não foi alterada (Fidalgo et al., 2004). Resultados similares foram encontrados para plantas de tabaco (Savouré et al., 1999) e para um cultivar de ervilha, sensível ao sal (Hernández e Almansab, 2002). No entanto, a atividade da APX foi significativamente induzida por NaCl em um cultivar de milho resistente ao sal, enquanto que no sensível foi reduzida (Sreenivasulo et al., 2000). Em um outro estudo realizado com plantas de ervilhas, a atividade da APX apresentou dupla resposta em relação à salinidade, foi estimulada na presença de 70 e 110 mM de NaCl e reduzida por 130 mM (Gómez et al., 1999).

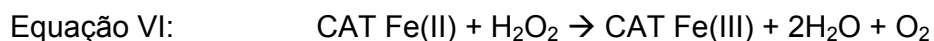
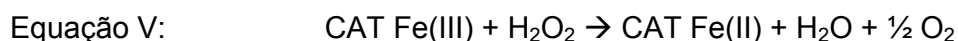
A atividade da APX é modulada pelos estresses de seca e de altas temperaturas. Experimento de longa duração demonstrou que a atividade da APX, em folhas, foi severamente reduzida a partir de 12 dias de estresses hídrico em duas espécies de gramíneas, apresentando resistência diferencia à seca (Jiang e Huang, 2001). A redução de atividade da APX foi associada ao intenso aumento na peroxidação de lipídios nas duas espécies. Em plantas de *citrus* submetidas ao estresse térmico, pela exposição a 38 °C durante 15 dias, foi observado aumento significativo na atividade da APX, sugerindo o papel dessa enzima na proteção de oxidativos durante temperaturas elevadas (Guo et al., 2006a).

A proteção aos danos oxidativos induzidos pelo estresse hídrico, em diferentes espécies vegetais, também está relacionada com o aumento de atividade das APXs. Em plantas de *V. unguiculata* submetidas ao estresse hídrico, foi verificado aumento de atividade da APX proporcional à duração do estresse em tecidos de raízes, caules e folhas. A intensidade de atividade foi maior em folhas, seguido de caules e raízes, demonstrando o papel dessa enzima na proteção dos diferentes tecidos e órgãos da planta (Manivannan et al., 2007). Em arroz, a atividade total da APX aumentou resposta ao estresse hídrico, aos 10 e 20 dias de

exposição a concentrações crescente de PEG-6000, enquanto que a atividade da APX citosólica foi reduzida após 20 dias de tratamento (Sharma e Dubey, 2005).

1.2.3. Catalases

As catalases (CATs) são enzimas tetraméricas, com quatro subunidades idênticas de 60 kDa, contendo um grupo heme que catalisam a redução do H_2O_2 para H_2O e O_2 (Equações V e VI), protegendo a célula dos danos oxidativos oriundos da acumulação excessiva do H_2O_2 (Sánchez-Casas e Klessig, 1994). As CATs são enzimas que estão presentes nos peroxissomos, glioxissomos e organelas relacionadas, onde enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio, como a glicolato oxidase, estão localizadas. As CATs estão associadas principalmente com a remoção do H_2O_2 nos microcorpos (Willekens et al., 1995). Além de catalisar a decomposição direta do H_2O_2 , as CATs promovem a oxidação de substratos como metanol, etanol, formaldeído e nitritos, utilizando o peróxido de hidrogênio (Havir e McHale, 1989).



Comparadas as APXs, as CATs possuem baixa afinidade pelo substrato (H_2O_2), porém apresentam alta atividade catalítica. Essa diferença de propriedade cinética, é atribuída à necessidade da ligação simultânea de duas moléculas de peróxido de hidrogênio ao sítio catalítico das CATs, para que ocorra a reação (Noctor e Foyer, 1998). Apesar disso, o papel das CTAs na proteção oxidativa é extremamente importante, por essas enzimas estarem localizadas em pontos estratégicos da célula, em que há produção localizada de H_2O_2 . Durante a fotorrespiração, a catalase é essencial para remoção do H_2O_2 gerado no peroxissomo, evitando o acúmulo excessivo de peróxido nessa organela, além de impedir o seu vazamento para outros compartimentos da célula (Foyer e Noctor, 2000).

Em plantas, existem três isoformas de CATs, CAT1, CAT2 e CAT3, classificadas em três classes distintas (Havir e McHale, 1989; Willekens et al., 1997). Na classe I estão as catalases SU2, do algodão (Ni et al., 1990), CAT1, de *Nicotiana*

plumbaginifolia (Willekens et al., 1994), CAT 2, de *A. thaliana* (Frugoli, et al., 1996) e CAT-2 do milho (Mittler et al., 1996). Essas enzimas estão envolvidas com a remoção do H₂O₂ durante a fotorespiração e são dependentes de luz. A classe II inclui a CAT 2, do feijão (Suzuki et al., 1995), CAT 3, de milho e tomate (Drory e Woodson, 1992), CAT 2St da batata (Drory e Woodson, 1992), e CAT 1 de *A. thaliana* (Frugoli, et al., 1996), encontradas principalmente no tecido vascular. A classe III inclui a SU 1 do algodão, CAT 3 de *N. plumbaginifolia*, CAT 1 de feijão e CAT 3 de *A. thaliana* (Frugoli, et al., 1996), que estão localizadas nos glixissomos e são abundantes em sementes e plântulas (Willekens, et al., 1995).

O padrão de expressão gênica das diversas classes e tipos de catalases apresenta modulação diferenciada. O aumento de transcritos de CAT 2 e CAT 3 de *A. thaliana* (Zhong e McClung, 1996), Cat 1 de *Nicotiana plumbaginifolia* (Willekens et al., 1994), e CAT- 3 do milho (Boldt e Scandalios, 1995), são reguladas por ritmos circadianos, enquanto outras, como as Cat 2 e Cat 3 de *Nicotiana plumbaginifolia* e CAT 1 de *A. thaliana*, aparentemente possuem outros tipos de modulação (Frugoli et al., 1996). As catalases atuam continuamente na remoção do H₂O₂ celular e por esta razão sua concentração deve ser mantida inalterada. Apesar disso, o pool de CAT na célula pode ser rapidamente reduzido sob condições de estresses que resultem na inibição do seu processo de tradução ou em sua degradação (Feierabend et al., 1996).

A luminosidade possui forte influência na modulação da expressão gênica de algumas classes e tipos de catalases de plantas. As catalases podem ser fotoativadas por níveis de luminosidade moderadamente elevados, comparado às condições de luz para as quais as plantas estão naturalmente adaptadas (Feierabend et al., 1996; Streb e Feierabend, 1996). No entanto, o padrão de resposta de expressão dos diferentes tipos de CATs para a luminosidade é variado. Os transcritos das isoformas CAT 1 e CAT 2 aumentaram intensamente sob condições de alta luminosidade, no entanto, a expressão dos RNAm da CAT 3 apresentou um rápido e transiente declínio sob níveis moderados de luz (McClung, 1997), enquanto que a expressão da Cat 1 em folhas de tabaco não foi alterada pela luminosidade (Willekens et al., 1995; Willekens et al., 1997).

Temperaturas extremas também afetam a atividade das CATs de plantas. No milho, CAT-3 é mais sensível à temperatura do que CAT-1 (Havir e McHale, 1989). Em geral, os trabalhos indicam que a atividade da CAT é inibida sob condições de

baixas temperaturas (Omran, 1980), ou de choque térmico por calor (Lopez-Delgado et al., 1998; Dat et al., 1998; Feierabend et al., 1992; Hertwig et al., 1992). Em plântulas de trigo submetidas a 40 °C por 4 h, a atividade da CAT foi inibida (Feierabend et al., 1992). O nível de transcritos das *Cat 1* e *Cat 2* em *N. plumbaginifolia* foram reduzidos após a exposição das plântulas a 37 °C por 5 h, e apresentou rápida recuperação quando as plântulas foram mantidas a 22 °C. No milho, a indução da *CAT-3* por baixas temperaturas está relacionada com a tolerância ao frio (Prasad et al., 1994).

Além dos estresses de luz e temperatura, a atividade da CAT é modulada pelos estresses salino e hídrico. A atividade da CAT em folhas de *Vigna unguiculata* foi intensamente inibida pelo estresse salino e não apresentou aumento significativo após 3 dias de recuperação do estresse (Cavalcanti et al., 2007). No entanto, em plantas de arroz submetidas ao estresse salino, foi observada redução da atividade de CAT com subsequente aumento, ao nível do controle, quando as plantas foram submetidas à recuperação do estresse durante dois dias (Lee et al., 2001). Em duas espécies de gramíneas, *Festuca arundinacea* e *Poa pratensis*, a atividade de CAT foliar foi fortemente inibida pelo estresse hídrico durante um experimento de longa duração, 30 dias (Jiang e Huang, 2001).

1.3 Antioxidantes não enzimáticos

1.3.1. Ácido ascórbico

Em plantas, a biossíntese do ácido ascórbico (ASA) pode ocorrer em tecidos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, indicando que sua produção não depende diretamente do processo fotossintético (Noctor e Foyer, 1998). No entanto, a localização exata da biossíntese do ascorbato na célula vegetal não está muito clara, embora estudos indiquem que possa ocorrer no citosol e mitocôndrias (Shao et al. 2008), ou nos cloroplastos, organela que possui altas concentrações de ascorbato. No vacúolo celular a concentração do ácido ascórbico está próxima de 0,6 mM, enquanto que em alguns compartimentos dos cloroplastos e do citosol pode atingir concentrações entre 20 e 50 mM (Shao et al., 2008; Foyer e Lelandais, 1996).

O ascorbato reduzido é considerado o mais importante substrato para redução do H₂O₂ em água e oxigênio molecular na célula vegetal (Nakano e Asada, 1987). A peroxidase do ascorbato (APX) utiliza duas moléculas de ASA como

doadoras específicas de elétrons para reduzir uma molécula de H_2O_2 a H_2O e O_2 , com a liberação simultânea de duas moléculas do ácido monodehidroascórbico (MDHA; Figura 2). O ácido monodehidroascórbico é um radical instável e pode ser rapidamente desprotonado, de forma espontânea, para produzir ASA e ácido dehidroascórbico (DHA; Figura 2). Além de ocorrer de forma espontânea, a redução do monodehidroascorbato para ascorbato pode também utilizar doadores de elétrons específicos como o citocromo tipo *b*, a ferredoxina reduzida (Miyake e Asada, 1992), ou o NADPH (Asada, 1999).

Na célula vegetal, o ascorbato pode atuar como antioxidante secundário, doando elétrons para a redução do peróxido de hidrogênio na reação catalisada pela APX, ou primariamente, pela interação direta com diferentes EROs, como o H_2O_2 , O_2^- , HO^\cdot , $^1\text{O}_2$ e hidroperóxidos de lipídios (Smirnoff, 1996; Noctor e Foyer, 1998; Shao et al., 2008). O ascorbato pode ainda atuar na manutenção do estado reduzido do α -tocoferol, um importante antioxidante não enzimático na fase aquosa, pela redução da sua forma oxidada (Padh, 1990). O tocoferol (vitamina E) é um antioxidante solúvel em lipídio e capaz de interagir com as EROs e impedir as reações finais que causam peroxidação de lipídios no interior dos diferentes sistemas de membranas da célula (Ślesak et al., 2007).

A utilização do ASA como antioxidante, diretamente ou por meio enzimático, leva ao acúmulo da sua forma oxidada, MDHA. Este pode ser desprotonado para ASA e DHA, ou reduzido enzimaticamente para ASA pela ação da enzima redutase de monodehidroascorbato (MDHAR), utilizando NADPH, enquanto que o DHA é reduzido pela redutase de dehidroascorbato (DHAR), utilizando glutatona reduzida (GSH) (Asada, 1999). Nessa reação ocorre o consumo da GSH e produção da forma oxidada (GSSG), que será reduzida pela redutase de glutatona (GR), utilizando NADPH. Essa seqüência de reações é conhecida como o ciclo do ascorbato-glutatona (Figura 3), importante via metabólica que atua na regeneração do ASA e que mantém estável a relação ASA/DHA, e o equilíbrio redox do ambiente celular (Noctor e Foyer, 1998).

O ASA é uma das primeiras linhas de defesa oxidativa e o seu sistema redox, constituído pelos diferentes estados de oxidação da molécula, é um importante mecanismo de manutenção do estado de redox celular, sob condições fisiológicas normais ou de estresses (Noctor e Foyer, 1998). A alteração desse balanço durante a exposição de várias espécies a diferentes indutores de estresse oxidativo, como o

vilogeno (Guo et al., 2007; Song et al., 2005), metil jasmonato (Ali et al., 2005), H_2O_2 (Law et al., 1983; Song et al., 2005), radiação UV (Gao e Zhang, 2008), e temperaturas extremas (Guo et al., 2006; Song et al., 2005). Esses resultados indicam o papel do balanço redox do ascorbato (ASA/DHA) no restabelecimento da homeostase redox-celular e na proteção contra danos oxidativos durante diferentes estresses abióticos.

O estado redox do ascorbato, representado pela fração do ascorbato reduzido presente no *pool* total do ascorbato celular (ASA/ASA+DHA), representa a fração do ASA efetivamente capaz de atuar na proteção oxidativa (Conklin e Barth, 2004). O papel do estado redox do ASA na proteção oxidativa foi demonstrada em plantas de tabaco transgênica expressando uma MDHAR de trigo. As plantas transformadas apresentaram conteúdo de ASA duas vezes maior, comparado ao tipo selvagem, que ocorreu associado à maior resistência aos danos oxidativos induzidos por metil violageno, H_2O_2 , baixa temperatura e salinidade (Kwon et al., 2003; Conklin e Barth, 2004). Por outro lado, plantas de tabaco com expressão aumentada da enzima oxidase do ascorbato, que oxida o ASA e reduz a relação ASA/DHA, o conteúdo de ASA foi reduzido de 30% para níveis não detectáveis no tecido, acarretando aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo induzido por ozônio (Sanmartin et al., 2003).

1.3.2. Glutathiona

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo γ -glu-cys-gly que ocorre na célula simultaneamente com a forma oxidada GSSG, formando o par redox GSH/GSSG. A glutathiona pode ser sintetizada no citosol e/ou nos cloroplastos, onde estão localizadas as enzimas sintetase da γ -glutamilcisteína e sintetase da glutathiona, duas enzimas que compõem a via biossintética desse tripeptídeo (Noctor e Foyer, 1998; Foyer e Noctor, 2005). A glutathiona reduzida é a forma predominante de grupos SH não protéico, da célula, e está relacionada à regulação da absorção de enxofre no tecido radicular, além de atuar como antioxidante, no tamponamento redox e na expressão de genes de defesa (Noctor e Foyer, 1998; Gomez et al., 2004).

Nas reações envolvendo a GSH na célula, o grupo SH do resíduo de cisteína é oxidado para produzir GSSG, enquanto que a reação reversa é catalisada pela GR, utilizando NADPH. Na célula, um *pool* de GSH em estado altamente reduzido,

mantido pela atividade constante da GR, é necessário para a manutenção da atividade de muitas enzimas, e para evitar a formação de pontes dissulfeto entre proteínas, impedindo a agregação e inativação enzimática (Tausz et al., 2004). Em plantas, os tecidos metabolicamente ativos possuem concentrações relativamente altas de GSH, 4,5 mM nos cloroplastos, que atuam no tamponamento redox, formando barreiras entre os grupos SH dos resíduos de cisteína das proteínas e as espécies reativas de oxigênio, produzidas durante o metabolismo normal ou quando aumentadas sob condições de estresse (Foyer e Noctor, 2005).

Além de atuar diretamente na proteção oxidativa, o *pool* de GSH celular pode ser utilizado como substrato por diversas enzimas redutoras, incluindo as redutases de peróxidos. As enzimas glutathione S-transferases (GSTs) e as peroxidases da glutathione (GPXs), são exemplos de enzimas redutoras que utilizam moléculas de GSH como doadora de elétrons para a eliminação de EROs e seus produtos de reação (Tausz et al., 2004). Embora as GSTs e GPXs possuam contribuição relativamente menor na remoção do H₂O₂, comparada à peroxidases, como as APXs e CATs (Foyer e Noctor, 2005), plantas de tabaco com expressão aumentada de dessas enzimas apresentaram maior resistência ao estresse oxidativo, induzido por salinidade e baixa temperatura, associado ao significativo aumento do conteúdo da GSSG (Roxas et al., 1997).

O estado redox da glutathione, conteúdo da GSH em relação ao *pool* total (GSH+GSSG), a exemplo do ascorbato, indica o conteúdo da glutathione capaz de atuar na proteção oxidativa e na homeostase redox celular. Sob condições fisiológicas, o estado redox da glutathione (GSH/GSSG), o qual é mantido próximo de 9 a 10, pode mudar transientemente, e passar para níveis de maior oxidação (Tausz et al., 2004). Além de apresentar mudanças endógenas, essa alteração pode ser intensificada sob condições de estresse que acarretem acúmulo excessivo de EROs (Neil et al., 2003; Vranová et al., 2002). Nessas condições, a capacidade de remoção de EROs aumenta, pela indução do ciclo do ascorbato-glutathione, e um novo nível de equilíbrio do estado redox GSH/GSSG é estabelecido (Tausz et al., 2004).

Em plântulas de arroz, apresentando resistência diferenciada à salinidade, foi observado aumento no conteúdo de GSH no cultivar resistente e redução no sensível, quando estas foram submetidas a concentrações crescentes de NaCl por 42 h. Esse contraste ocorreu associado a maior eliminação de H₂O₂ e menor

intensidade da peroxidação de lipídios no cultivar tolerante comparado ao sensível (Vaidyanathan et al., 2003). O aumento do conteúdo de GSH e da relação GSH/GSSH em tecidos de folhas e raízes foi observado em duas espécies de tomate apresentando resistência contrastante ao estresse oxidativo. O material resistente (*Lycopersicon pennellii esculentum*) apresentou maior indução do sistema glutaciona (conteúdo de GSH e relação GSH/GSSG) comparado ao sensível (*Lycopersicon esculentum*), durante 14 dias de exposição a 100 mM de NaCl (Mittova et al., 2003).

O estado redox da GSH é afetado pelo aumento da temperatura. Quando cultivares de trigo, diferindo na resistência ao frio, foram submetidos ao tratamento de temperatura de 37 °C, durante 3 dias, foi observada intensa redução do conteúdo de GSH com simultâneo aumento no teor de GSSG, e significativa redução da relação GSH/GSSG em todos os genótipos avaliados (Kocsk et al., 2004). Em cultivares de arroz, apresentando resistência diferenciada ao estresse oxidativo, foi observada redução significativa do conteúdo de GSH no cultivar sensível enquanto que no resistente o teor de GSH não foi alterado após tratamento com vilogeno (Guo et al., 2007). Esses resultados demonstram a sensibilidade do estado redox da glutaciona aos diferentes estímulos abióticos e indicam sua importância na proteção oxidativa celular contra fatores ambientais adversos.

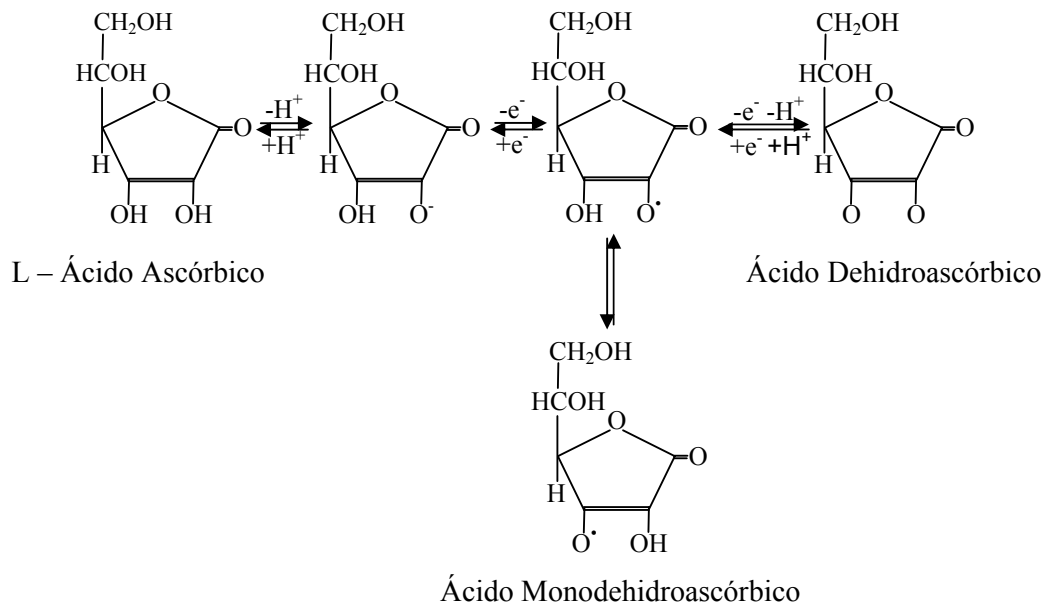


Figura 2 Componentes do sistema redox do ascorbato na celular vegetal. Ácido ascórbico (ASA); Ácido dehidroascórbico (DHA); Ácido monodehidroascórbico (MDHA). (Adaptado de Noctor e Foyer, 1998)

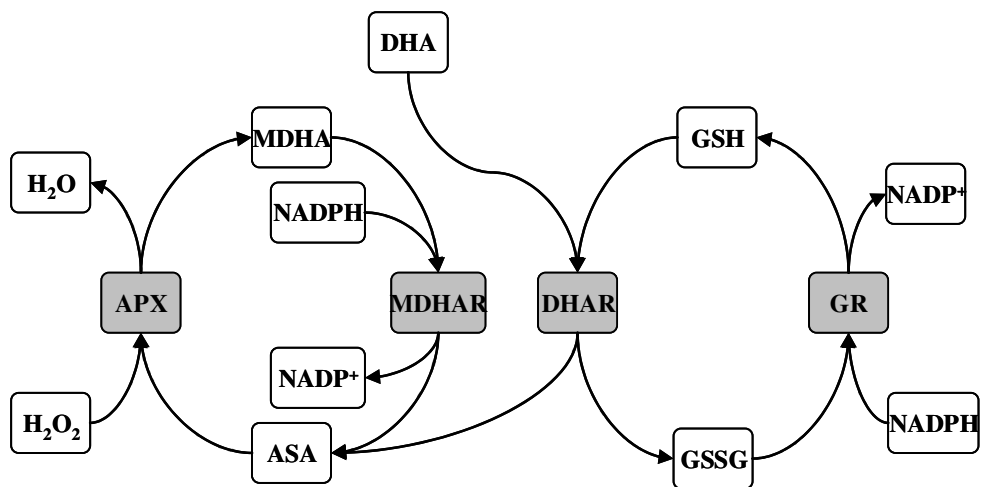


Figura 3 Ciclo do ascorbato-glutationa na célula vegetal. APX – Peroxidases de ascorbato; MDHAR – Redutase de monodehidroascorbato; DHAR – Redutase de dehidroascorbato; GR – Redutase de glutationa. (Adaptado de Foyer e Noctor, 2000).

2. Justificativa

A cultura do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) ocupa uma área plantada superior a 677.000 hectares de terras agrícolas nos estados nordestinos do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte, todos situados no semi-árido brasileiro. Nesses estados, a cadeia produtiva do caju gera mais de 300.000 empregos diretos e indiretos, e contribui de forma significativa para a geração de emprego, renda e redução do êxodo rural da região (Barros et al., 2000). No entanto, apesar de ser intensamente explorado no semi-árido brasileiro, existem poucos estudos sobre os impactos adversos de fatores abióticos, como o estresse hídrico, a salinidade e temperaturas elevadas, típicos dessa região, sobre a fisiologia da espécie. Mais raros ainda, são os estudos direcionados ao entendimento dos componentes metabólicos diretamente relacionados com os mecanismos de danos e proteção celular sob condições de estresses abióticos.

Por ser amplamente cultivado no semi-árido nordestino, o cajueiro está exposto aos efeitos simultâneos de diferentes estresses abióticos, característicos da região. Tais fatores atuam continuamente de forma isolada e combinada, em diferentes intensidades, podendo explicar, em parte, os baixos índices de produtividade da cultura na região, aproximadamente 220 kg/ha/ano (Barros et al., 2000). Estudos com plântulas de cajueiro demonstraram que o estresse salino induz forte redução do crescimento e intenso acúmulo dos íons tóxicos Na^+ e Cl^- , em raízes e folhas, associados com a restrição estomática e nutricional, e desbalanço do metabolismo do nitrogênio e de aminoácidos (Viégas et al., 2001; Rocha, 2003; Matos et al., 2003; Viégas et al., 2004). O estresse hídrico de curta duração induziu poucas alterações oxidativas, revelado pelo conteúdo de TBARS e atividade das enzimas SOD e APX na espécie (Soares, 2005).

Esses resultados são ainda controversos e não esclarecem os reais efeitos interativos dos diferentes estresses abióticos que comprometem a sustentabilidade da cajucultura no semi-árido nordestino. Dessa forma, alguns questionamentos são extremamente pertinentes para o cajueiro e diversas culturas exploradas nessas regiões. Existe similaridade de danos oxidativos causados pelos estresses de seca, salino e temperatura elevada? Qual desses fatores é o mais importante? Os danos celulares, induzidos pelos estresses isolados, representam um somatório capaz de estimar os efeitos interativos dos estresses? Existem interações sinérgicas e/ou

antagônicas associadas aos sistemas de proteção oxidativa? Qual (is) sistema (s) de proteção é mais importante? Essas perguntas só poderão ser respondidas utilizando abordagens experimentais amplas, como propõe o presente estudo, capazes de contemplar os efeitos isolados e simultâneos dos diferentes fatores abióticos.

O presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar as alterações bioquímicas e fisiológicas associadas com a tolerância do cajueiro sob situações de múltiplos estresses abióticos, como os estresses hídrico, salino e de temperatura elevada. Utilizando indicadores fisiológicos de condutância estomática e do estado hídrico, foram contempladas respostas associadas com a aclimação da planta, enquanto o monitoramento das alterações do metabolismo oxidativo, forneceu conhecimentos acerca dos distúrbios metabólicos, e do restabelecimento da homeostase redox celular, durante condições extremas. Esses parâmetros poderão auxiliar na identificação de danos sob condições de campo, possibilitando um diagnóstico precoce e preventivo, podendo auxiliar na tomada de decisões para adoção de práticas que reduzam ou evitem os danos provocados por esses estresses na produtividade agrícola.

Além desses ganhos, os resultados poderão ainda ser utilizados na identificação de genótipos com maior capacidade de aclimação a determinados fatores abióticos, particularmente em resposta à interação destes, e poderão auxiliar em programas de melhoramento que visem obtenção de materiais mais resistentes a ambientes adversos.

3. Bibliografia

ALI, M.B., YU, K.W., HAHN, E.J. e PAEK, K.Y. Differential responses of anti-oxidants enzymes, lipoxygenase activity, ascorbate content and the production of saponins in tissue cultured root of mountain Panax ginseng C.A. Meyer and Panax quinquefolium L. in bioreactor subjected to methyl jasmonate stress. **Plant Science**, v. 169, p. 83-92. 2005.

ALMESELMANI, M., DESHMUKH, P.S., SAIRAM, P.K., KUSHWADA, S.R. e SINGH, T.P. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. **Plant Science**, v. 171, p. 382-388. 2006.

ALSCHER, R.G., ERTURK, N. e HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341. 2002.

AMOR, N.B., JIMÉNEZ, A., MEGDICHE, W., LUNDQVIST, M., SEVILLA, F. e ABDELLY, C. Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 446-457. 2006.

ARBONA, V., FLORS, V., JACAS, J., GARCÍA-AGUSTÍN, P., GÓMEZ-CADENAS, A. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. **Plant Cell Physiol.**, v. 44, n. 4, p. 388-394. 2003.

ARISI, A-CM., CORNIC, G., JOUANIN, L. e FOYER, C.H. Overexpression of Fe-SOD in transformed poplar modifies the regulation of photosynthesis at low CO₂ partial pressures or following exposure to the prooxidant herbicide methyl viologen. **Plant Physiol.**, v. 117, p. 565–74. 1998.

ASADA, K. The Water-Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 50, p. 601-39. 1999.

BARROS, L.M., CAVALCANTE, J.J, VASCONCELOS, J., PAIVA, J.R. Seleção de clones de cajueiro-anão para o cultivo comercial no Estado do Ceará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 11, p. 2197-2204. 2000.

BOLDT, R. e SCANDALIOS, J.G. Circadian regulation of the Cat3 catalase gene in maize (*Zea mays* L.): entrainment of the circadian rhythm of Cat3 by different light treatments. **Plant J.**, v. 7, p. 989-999. 1995.

BOWLER, C. e FLUHR R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. **Trends Plant Sci**, v. 5, p. 241-246. 2000.

BRAY, E.A., BAILEY, S.J. e WERETILNYK, E. Responses to Abiotic Stresses. In: B.B. Buchana, W. Gruissem, et al., (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: America Society of Plant Physiologists. v. 2000, p. 1158-1203.

CATTIVELLI, L., RIZZA, F., BADECK, F-W., MAZZUCOTELLI, E., MASTRANGELO, A.M., FRANCIA, E., MARÉ, C., TONDELLI, A. e STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v. 105, p. 1-14. 2008.

CAVALCANTI, F.R., LIMA, J.P.M.S., FERREIRA-SILVA, S.L., VIÉGAS, A. e SILVEIRA, J.A.G. Roots and leaves display contrasting in cowpea. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 591-600. 2007.

CHEN, W., PROVART, N.J., GLAZEBROOK, J., KATAGIRI, F., CHANG, H.S., EULGEM, T., MAUCH, F., LUAN, S., ZOU, G. e WHITHAM, S.A. Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. **Plant Cell**, v.14, p. 559–574. 2002.

CONKLIN, P.L. e BARTH, C. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 959-970. 2004.

DAT, J.F., LOPEZ-DELGADO, H., FOYER, C.H. e SCOTT I.M. Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 1351-1357. 1998.

DEMIRAL, T. e TURKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense system and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 247-257. 2005.

DRORY, A. e WOODSON, W.R. Molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding catalase from tomato. **Plant Physiol.**, v 100, p. 1605-1606. 1992.

FAO. Adaptation to climate change in agriculture, forestry and fisheries: Perspective, framework and priorities. Rome, Italy.: Food and Agriculture Organization of The United Nations, v. 2007. 33 p.

FEIERABEND, J., SCHAAN, C. e HERTWIG, B. Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. **Plant Physiol.**, v. 100, p. 1554–1561. 1992.

FEIERABEND, J., STREB, P., SCHMIDT, M., DEHNE, S. e SHANG, W. Expression of catalase and its relation to light stress and stress tolerance. In: **Physical Stresses in Plants: Genes and Their Products for Tolerance**, pp. 223–234, Grillo S. and Leone A. (eds), Springer, Berlin. 1996.

FIDALGO, F., SANTOS, A., SANTOS, I. e SALEMA, R. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Ann. Appl. Biol.**, v. 145, p. 185-192. 2004.

FOYER, C. e NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, cell and Environmental**, v. 28, p. 1056-1071. 2005.

FOYER, C.H. e LELANDAIS, M. A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasma membranes of pea leaf mesophyll cells. **J. Plant Physiol.**, v. 148, p. 391-98. 1996.

FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355–364. 2003

FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Tansley Review No. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytol**, v. 146, p. 359-388. 2000.

FRUGOLI, J.A., ZHONG H.H., NUCCIO M.L., MCCOURT P., MCPEEK M.A., THOMAS T.L. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiol.**, v. 112, p. 327-336. 1996.

GAO, Q. e ZHANG, L. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient vtc1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 138-148. 2008.

GOMEZ, L.D., NOCTOR, G., KNIGHT, M. e FOYER, C. The intercellular distribution of glutathione synthesis and its response to chilling in maize. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1662-1671. 2004.

GROVER, A., KAPOOR, A., LAKSHMI, O. S., AGARWAL, S., SAHI, C., KATIYAR-AGARWAL, S., AGARWAL, M. e DUBEY, H. Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. **Current Science**, v. 80 n. 2, p. 206-216. 2001.

GUO, Y.P., ZHOU, H.F. e ZHANG, L.C. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 260-267. 2006a.

GUO, Z., HUANG, M., LU, S., YAQING, Z. e ZHONG, Q. Differential response to paraquat induced oxidative stress in two rice cultivars on antioxidants and chlorophyll a fluorescence. **Acta Physiol Plant.**, v. 29, p. 39-46. 2007.

GUO, Z., OU, W., LU, S. e ZHONG, Q. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**. 44. p. 828–836. 2006b.

GUPTA, A.S., HEINEN, J.L., HOLADAY, A.S., BURKETT, J.J. e ALLEN, R.D. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. **Plant Biology**. v. 90. p. 1629-1633. 1993.

HAVIR, E.A. e MCHALE, N.A. Enhanced peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley, and maize. **Plant Physiol.**, v. 91, p. 812–815. 1989.

HERNÁNDEZ, J.A. e ALMANSAB, M.S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 251–257. 2002

HERTWIG, B., STREB, P. e FEIERABEND, J. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. **Plant Physiol.**, v. 100, p. 1547-1553. 1992.

- HEYNE, E.G. e BRUNSON, A.M. Genetic studies of heat and drought tolerance in maize. **J. Am. Soc. Agro.**, v. 32, p. 803-814. 1940.
- HOEKSTRA, F.A., GOLOVINA, E.A. e BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends Plant Sci**, v 6, p. 431-438. 2001.
- JIANG, Y. e HUANG, B. Drought and Heat Stress Injury to Two Cool-Season Turfgrasses in Relation to Antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation. **Crop Sci.**, v. 41, p. 436-442. 2001.
- JIMÉNEZ, A., HERNÁNDEZ, J.A., DEL RÉO, L.A. e SEVILLA, F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 272-84. 1997.
- JONES, P.D., NEW, M., PARKER, D.E., MORTIN, S. e RIGOR, I.G. Surface area temperature and its change over the past 150 years. *Rev. Geophys.* 37, 173-199. 1999.
- KISHOR, K.P.B., HONG, Z., MIAO, G.H., HU, C.A.A. e VERMA, D.P.S. Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiol**, v. 108, p. 1387-1394. 1995.
- KOCSK, G., SZALAI, G., SUTKA, J., PÁLDI, E. e GALIBA, G. Heat tolerance together with heat stress-induced changes in glutathione and hydroxyl methyl glutathione levels is affected by chromosome 5A of wheat. **Plant Science**, v. 166, p. 451-458. 2004.
- KOTAK, S., LARKINDALE, J., LEE, U., KOSKULL-DORING, P.V., VIERLING, E. e SCHARF, K.D. Complexity of the heat stress response in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 310-316, 2007.
- KWON, S.Y., CHOI, S.M., AHN, Y.O., LEE, H.S., LEE, H.B., PARK, Y.M. e KWAK, S.S. Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human DHAR gene. **J Plant Physiol**, v. 160, p. 347-353. 2003.
- LAW, M.Y., CHARLES, S.A. e HALLIWELL, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of Paraquat. **Biochem. J.**, v. 210, p. 899-903. 1983.
- LEE, D.H., KIM, Y.S. e LEE, C.B. The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oriza sativa* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 737-745. 2001.
- LEONARDIS, S.D., DIPIERRO, N. e DIPIERRO, S. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondrial. **Plant physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 773-779. 2000.
- LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J.F., FOYER, C.H. e SCOTT, I.M. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. **J. Exp. Bot.**, v, 49, p. 713-720. 1998.
- MACHADO, S. e PAULSEN, G.M. Combined effects of drought and high temperature on water relations of wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 233, p. 179-187. 2001.
- MANIVANNAN, P., JALEEL, A.C., KISHOREKUMAR, A., SANKAR, B., SOMASUNDARAM, R., SRIDHARAN, R. e PANNEERSELVAM, R. Changes in antioxidant metabolism of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. by propiconazole under water deficit stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 57, p. 69-74. 2007.
- MATOS, N.N., JUNIOR, A.C.T., SILVEIRA, J.A.G. Influência do porta-enxerto no comportamento fisiológico de mudas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) submetidas a estresses. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 25 (1), p. 27-31. 2003.
- MCCLUNG, C.R. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 23, p. 489-496. 1997.

- MELONI, D.A., OLIVA, M.A., MARTINEZ, C.A. e CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 69-76. 2003.
- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **TRENDS in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15-19. 2006.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410. 2002.
- MITTLER, R., SHULAEV, V., SESKAR M. e LAM, E. Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. **Plant Cell**, v. 8, p. 1991-2001. 1996.
- MITTOVA, V., THEODOULOU, F.L., KIDDLE, G., GÓMEZ, L., VOLOKITA, M., TAL, M., FOYER, C. e GUY, M. Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione-metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. **FEBS Letters**, v. 554, p. 417-421. 2003.
- MIYAKE, C. e ASADA, K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoregeneration of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. **Plant Cell Physiol.**, v. 33, p. 541-53. 1992.
- MIYAKE, D., CAO, W.H. e ASADA, K. Purification and molecular properties of thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, p. 881-889. 1993.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250. 2002.
- MUNNS, R. e TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 651-81. 2008.
- NAKANO, Y. e ASADA K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. **Plant Cell Physiol.**, v. 28, p. 131-40. 1987.
- NEILL, S. J., DESIKAN, R., CLARKE, A., HURST, R. D. e HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **J Exp Bot**, v. 53, p. 1237-1247. 2002.
- NEILL, S.J., DESIKAN, R. e HANCOCK, J.T. Nitric oxide signalling in plants. **New Phytologist**, v. 159, p. 11-35. 2003.
- NI, W., TURLEY, R.B. e TRELEASE, R.N. Characterization of a cDNA encoding cottonseed catalase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1049, p. 219-222. 1990.
- NIJS, D. e KELLEY, P.M. Vitamins C and E donate single hydrogen atoms *in vivo*. **FEBS Lett.**, v. 284, p. 147-51. 1991.
- NOCTOR, G. e FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 49, p. 249-79. 1998.
- OMRAN, R.G. Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase, and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings. **Plant Physiol.**, v. 65, p. 407-408. 1980.
- PADH, H. Cellular functions of ascorbic acid. **Biochem. Cell Biol.**, v. 68, p. 1166-1173. 1990.
- PITCHER, L.H. e ZILINSKAS, B.A. Overexpression of Copper/Zinc Superoxide Dismutase in the Cytosol of Transgenic Tobacco Confers Partial Resistance to Ozone-Induced Foliar Necrosis. **Plant Physiol.**, v. 110, p. 583-588. 1996.

- PRASAD, T. K., ANDERSON, M. D. e STEWART, C. R. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. **Plant Physiol.**, v. 105, p. 619-627. 1994.
- RAUTENKRANZ, A.A.F., LI, J., MACHLER, F., MARTINOIA, E. e OERTLI J.J. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel) leaves. **Plant Physiol.**, v. 106, p. 187-93. 1994.
- RIZHSKY, L., LIANG, H. e MITTLER. R. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. **Plant Physiology**. v.130, p.1143–115. 2002.
- RIZHSKY, L., LIANG, H., SHUMAN, J., SHULAEV, V., DAVLETOVA, S. e MITTLER, R. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1683-1696. 2004.
- ROCHA, I.M.A. Regulação metabólica do metabolismo da prolina em folhas de cajueiro expostas ao estresse salino. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará. p. 104. 2003.
- ROMERO-PUERTAS, M.C., CORPAS, F.J., RODRÍGUEZ-SERRANO, M., GÓMEZ, M., RÍO, L.A.D. e SANDALIO, L.M. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1346-1357. 2007.
- ROXAS, V.P., SMITH, R.K., ALLEN, E.R. e ALLEN, R.D. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 968-991. 1997.
- SALVUCCI, M. E. e CRAFTS-BRANDNER, S. J. Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 120, n. 2, p. 179-186. 2004.
- SÁNCHEZ-CASAS, P. e KLESSIG, D. F. A salicylic acid binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. **Plant Physiol**, v. 106, p. 1675–1779. 1994.
- SANMARTIN, M., DROGOUDI, P.A., LYONS, T., PATERAKI, I., BARNES, J. e KANELIS, A.A. Overexpression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. **Planta**, v. 216, p. 918–928. 2003.
- SAVIN, R. e NICOLAS, M.E. Effects of short periods of drought and high temperature on grain growth and starch accumulation of two malting barley cultivars. **J. Plant Physiol.**, v. 23, p. 201-210. 1996.
- SEKI, M., NARUSAKA, M., ABE, H., KASUGA, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., CARNINCI, P., HAYASHIZAKI, Y. e SHINOZAKI, K. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. **Plant Cell**, v. 13, p. 61-72. 2001.
- SHAO, H.B., CHU, L.Y., LU, Z.H. e KANG, C.M. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 8-14. 2008.
- SHARMA, P. e DUBEY, R.S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**. v. 46. p. 209-221. 2005.
- SHARMA, P. e DUBEY, R.S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v 46, p. 209–221. 2005.
- SHIGEOKA, S., ISHIKAWA, T., TAMOI, M., MIYAGAWA, Y., TAKEDA, T., YABUTA, Y. e YOSHIMURA, Y. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1305-1319. 2002.

- ŚLESIAK, I., LIBIK, M., KARPINSKA, B., KARPINSKI, S. e MISZALSKI, Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 1, p. 39-50. 2007.
- SMIRNOFF, N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Ann Bot.**, v. 78, p. 661-669. 1996.
- SMITH, M.W. e DOOLITTLE, R.F. A comparison of evolutionary rates of the two major kinds of superoxide dismutases. **Journal Molecular Evolution.**, v. 34, p. 175-184. 1992.
- SOARES, L.S.P. Resistência de folhas de plântulas de cajueiro anão precoce aos danos oxidativos induzidos pelos estresses salino e osmótico. (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2005, 125 p.
- SONG, X.S., HU, W.H., MAO, W.H., OGWENO, J.O., ZHOU, Y.H. e YU, J.Q. Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1082-1088. 2005.
- SREENIVASULU, N., GRIMM, B., WOBUS, U. e WESCHKE, W. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). **Physiologia Plantarum**, v. 109, p. 435-442. 2000.
- STREB, P. e FEIERABEND, J. Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rye leaves. **Bot. Acta**, v. 109, p. 125-132. 1996.
- SUZUKI, M., MIYAMOTO R., HATTORI T., NAKAMURA K. e ASAHI T. Differential regulation of the expression in transgenic tobacco of the gene for b-glucuronidase under the control of the 5%-upstream regions of two catalase genes from castor bean. **Plant Cell Physiol**, v. 36, p. 273-279. 1995.
- TAUSZ, M., SIRCELJ, H. e GRILL, D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 404, p. 1955-1962. 2004.
- VAIDYANATHAN, H., SIVAKUMAR, P., CHAKRABARTY, R. e THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) - differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, v. 165, p. 1411-1418. 2003.
- VAN, C.W., CAPIAU, K., VAN, M.M., INZÉ, D., SLOOTEN, L. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-SOD in chloroplasts. **Plant Physiol**. 112:1703-14.1996.
- VIÉGAS, R.A., SILVEIRA, J.A.G., LÍGIA M.M. SILVA; VIÉGAS, P.R.A., QUEIROZ, J.E. e ROCHA, I.M.A. Redução assimilatória de nitrato em plantas de cajueiros cultivados em meio salinizado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, n. 2, p. 2004.
- VIÉGAS, R.A., SILVEIRA, J.A.G., LIMA-JUNIOR, A.R., QUEIROZ, J.E. e FAUSTO, M.J.M. Efeitos da salinidade induzida por NaCl sobre o crescimento e acumulação de solutos inorgânicos em plantas jovens de cajueiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 5, n. 2, p. 2001.
- VRANOVÁ, E., INZÉ, D. e BREUSEGEM, V.F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1227-1236. 2002.
- WAHID, A., GELANI, S., ASHRAF, M. e FOOLAD, M.R. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 199-223. 2007
- WANG, W., VINOCCUR, B. e ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14. 2003.

WANG, Y., YING, Y., CHEN, J. e WANG, X. Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. **Plant Science**, v. 167, p. 671-677. 2004.

WASHKO, P.W., WELCH, R.W., DHARIWAL, K.R., WANG, Y. e LEVINE, M. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analysis in biological samples. **Anal. Biochem.**, v. 204, p. 1-14. 1992.

WILLEKENS, H., CHAMNONGPOL, S., DAVEY, M., SCHRAUDNER, M., LANGEBARTELS, C. e MONTAGU, V.M. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. **EMBO J.**, v. 16, p. 4806-4816. 1997.

WILLEKENS, H., INZÉ, D., MONTAGU, V.M. e CAMP, V.W. Catalases in plants. **Mol. Breed.**, v. 1, p. 207-228. 1995.

WILLEKENS, H., VILLARROEL, R., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. e VAN CAMP W. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). **FEBS Lett.**, v. 352, p. 79-83. 1994.

XIONG, L. e ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell Environment**, v. 25, n. 2, p. 131-139. 2002.

ZHONG, H.H. e MCCLUNG, C.R. The circadian clock gates expression of two *Arabidopsis* catalase genes to distinct and opposite circadian phases. **Mol. Gen. Genet.**, v. 251, p. 196-203. 1996.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Elucidar os mecanismos bioquímicos e fisiológicos relacionados com as injúrias e a proteção oxidativa em folhas de plantas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca, salino e temperaturas elevadas. Estabelecer relações entre os sistemas de eliminação de EROs com a proteção oxidativa de plantas cultivadas sob condições de múltiplos estresses abióticos.

4.1.1. Objetivos específicos

a) Avaliar os efeitos isolados e combinados dos estresses de seca, salino e temperaturas elevadas sobre parâmetros fisiológicos relacionados com a condutância estomática, *status* hídrico e integridade de membranas em folhas de plântulas de cajueiro;

b) Analisar os danos oxidativos causados pelos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca, salino e de temperaturas elevadas sobre os lipídios de membranas (TBARS) em folhas de plântulas de cajueiro;

c) Caracterizar o acúmulo de H_2O_2 induzido pelos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca, salino e temperaturas elevadas em folhas de cajueiro;

d) Caracterizar o papel das enzimas antioxidativas catalases (CAT), peroxidases de ascorbato (APX) e dismutases de superóxido (SOD) na proteção oxidativa frente aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca, salino e temperaturas elevadas em folhas de cajueiro;

e) Avaliar o papel do balanço redox do ascorbato (ascorbato total, reduzido, oxidado e estado redox, relação reduzido/oxidado) na proteção oxidativa frente aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca, salino e temperaturas elevadas em folhas de cajueiro;

f) Avaliar o papel do balanço redox da glutatona (glutatona total, reduzida, oxidada e estado redox, relação reduzida/oxidada) na proteção oxidativa frente aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca, salino e temperatura elevada em folhas de cajueiro.

5. Estratégia experimental

5.1. Estudos realizados

O presente trabalho foi realizado com base em cinco estudos independentes e seqüenciais, sendo cada estudo apresentado na forma de capítulo. Inicialmente foram realizados estudos para caracterizar os mecanismos de injúrias e de proteção oxidativa frente aos efeitos isolados dos estresses salino (CAPÍTULO I), hídrico (CAPÍTULO II) e temperaturas elevadas (CAPÍTULO III). Em seguida, foram realizados dois estudos em arranjo experimental do tipo fatorial, combinando os efeitos dos estresses salino e temperatura elevada (CAPÍTULO IV) e do estresse hídrico com temperatura elevada (CAPÍTULO V). A descrição detalhada de cada um dos experimentos mencionados acima se encontra no segmento “material e métodos” dos respectivos capítulos a seguir.

CAPÍTULO - I

PROTEÇÃO OXIDATIVA EM FOLHAS DE PLÂNTULAS DE CAJUEIRO SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO

Introdução

O estresse salino afeta importantes aspectos do metabolismo vegetal, incluindo as homeostases osmótica, iônica, hídrica e a fotossíntese (Munns e Tester, 2008). O fechamento estomático é uma das respostas mais rápidas e intensas que ocorrem em plantas submetidas à salinidade. Essa resposta estomática é, provavelmente, regulada por vias de sinalização que ocorrem na raiz, apresentando grande similaridade com aquelas associadas à sinalização sob condições de estresse hídrico (Davies et al., 2005). A restrição estomática, induzida pela salinidade e outros estresses abióticos, limita a fixação de CO_2 e a fotossíntese, podendo resultar no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $\cdot\text{OH}$, e da atividade de enzimas removedoras dessas formas tóxicas do oxigênio (Mittler, 2002; Apel e Hirt, 2004).

A limitação da fixação do CO_2 , sob condições de estresses, resulta na diminuição de redução de carbono pelo Ciclo de Calvin e no aumento da relação $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ no estroma dos cloroplastos, reduzindo a concentração do NADP^+ , o principal aceptor de elétrons fotossintéticos. Nessas condições, ocorre, rapidamente, sobrecarga de energia na cadeia transportadora de elétrons do cloroplasto e o excesso de elétrons pode ser desviado para a redução do O_2 . Nesse estado de superredução do fotossistema I (PSI), ocorre a redução parcial do O_2 , produzindo o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), pela reação de Mehler (Hus e Kao, 2003), que ativam reações em cadeia e produz mais EROs nos cloroplastos. Essas EROs são altamente reativas e, em excesso, alteram, rapidamente, o metabolismo celular, reagindo com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, causando peroxidação de lipídios, desnaturação de proteínas e mutação no DNA (Dat et al., 2000; Imlay, 2003).

Para evitar os danos oxidativos, causados pelo excesso de EROs nos diferentes componentes celulares, a célula vegetal possui mecanismos antioxidativos enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático inclui as SODs, APXs, as CATs, além das enzimas DHAR, MDHR e GR (Noctor e Foyer, 1998). As SODs são consideradas a primeira linha de defesa oxidativa da célula e catalisam a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 e O_2 (Alscher et al., 2002). As APXs são as principais peroxidases na remoção do H_2O_2 na célula (Foyer, 1996), que atuando em sincronia com as enzimas DHAR, MDHR e GR, realizam a remoção de H_2O_2 no ciclo do ascorbato-glutationa (Halliwell, 1987). As CATs possuem menor afinidade pelo H_2O_2

comparado as APXs, mas são essenciais na remoção de H_2O_2 oriundo da fotorrespiração (Foyer e Noctor, 2000).

O ascorbato e a glutatona são considerados os principais antioxidantes não enzimáticos da célula vegetal, onde estão presentes nas formas reduzida e oxidada (Noctor e Foyer, 1998). O ascorbato é considerado o mais importante substrato para redução do H_2O_2 . As APXs utilizam duas moléculas do ascorbato reduzidas, como doadoras específicas de elétrons, para catalisar a redução de uma molécula do H_2O_2 para H_2O e O_2 , e o ascorbato pode ainda interagir diretamente com $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e OH^{\cdot} (Nakano e Asada, 1987). A glutatona é um tripeptídeo (γ -glu-cys-gly) que representa a principal forma de grupos SH não protéico da célula. No metabolismo vegetal, essa molécula está relacionada com a regulação da absorção e assimilação do enxofre no tecido radicular, além de possuir papel central na proteção antioxidante, tamponamento redox celular e na regulação da expressão de genes de defesa (Noctor e Foyer, 1998; Gomez et al., 2004).

Diversos estudos têm demonstrado o papel dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos na proteção de danos oxidativos induzidos pelo estresse salino (Mittova et al., 2003; Kwon et al., 2003; Yadav et al., 2005). Vaidyanathan et al., (2003), trabalhando com dois cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.), diferindo na resistência à salinidade, observaram que o cultivar resistente apresentou menor peroxidação de lipídios associada à maior atividade das enzimas SOD, CAT e GR. Cultivares de milho (*Setaria italica*), contrastantes na resistência à salinidade, apresentaram resultados similares, a resistência ao sal foi associada à melhor integridade de membranas e maior expressão e atividade das enzimas SOD e APX (Sreenivasulu et al., 2000). Em algodão (*Gossypium hirsutum*), foi demonstrado que a resistência à salinidade está relacionada com a eficiência fotossintética e maior indução do sistema antioxidante SOD, GR, POD (Meloni et al., 2003).

No presente estudo, foram avaliadas as alterações induzidas pelo estresse salino sobre variáveis fisiológicas relacionadas com a condutância estomática, *status* hídrico e toxicidade iônica em plântulas de cajueiro, visando associar essas alterações com a produção de H_2O_2 e os mecanismos de injúria e proteção oxidativa na espécie. O papel da defesa oxidativa, enzimática e não enzimática, frente ao estresse salino na espécie é discutido.

Material e métodos

Material vegetal e aplicação do tratamento salino

Sementes (castanhas) de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.), clone CCP 06, fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CNPAT), foram submetidas à esterilização com hipoclorito de sódio 5% (v/v) e semeadas em vasos de 0,8 L contendo vermiculita, sob condições de casa de vegetação. Durante as fases de germinação e crescimento inicial, a umidade do substrato foi mantida na capacidade de campo por irrigações freqüentes com água destilada e após 35 dias do plantio, plântulas homogêneas, apresentando estágio fisiológico de 8 folhas expandidas, foram utilizadas no experimento. As plântulas foram submetidas a concentrações crescentes de NaCl (0, 50, 100, 150 e 200 mM), via solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) diluída 1/4, sob condições naturais de casa de vegetação. Concentrações superiores a 50 mM foram fracionadas em sub-doses de 50 mM e aplicadas de forma gradativa, em intervalos de 24 horas, para evitar choque osmótico nas plântulas. Após atingir o nível mais elevado do sal, 200 mM ao 4º dia, as plântulas passaram a ser irrigadas a cada três dias com solução sem NaCl ou adicionada dos respectivos tratamentos. Durante o experimento, foram realizadas medidas diárias de transpiração e resistência estomática. Esse procedimento auxiliou na determinação do tempo de duração do ensaio, que foi adotado com base na redução de 80% ou mais, da transpiração das plântulas expostas a 200 mM do sal, por mais de cinco dias. Com base nesse critério, o experimento teve duração de 15 dias. Ao término do ensaio, foram coletados discos foliares para determinar o conteúdo relativo de água e dano de membrana, e em seguida as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado conforme Fidalgo et al. (2004). Ao final do experimento, foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro) e a massa fresca (MF) determinada imediatamente. Em seguida, os discos foram imersos em 30 ml de água deionizada por 8 h, em placas de petri, e após breve secagem dos discos em papel toalha, para remover o excesso de água, foi determinada a massa túrgida (MT). A massa seca (MS) foi determinada após secagem dos discos a 70°C, durante 48 h em estufa, e o CRA estimado pela seguinte relação: $[(MT - MS)/(MF - MS)] \times 100$.

Taxa de transpiração e resistência estomática

Após o início de aplicação do tratamento salino, a taxa de transpiração e a resistência estomática das plântulas foram determinadas diariamente, com auxílio de um porômetro portátil modelo LI-1600 (USA). Durante o experimento esse procedimento foi realizado sempre às 10:00 h, horário em que as condições ambientais apresentam pouca variação. A duração do ensaio foi determinada pela intensidade de restrição estomática imposta pelo tratamento salino. Com base nesse critério, as plântulas foram coletadas após 15 dias de tratamento, quando a transpiração das

plântulas expostas a 200 mM apresentava redução de 80%, comparado ao controle, por mais cinco dias.

Conteúdo de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinado conforme Cheeseman et al., (2006). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas na presença de N_2 líquido até obtenção de farinha, seguido da adição de 0,75 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,4, contendo KCN 5 mM e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 13.000 x g por 20 min a 4°C e alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 0,9 ml de meio de reação contendo 100 μ M de $FeSO_4$, 250 μ M de $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM de H_2SO_4 , 100 μ M de alaranjado de xilenol e 99 mM de sorbitol. A mistura foi incubada a 25 °C por 30 min e em seguida realizadas leituras de absorbância a 560 nm. As concentrações de peróxido de hidrogênio foram obtidas a partir de curva padrão, utilizando H_2O_2 , e os dados expressos em μ mol g^{-1} MF.

Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme Heath e Packer (1968). Amostras (0,1 g) de folhas frescas foram macerados em almofariz na presença de N_2 líquido, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 12.000 x g, durante 15 min a 4 °C, e 0,5 ml do sobrenadante foram adicionados a 2,0 ml do meio de reação contendo TCA 20% (p/v) e TBA 0,5% (p/v), em tubos hermeticamente fechados. A reação foi aquecida em banho maria a 95 °C, durante 1 h, e em seguida foi interrompida em banho de gelo. Após 30 min a 25 °C, foram realizadas leituras de absorbância a 532 e 660 nm, e depois de subtraídas as absorbâncias obtidas a 660 das obtidas a 532 nm, o conteúdo de TBARS foi estimado utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 $mM^{-1} cm^{-1}$ e expresso em $nmol g^{-1}$ MF.

Conteúdos de sódio e cloreto

Os conteúdo de Na^+ foi determinados por fotometria de chama e o de Cl^- por titulação, conforme Viégas et al, (2001). Para extração do Na^+ , 50 mg de tecido vegetal foram acondicionados em tubos hermeticamente fechados, contendo 10 mL de água deionizada, e incubados em banho maria a 100 °C durante 1 h. Após extração, o sobrenadante foi filtrado e as leituras realizadas em fotômetro de chama. O íon Cl^- foi extraído a partir de 200 mg de tecido vegetal, adicionado de 25 mL de água deionizada em tubos hermeticamente fechados e incubados em banho maria a 100 °C, durante 1 h. Em seguida, o extrato foi filtrado e 20 mL da fase límpida foi titulado com $AgNO_3$ (28 mM), usando K_2CrO_4 5% (p/v) como indicador.

Conteúdos de glutatona total, reduzida e oxidada

Os conteúdos de glutatona total (GSH+GSSG) e das formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram determinados conforme Griffith (1980). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram

maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 5% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min a 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação. Para determinação da GSH alíquotas de 0,2 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 2,6 ml de tampão fosfato de sódio 150 mM (pH 7,4), 1 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) e 0,2 ml de 5,5'-ditio-bis 2-ácido-nitrobenzóico (DTNB) 30 mM, em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). O conteúdo de glutatona total (GSH + GSSG) foi determinado pela adição de 0,2 ml do sobrenadante seguido da adição de 1,6 ml de tampão fosfato 150 mM (pH 7,4), contendo 1 unidade de GR, 1,0 ml de NADPH 0,15 mM, 1,0 ml de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) e 0,2 ml de DTNB 30 mM, em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). Em seguida a reação foi acondicionada em banho maria a 30°C, durante 10min. Ao final, foram realizadas leituras de absorvância a 412 nm e os conteúdos de GSH e GSH + GSSG estimados com base em curva padrão, de GSH, e expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. O conteúdo da GSSG foi obtido pela subtração da glutatona reduzida da total.

Conteúdos de ascorbato total, reduzido e oxidado

Os conteúdos de ascorbato total (ASA+DHA), e das formas reduzida (ASA), e oxidada (DHA) foram determinados conforme Kampfenkel et al., (1995). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min a 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação. Para o ascorbato reduzido alíquotas de 0,1 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,3 ml de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,4), 0,1 ml de água destilada, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H₂PO₄ 45%, 0,4 ml de biperidil 4% e 0,2 ml de FeCl₃. O conteúdo de ascorbato total foi determinado pela adição de 0,1 ml do extrato ao meio de reação contendo 0,1 ml de DTT 10 mM (em tampão fosfato 200 mM), 0,2 ml e tampão fosfato de potássio 200mM (pH 7,4), 0,1 ml de N-etilmaleiamida 0,5%, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H₂PO₄ 45%, 0,4 ml de biperidil 4% e 0,2 ml de FeCl₃. A reação foi acondicionada em banho maria a 40°C, durante 30 min, e em seguida foram realizadas leituras de absorvância a 525 nm. Os conteúdos do ascorbato total (ASA+DHA) e reduzido (ASA) foram estimados com base em curva padrão, utilizando L – ascorbato, e expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. O conteúdo do DHA foi obtido pela subtração do ascorbato reduzido do total.

Extração de proteínas

A extração de proteína foi realizada conforme Zimmermam et al., (2006), com modificações. Amostra de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido seguido da adição de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), contendo 30 mM de DTT, 20% de glicerol e 3% de PEG-6000. Para determinação da atividade das enzimas peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido, o pH do tampão foi alterado para 7,0 e o DTT foi substituído por ascorbato 1 mM. Após a extração, o extrato foi centrifugado a 14.000 x g durante 30 min, a 4 °C. O conteúdo de proteínas

solúveis foi determinado conforme Bradford (1976) e estimado com base em curva padrão, utilizando BSA.

Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS)

Para as PAGE-SDS alíquota de 20 µL de extrato protéico foram misturas a 20 µL do tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol, SDS 10% e azul de boromofenol) e 20 µL da mistura foi aplicado em cada poço. Os géis apresentavam a seguinte constituição: 12,5% (main gel) e 5% (stacking gel), e as eletroforeses foram realizadas a 125 V, 20 mA e 10 W, por cada gel, usando o tampão de corrida (Tris 25 mM/Glicina 192 mM, pH 8,3 e SDS 10%). Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com o *Comassie brilliant blue* R-250 0,025%, em ácido acético 10% e metanol 40%, durante 2 h. Em seguida os géis foram descorados em ácido acético 10% e metanol 40% (Laemmli, 1970).

Atividade enzimática

A atividade da peroxidase de ascorbato (APX; EC: 1.11.1.1) foi determinada conforme método descrito por Nakano e Asada (1981). Alíquotas de 0,1 ml de extrato protéico foram adicionadas ao meio de reação composto de 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo 0,5 mM de ácido ascórbico. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ (30 mM) ao meio de reação e acompanhada pelo decaimento da absorbância a 290 nm em espectrofotômetro durante 300 seg, com leitura sucessivas em intervalos de 30 seg. A atividade da APX foi estimada utilizando o coeficiente e de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ para o ascorbato, em 290 nm, e expressa como µmol AsA g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da catalase (CAT; EC: 1.11.1.6) foi determinada conforme Havir e McHale, (1987). Alíquotas de 0,05 ml de extrato protéico foram adicionadas a 2,95 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), contendo H₂O₂ (20 mM). A reação ocorreu a 30°C e foi acompanhado pelo decaimento da absorbância a 240 nm durante 300 seg, com leituras sucessivas a cada 30 seg. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ para o H₂O₂, em 240 nm, e expressa em nmol H₂O₂ g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da dismutase de superóxido (SOD; EC: 1.15.1.1) foi determinada conforme metodologia descrita por Gianopolitis e Ries (1977). Alíquotas de 0,1 ml do extrato protéico foram transferidas para meio de reação, em tubos protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 µM de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM de riboflavina e rápida transferência dos tubos, sem a proteção da luz, para câmara iluminada por lâmpada de 30 wats (30 µmol de fótons m⁻² s⁻¹), durante 6 minutos. A reação foi interrompida pelo desligamento da luz, os tubos foram revestidos por filme escuro e realizadas leituras a 540nm. A atividade foi estimada com base na inibição da redução do NBT, definindo-se uma unidade de atividade como a quantidade da enzima necessária para inibir 50% da fotoredução (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade foi expressa em U.A. g⁻¹ MF min⁻¹.

Zimograma e identificação das isoenzimas da dismutase do superóxido (SOD)

Inicialmente, as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida 10% sob condição nativa (PAGE nativa). Alíquotas ($\pm 10 \mu\text{l}$) de extrato protéico foram misturadas com tampão de aplicação (Tris 25 mM/glicina 190 mM, pH 8,3), na proporção 1/1 (v/v), e submetidas à eletroforese (125 V, 20 mA e 10 W por gel). Após a separação das proteínas, os géis foram revelados para atividade da SOD conforme Beauchamp e Fridovich (1971). Inicialmente foram incubados em 50 ml de NBT 2 mM por 15 min, rapidamente lavados com água destilada e novamente incubados, na ausência da luz, em 50 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), contendo TEMED 28 mM e riboflavina (0,1 mg/ml), por 15 min. Em seguida, os géis foram lavados com água destilada e expostos à luz, em caixa boxe contendo lâmpada fluorescente de 30 wats ($30 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para indução da reação fotoquímica. Após revelação das bandas acromáticas a reação foi interrompida pelo desligamento da luz e sucessivas lavagens dos géis com água. A diferenciação das isoformas da SOD foi realizada pela prévia incubação dos géis por 15 min em tampão fosfato de potássio contendo H_2O_2 (5 mM) ou KCN (2 mM), conforme Martinez et al., (2001). As isoformas Cu/Zn-SOD e Fe-SOD são sensíveis ao H_2O_2 , a Fe-SOD é resistente ao cianeto, enquanto a Mn-SOD é resistente ao H_2O_2 e ao CN^- (Scandalios, 1993). Após a pré-incubação para inibição específica das isoformas os géis foram revelados conforme descrito acima.

Zimograma da catalase (CAT)

Após a separação das proteínas em gel de poliacrilamida a 7,5% os géis foram revelados para atividade de catalases conforme Thorup et al., (1961). Alíquotas (50 μl) de extrato protéico foram misturadas ao tampão de aplicação (Tris 25 mM/glicina 190 mM, pH 8,3), na proporção 1/1 (v/v) e 20 μl da mistura foi submetido à PAGE nativa (125 V, 20 mA e 10 W por gel). Após a eletroforese os géis foram pré-incubados em H_2O_2 0,3% (p/v) por 20 min, em agitação suave, seguido de rápida lavagem com água destilada e imersão em solução de FeCl_3 0,5% (p/v) e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ 0,5% (p/v). Após o surgimento das bandas acromáticas sobre o fundo verde dos géis a reação foi interrompida por lavagens com água destilada. As soluções de FeCl_3 e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ foram preparadas isoladamente, mantidas no escuro, e misturadas somente no momento da aplicação sobre os géis.

Desenho do peptídeo sintético para o reconhecimento das isoformas da CAT

O desenho do peptídeo foi realizado com base em uma região conservada de aminoácido de CATs de angiospermas, obtida pelo alinhamento de seqüências primárias dessa proteína disponível no *GenBank* (NCBI). O objetivo foi produzir um peptídeo sintético capaz de induzir a produção de anticorpos que reconhecem as diferentes isoformas de CATs presentes em plantas de *Anacardium occidentale*. Após o alinhamento das seqüências das isoformas de CATs, proveniente, de espécies mono e dicotiledôneas, foi identificada uma região conservada de 13 resíduos de a.a. H_2N -RGFAVKFYTREGN-COOH, com as seguintes características:

- 3 aminoácidos hidrofóbicos: 2 resíduos de Fenilalanina e 1 de Tirosina;

- A análise no programa BLASTp (Altschul et al., 1997), não revelou similaridade com outras seqüências primárias e mostrou divergência com a estrutura primária de CATs de origem animal;
- A análise do perfil de antigenicidade, pela ferramenta “*Antigen Profiler*” (openbiosystems.com), indicou excelentes características antigênicas;

O peptídeo foi sintetizado pela empresa Invitrogen e gentilmente cedido pelo Dr. José Hélio Costa, do Departamento de Bioquímica/UFC.

Preparação de Anticorpos

Para a produção dos anticorpos, o peptídeo sintético (7 mg) da CAT foi dissolvido em 1,5 mL de tampão fosfato de potássio (50 mM e pH 7,0) mais 1,5 mL de adjuvante de Freud (Sigma-Aldrich). A solução foi homogeneizada até formação de uma emulsão e aplicada em duas doses (1,5 mL), via intramuscular, na região interna das coxas de um coelho albino da raça Nova Zelândia, de 4 meses de idade. Após 15 dias, foram coletadas amostras de sangue dos animais e realizada uma nova aplicação do peptídeo, e após mais duas semanas procedeu-se outra coleta de sangue. Após cada coleta o sangue foi submetido à coagulação, incubado a 37 °C durante 30 min, e o soro foi separado do coágulo por centrifugação a 1000 x g, por 20 min, e estocado a -80 °C.

Western Blot

Após as eletroforeses, a transferência eletroforética das proteínas para membrana de nitrocelulose foi realizada conforme Towbin et al., (1979), em unidade de transferência Techwave (Sigma-Aldrich), utilizando tampão Tris 25 mM/glicina 192 mM/metanol 20%, pH 8,3. Após a transferência, a membrana foi mergulhada numa solução de Ponceau S (200 mg Ponceau S / 3 g TCA / 3 g ácido sulfossalicílico / 100 ml), para verificar a eficiência do processo e a localização do marcador de massa molecular. Os sítios de ligação para as imunoglobulinas na membrana foram bloqueados pela imersão em solução bloqueadora, tampão fosfato de sódio 100 mM / NaCl 130 mM, pH 7,4 contendo 10% de leite em pó desnatado Molico, e submetidas a agitação suave por 6 h, a 4 °C. Após bloqueio, a solução foi descartada e a membrana incubada com o anticorpo específico diluído 1:500, preparado na solução bloqueadora, e mantida sob agitação suave por 1 h. Após cinco lavagens de 5 min em 50 ml de tampão fosfato 100 mM/NaCl 130 mM, pH 7,4, a membrana foi incubada por mais 1h, sob agitação lenta, com IgG anti-cabra diluída 1:5000, conjugada com a enzima fosfatase alcalina, em solução bloqueadora. Após 5 lavagens idênticas às anteriores, a membrana foi corada pela imersão em 10 mL de água destilada contendo uma pastilha dissolvida do substrato 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT). Este substrato é convertido pela fosfatase num composto de cor escura, que revela a presença e a localização das proteínas de interesse. Após as bandas atingirem a intensidade desejada a membrana foi lavada em água destilada para parar a reação. Após detecção das bandas, a massa molecular das isoformas da

CAT foi estimada utilizando o programa para análise de géis PhotoCap, com base nos marcadores de massa molecular padrão.

Delineamento estatístico e análise dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos, concentrações de NaCl na solução nutritiva, 0 (controle), 50, 100, 150 e 200 mM. Cada tratamento foi representado por três repetições, num total de 15 parcelas experimentais. Os dados foram submetidos ao teste F a 0,05 de significância, por análise de variância, e as médias das variáveis submetidas ao teste de Tukey no mesmo nível de probabilidade.

Resultados

Respostas fisiológicas de plântulas de cajueiro submetidas ao estresse salino

No presente estudo plântulas de cajueiro foram submetidas a concentrações crescentes de NaCl, via solução nutritiva, durante 15 dias. O aumento da concentração do sal no meio externo provocou reduções significativas da transpiração das plântulas, que ocorreu associada a um intenso aumento da resistência estomática (Figuras 4A e B). A transpiração das plântulas expostas a 50 mM de NaCl foi reduzida em 50%, e alcançou restrição máxima de 86%, na presença de 200 mM do sal ao final do experimento. A resistência estomática das plântulas foi aumentada em 100% na presença de 50 e 100mM. Nas plântulas expostas a 150 e 200 mM do sal a resistência estomática foi aumentada 4,5 e 10,9 vezes, respectivamente (Figura 4B).

A produção de massa seca de folhas das plântulas submetidas ao estresse salino foi severamente reduzida. A redução da massa seca de folhas apresentou correlação inversa significativa ($p < 0,05$) com o incremento da resistência estomática (Figura 4D). O aumento de 100% da resistência estomática, induzido pelos tratamentos de 50 e 100 mM, ocorreu associado com uma redução média de 20% na massa seca foliar. Nas plântulas expostas aos tratamentos de 150 e 200 mM de NaCl, apresentando aumento da resistência estomática de 4,5 e 10,9 vezes, respectivamente, a redução de massa seca foliar foi da ordem de 30 e 40%, respectivamente. O conteúdo relativo de água foliar das plântulas apresentou valores médios acima de 90% e não foi afetado pelo tratamento salino (Figura 4C).

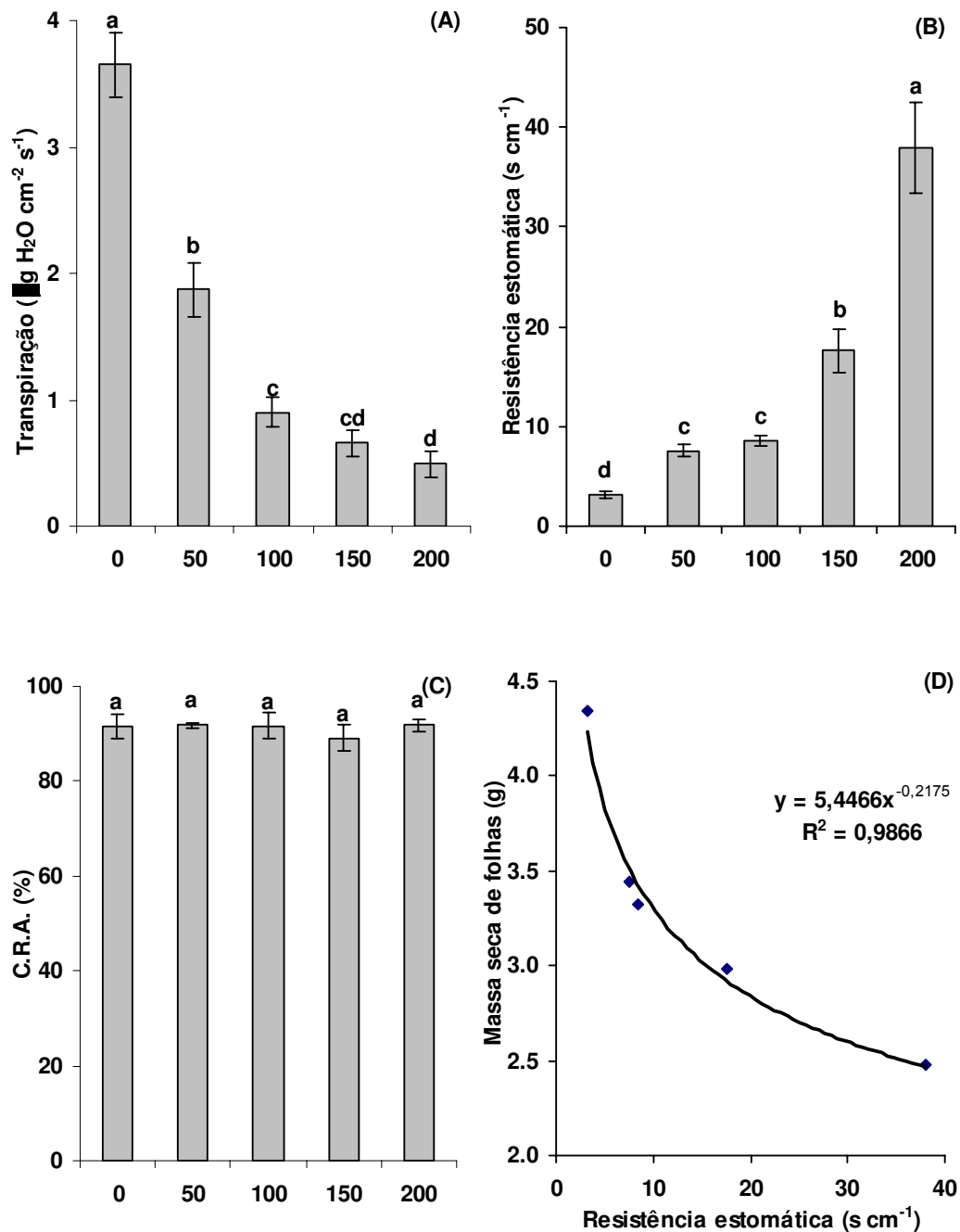


Figura 4 (A) Transpiração, (B) resistência estomática, (C) conteúdo relativo de água e (D) correlação da massa seca de folhas com a resistência estomática em plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl (50, 100, 150 e 200 mM), durante 15 dias. Os valores são médias de três repetições obtidas de dois experimentos independentes.

Alterações oxidativas e acúmulo de íons em plântulas de cajueiro submetidas ao estresse salino

O tratamento salino resultou em intenso acúmulo dos íons salinos sódio e cloreto, em tecidos de folhas, após 15 dias de tratamento (Figuras 5A e B). O conteúdo de sódio foliar das plântulas submetidas às concentrações de 50 e 100 mM de NaCl foi aumentado em 3 vezes, enquanto que nas plântulas submetidas a 150 e 200 mM do sal o teor desse íon apresentou acréscimo de 4,5 vezes, em relação ao controle (Figura 5A). O conteúdo de cloreto em folhas das plântulas submetidas aos tratamentos de 50 e 100 mM de NaCl foi aumentado 2 vezes, enquanto que nas plântulas expostas às concentrações de 150 e 200 mM, esse aumento foi de 3 vezes, comparado ao controle (Figura 5B).

O incremento da concentração de NaCl na solução nutritiva reduziu o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foliar (Figuras 5C). Nas plântulas submetidas aos tratamentos salinos, durante 15 dias, o conteúdo de TBARS foi reduzido em mais de 20%, comparado ao controle experimental. O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas das plântulas submetidas aos estresses salinos foi similar e não diferiu do controle, após 15 dias de tratamento (Figura 5D).

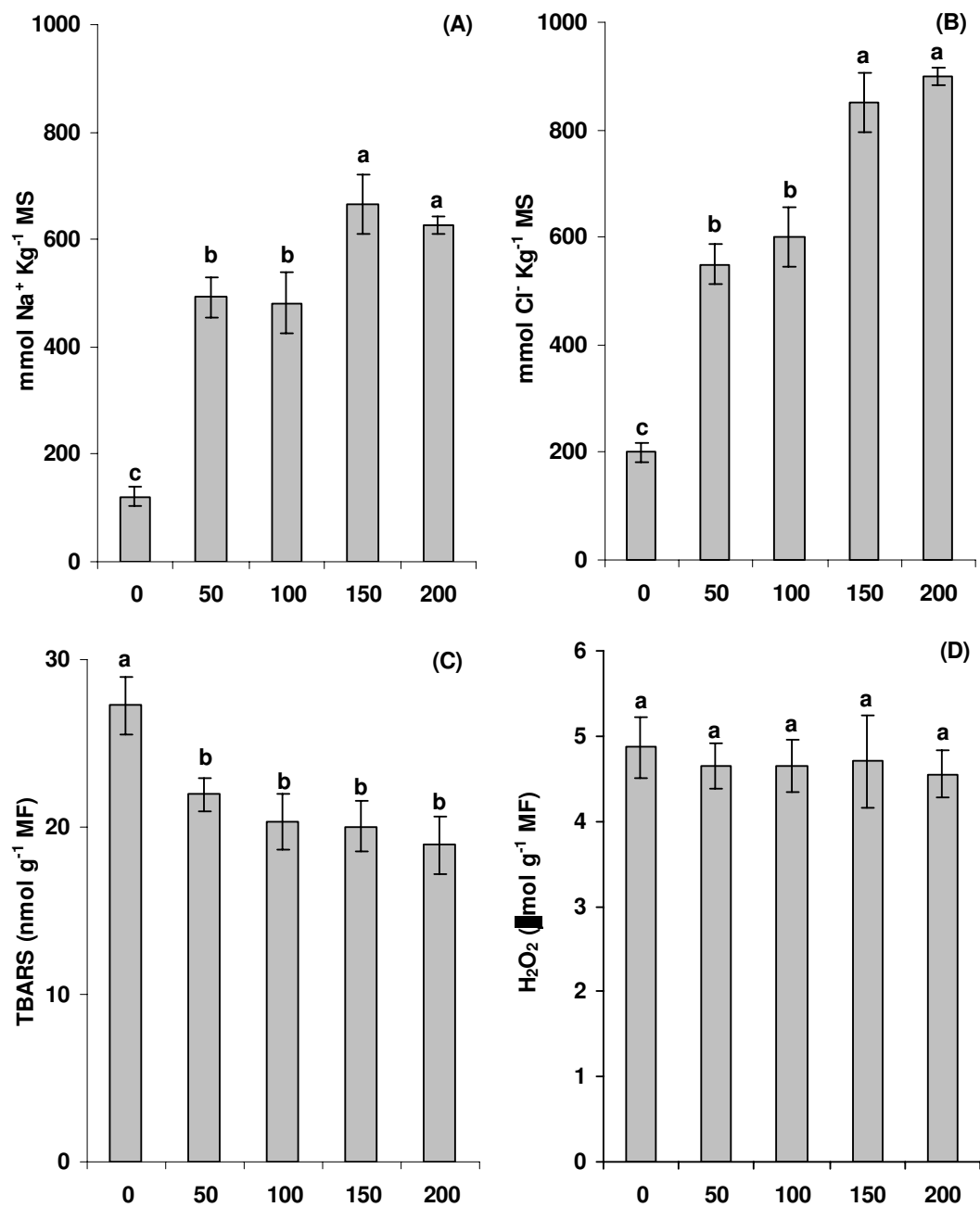


Figura 5 (A) Conteúdos de sódio, (B) cloreto, (C) TBARS e (D) peróxido de hidrogênio em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl (50, 100, 150 e 200 mM), durante 15 dias. Os valores são médias de três repetições, obtidas de dois experimentos independentes.

Mudanças na atividade de enzimas oxidativas em plântulas de cajueiro submetidas ao estresse salino

O tratamento salino não alterou o conteúdo de proteína solúvel de folhas, no entanto, afetou diferentemente a atividade das enzimas antioxidativas dismutases de superóxido (SOD), peroxidases de ascorbato (APX) e catalases (CAT) (Figuras 6 e 7). A atividade da SOD não foi alterada, a atividade da CAT apresentou dupla resposta, indução e redução com o aumento do sal, enquanto a atividade da APX foi reduzida (Figura 6). A atividade total da SOD no gel de poliacrilamida revelou a presença de cinco isoformas dessa proteína, que após inibição específica por KCN ou H₂O₂ foram caracterizadas como duas Fe-SOD e três Cu-Zn-SOD, todas com atividade aparentemente constante (Figuras 7B).

A atividade da CAT foi fortemente modulada pelo NaCl e apresentou padrão de resposta duplo, ou seja, intenso aumento até 100 mM, seguido de incrementos relativamente menores a partir de 150 mM (Figuras 6C e 7C). Na presença de 50 e 100 mM do sal, a atividade da CAT foi aumentada cerca de 1,76 e 4,7 vezes, respectivamente, enquanto que na presença de 150 e 200 mM o aumento foi de apenas 3,7 vezes e de 30%, respectivamente, após 15 dias de tratamento (Figuras 6C). A análise qualitativa da atividade da CAT, por zimograma, revelou padrão compatível com a atividade total, com aumento de regiões descoloridas no gel até 100 mM, indicando atividade e conseqüente redução a partir dessa concentração (Figura 7C). O estudo das isoformas da CAT por imunoblot identificou três CAT, com subunidades de 68, 62 e 58 kDa, sendo a modulação da expressão da isoforma com subunidades de 68 kDa, por NaCl, compatível com a atividade total (Figura 7D).

A atividade da APX foi severamente reduzida pelo aumento da concentração de NaCl (Figura 6D). Nas plântulas submetidas à concentração mais baixa de sal (50 mM) a atividade da APX não foi afetada. Entretanto, naquelas expostas aos tratamentos de 100, 150 e 200 mM de NaCl foram observadas reduções significativas de 18, 37 e 48%, da atividade da APX, em relação ao controle, após 15 dias de tratamento (Figura 6D).

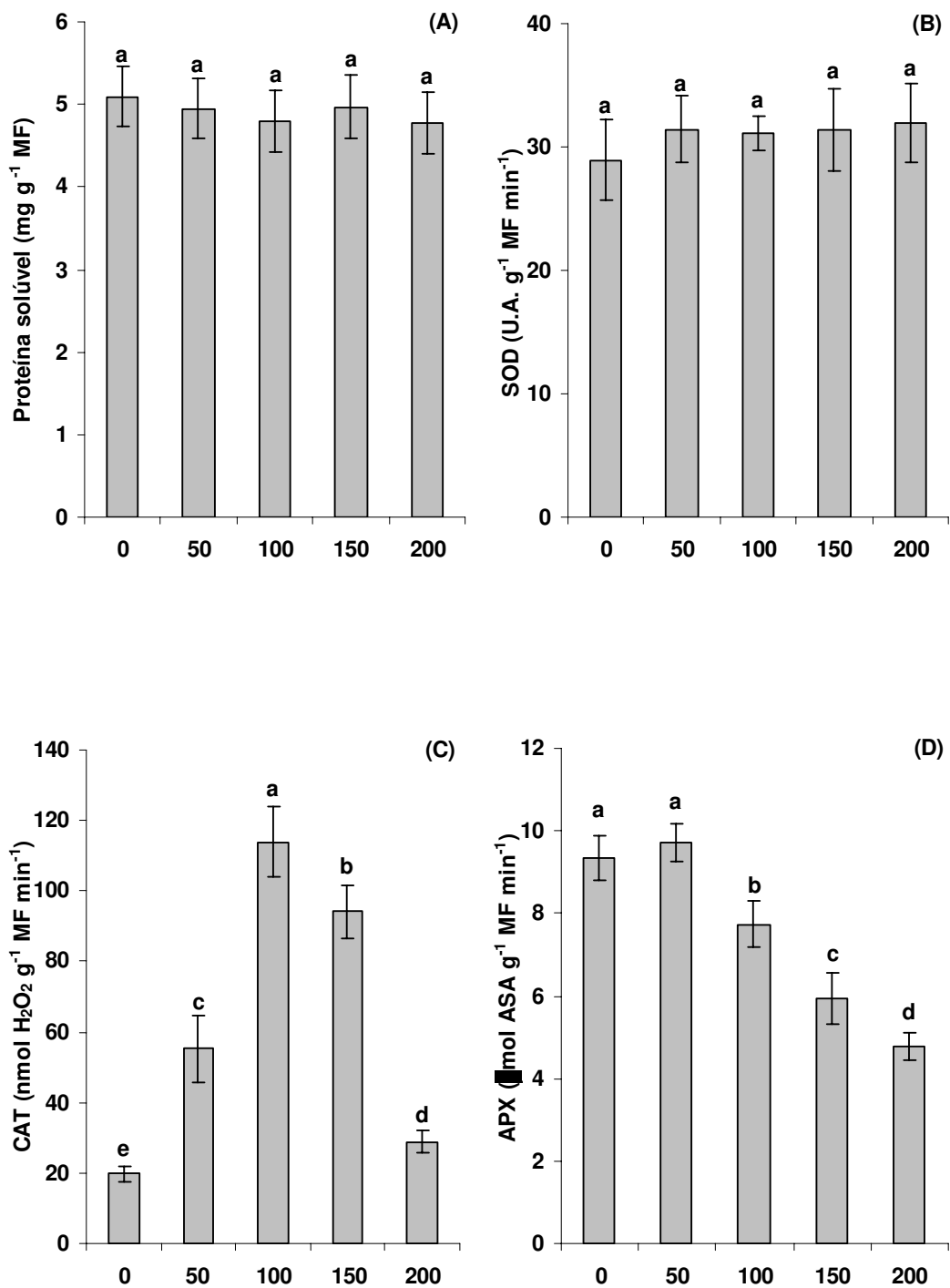


Figura 6 (A) Conteúdo de proteína solúvel e atividade das enzimas oxidativas (B) dismutases de superóxido, (C) catalases e (D) peroxidases de ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl (50, 100, 150 e 200 mM), durante 15 dias. Os valores são médias de três repetições obtidas de dois experimentos independentes.

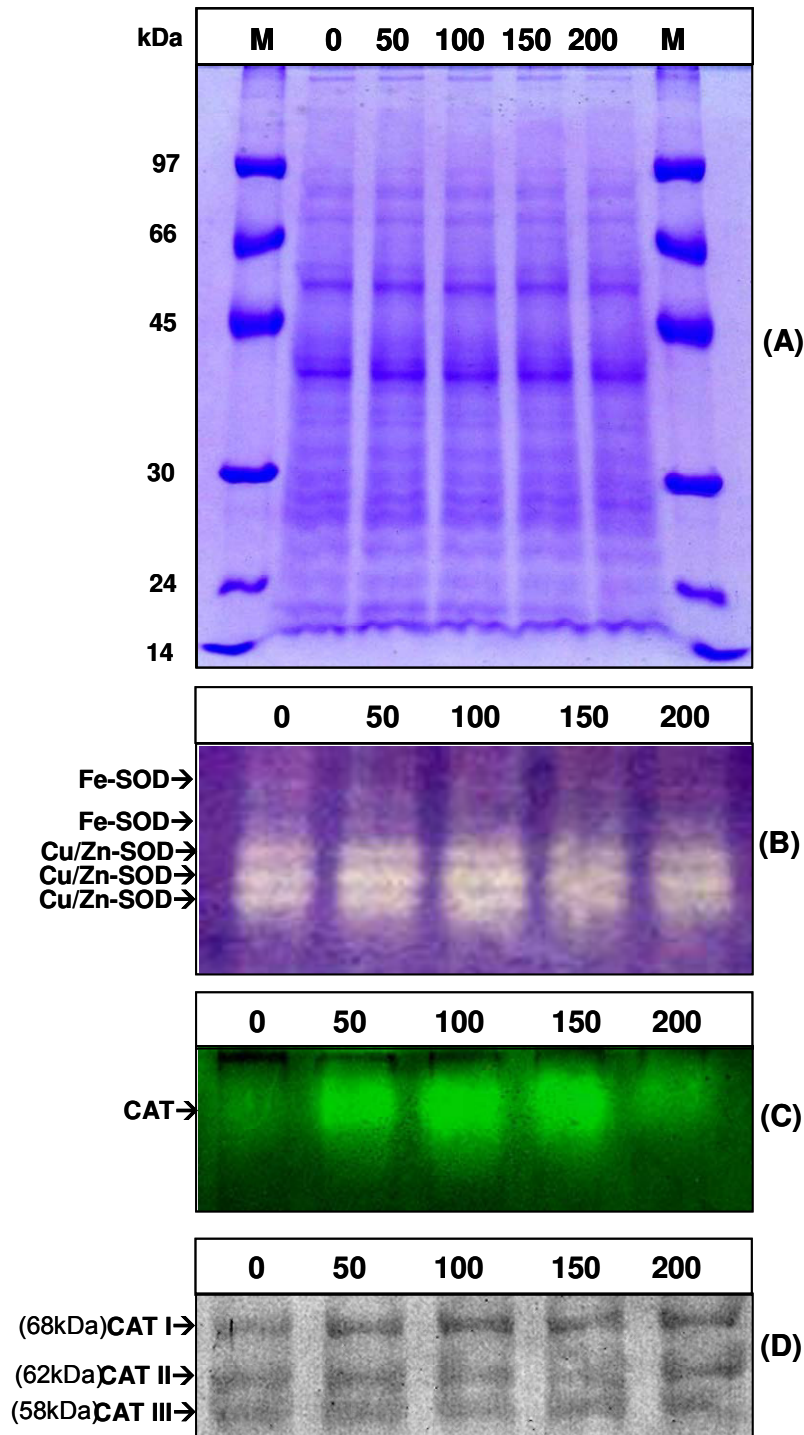


Figura 7 (A) SDS-PAGE, zimograma para (B) SODs e (C) CATs e (D) Imunoblot para CATs de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl (50, 100, 150 e 200 mM), durante 15 dias. O zimograma da (B) SOD mostra as diferentes isoformas dessa enzima após inibição específica com H_2O_2 ou KCN. Em todas as eletroforeses foram aplicados 20 μ l de extrato protéico em cada poço, ± 40 μ g de proteína, exceto para o zimograma da SOD que foram aplicados 10 μ l (± 20 μ g de proteína).

Mudanças no estado redox do ascorbato e da glutathiona em plântulas de cajueiro submetidas ao estresse salino

Os conteúdos e o estado redox dos antioxidantes ascorbato e glutathiona apresentaram mudanças significativas em respostas ao estresse salino (Tabelas 1 e 2). O conteúdo de ascorbato total (ASA+DHA) não foi alterado pelo tratamento salino. O conteúdo do ascorbato reduzido foi 35% menor nas plântulas submetidas à concentração de 200 mM de NaCl, enquanto a forma oxidada desse antioxidante foi 45% maior nas folhas das plântulas expostas a 150 e 200 mM do sal, após 15 dias de tratamento. O balanço redox foliar do ascorbato (reduzido/oxidado) foi de aproximadamente 1 nas plântulas cultivadas na ausência do sal (controle), e não foi alterada pelos tratamentos de 50 e 100 mM do sal. Entretanto, nas plântulas cultivadas na presença de 150 e 200 mM de NaCl, o balanço redox do ascorbato foi reduzido em 50%, após 15 dias de tratamento (Tabela 1).

O conteúdo da glutathiona total (GSH+GSSG) não foi alterado pelo tratamento salino (Tabela 2). No entanto, o conteúdo da GSH no tecido foliar apresentou sensível aumento induzido pelo incremento do NaCl na solução nutritiva. Nas plântulas submetidas a concentrações de 100, 150 e 200 mM do sal, o conteúdo da GSH foi 20% maior, comparado às plântulas cultivadas na ausência (controle) ou tratadas com 50 mM. O conteúdo de GSSG foi reduzido em 27 e 45% nas plântulas cultivadas na presença de 150 e 200 mM de NaCl, respectivamente (Tabela 2). O balanço redox da glutathiona nas plântulas controle ou cultivadas na presença de 50 e 100 mM de NaCl foi de aproximadamente 2, enquanto que nas plântulas expostas a 150 e 200 mM do sal essa relação foi de 3,30 e 4,56, aumentando em 63 e 126%, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 1 Conteúdos de ascorbato total (ASA+DHA), reduzido (ASA), oxidado (DHA) e balanço do estado redox do ascorbato (ASA/DHA) em plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (Controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl, durante 15 dias

Tratamento (mM)	ASA+DHA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	ASA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	DHA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	ASA/DHA (%)
0	6,84a	3,66a	3,18b	1,05a (100)
50	6,40a	3,14a	3,26b	0,96a (91)
100	6,31a	3,17a	3,14b	1,00a (95)
150	7,70a	3,15a	4,75a	0,66b (88)
200	6,99a	2,31b	4,68a	0,49b (53)

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey

Tabela 2 Conteúdos da glutatona total (GSH+GSSG), reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e balanço do estado redox da glutatona (GSH/GSSG) em plântulas de cajueiro cultivadas na ausência (Controle) ou submetidas a concentrações crescentes de NaCl, durante 15 dias

Tratamento (mM)	GSH+GSSG ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	GSH ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	GSSG ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	GSH/GSSG (%)
0	1,41a	0,926c	0,458a	2,02c (100)
50	1,39a	0,912c	0,403a	2,26c (109)
100	1,43a	1,097a	0,403a	2,55c (126)
150	1,43a	1,105a	0,334b	3,30b (163)
200	1,39a	1,145a	0,251c	4,56a (225)

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey

Discussão

Em plantas submetidas ao estresse salino, o fechamento estomático é considerado uma das alterações metabólicas mais rápidas, ocorrendo no intervalo de horas ou dias, em função da redução do potencial hídrico solo (Yeo, 1999; Munns e Tester, 2008). No presente estudo, plântulas de cajueiro submetidas a concentrações crescentes de NaCl, durante 15 dias, apresentaram intenso fechamento estomático. Nas plântulas expostas a um nível moderado de sal (50 mM) ocorreu redução de 50% da transpiração, e naquelas submetidas a 200 mM a redução foi de 80%. Associada à redução da transpiração, ocorreu aumento cerca de 10 vezes da resistência estomática nas plântulas expostas a 200 mM do sal. A restrição estomática, induzida pela salinidade, resulta na redução da assimilação de CO₂ em diferentes espécies, reduzindo a produção de massa seca, com reflexos diretos na produtividade das culturas (Netondo et al., 2004; García-Sánchez e Syvertsen, 2006).

O conteúdo relativo de água foliar das plântulas não foi afetado pelo estresse salino, indicando alta capacidade da espécie em manter o *status* hídrico do tecido foliar, sob condições extremas de salinidade. Esse controle da hidratação dos tecidos pode ser atribuído à redução da transpiração associado ao intenso aumento da resistência estomática, evitando a perda de água. Esse é um mecanismo comum em plantas submetidas a condições que resultam em restrição hídrica no solo, como seca e salinidade (Munns, 2002). No entanto, esse mecanismo, que restringe a perda de água sob condições adversas, afeta negativamente a produtividade das espécies (Dionísio-Sese e Tobita, 2000). A forte redução da produção de massa seca foliar observada aqui, 40% na presença de 200 mM, apresentou alta correlação com a resistência estomática das plântulas (Figura 4).

A restrição do crescimento e da produtividade das plantas é um dos principais efeitos da salinidade sobre o desempenho das culturas e está associado com a restrição, tanto estomática quanto não estomática, do processo fotossintético (Dionísio-Sese e Tobita, 2000). Estudo recente avaliando as trocas gasosas de plântulas de cajueiro em função da variação do déficit de pressão de vapor, densidade do fluxo de fótons fotossintéticos e temperatura, demonstrou que existe correlação direta da assimilação de CO₂ com condutância estomática em plantas jovens da espécie (Souza et al., 2005). Dessa forma, a redução da produção de

massa seca foliar, observada no presente estudo, pode ser atribuída à severa restrição estomática induzida pela salinidade, ao longo dos 15 dias de tratamento.

As plântulas de cajueiro submetidas à salinidade apresentaram intenso acúmulo dos íons salinos Na^+ e Cl^- no tecido foliar. O acúmulo excessivo de íons salinos no tecido vegetal resulta em toxicidade iônica e provoca sérios distúrbios no metabolismo vegetal, sendo prejudicial às células e a planta como um todo (Munns, 2002). Um dos principais distúrbios metabólicos induzidos pelos efeitos osmóticos e/ou iônicos do estresse salino é a produção de EROs (Mittler, 2002). O fechamento estomático, induzido pela salinidade, limita a fixação de CO_2 e aumenta a produção de EROs, como o O_2^- , H_2O_2 e $\cdot\text{OH}$ (Munns e Tester, 2008). O excesso de EROs, geradas durante o estresse salino, pode provocar danos oxidativos irreversíveis sobre importantes componentes celulares, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Mittler, 2002; Munns e Tester, 2008).

O estresse oxidativo induzido pela salinidade pode causar intensa peroxidação lipídica (Hernandez e Almansa 2002). No entanto, a intensidade dos danos oxidativos depende da proteção oxidativa da espécie e/ou genótipo (Munns e Tester, 2008). O conteúdo de TBARS em folhas de *Cakile maritima*, uma espécie halófito, não foi alterado pela exposição das plantas a 100 mM de NaCl durante 7 dias, e ainda apresentou redução de 30% quando a concentração de sal foi 200 mM (Amor et al, 2006). No presente estudo, não foi verificado aumento do conteúdo de H_2O_2 nas folhas, após 15 dias de tratamento, e o conteúdo de TBARS foi reduzido pelo tratamento salino (Figuras 5C e D). Soares (2005) encontrou resultado similar para o conteúdo de TBARS em outros dois genótipos da espécie. Esses resultados sugerem que a salinidade não induz peroxidação de lipídios na espécie, ou, ainda, que a espécie apresenta alta proteção oxidativa sob condições salinas.

Além da alta proteção oxidativa, a redução do conteúdo de TBARS observada pode ser explicada pela mudança no perfil de ácido graxos das membranas. Os ácidos linoléico (18:2) e linolênico (18:3) são os principais ácidos graxos da membrana vegetal, e a peroxidação desses ácidos por EROs resulta na formação do 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e malondialdeído (MDA), respectivamente (Møller et al., 2007). Em halófitas expostas a concentrações crescentes de NaCl (0 – 200 mM), durante 5 semanas, ocorreu redução de 6 vezes no conteúdo de ácido linolênico e aumento de 2 vezes no ácido linoléico (Hamed et al., 2005). Esse mecanismo pode reduzir a formação de MDA e explicar a redução do conteúdo de TBARS, sob

condições salinas, em algumas espécies, uma vez que o MDA é o principal produto detectado entre as TBARS.

Conforme mencionado, o conteúdo inalterado do H_2O_2 associado à proteção da peroxidação lipídica, aqui observados, podem ser atribuídos à eficiência do sistema antioxidante da espécie. O cajueiro é bem adaptado às condições climáticas do semi-árido. Portanto, deve possuir mecanismos bioquímico-fisiológicos compatíveis com a resistência à fatores abióticos comuns nessas áreas, como a seca, salinidade, alta luminosidade e temperaturas elevadas. Por exemplo, o sal não afetou a atividade total da SOD. No entanto, o estudo das suas isoformas revelou a existência de duas Fe-SOD, presentes em cloroplastos, e três Cu/Zn-SOD, de cloroplastos e peroxissomo (Alscher et al., 2002), os principais sítios de produção de EROs na célula vegetal (Foyer e Noctor, 2003). Dessa forma, a atividade constitutiva e a localização celular estratégica das SODs podem representar um mecanismo bioquímico de proteção oxidativa endógeno da espécie, constitutivamente compatível com oscilações transientes do nível de EROs, dispensando a síntese *de novo* da SOD sob condições ambientais adversas.

A atividade da CAT foi fortemente modulada pelo estresse salino, apresentando aumento de 4,5 vezes nas plântulas tratadas com 150 mM de NaCl durante 15 dias. A CAT está localizada no peroxissomo da célula vegetal e pode representar até 25% da proteína total dessa organela (Reumann et al., 2004). No peroxissomo ocorre parte das reações da fotorespiração, via metabólica extremamente ativa em plantas de metabolismo C_3 . Nessa organela, ocorre a produção de H_2O_2 pela ação da enzima glicolato oxidase, durante a conversão do glicolato para glioxilato (Foyer e Noctor, 2000). Sob condições adversas, como salinidade e seca, a foto-respiração é intensificada e a produção de H_2O_2 é aumentada (Mittler, 2002). Dessa forma, o estímulo da atividade da CAT sob condições salinas pode indicar um brusco incremento da fotorespiração, onde essa enzima atuaria na prevenção de danos oxidativos, podendo explicar em parte a manutenção do conteúdo de H_2O_2 e proteção da peroxidação lipídica ao final dos 15 dias de tratamento.

As CATs possuem baixa afinidade pelo H_2O_2 , mas apresentam alta atividade catalítica, atuando na remoção do H_2O_2 em concentrações de mM, enquanto que as APXs possuem maior afinidade e menor atividade catalítica, operando na sua remoção em concentrações de μM (Mittler, 2002). A CAT é um tetrâmero de massa

molecular próxima de 240 kDa, possuindo quatro subunidades idênticas de massa molecular próxima de 56-60 kDa (Guan e Scandalios, 1993). Em *Arabidopsis* foram identificadas três isoformas da catalase, CAT1, CAT2 e CAT3, todas localizadas na matrix do peroxissomo (Nyathi e Baker, 2006). Os peroxissomos do mesófilo de plantas C₃ apresentam taxa normal de produção de H₂O₂ próxima de 1 mM m⁻² s⁻¹ (Foyer e Noctor, 2003), e pode aumentar, intensamente, sob condições que limitam a fixação de CO₂ (Foyer e Noctor, 2000). No presente estudo, foram identificadas três isoformas de CAT. Dessas três, a isoforma com subunidades de 68 kDa apresentou modulação da expressão pelo NaCl compatível com a atividade total CAT, sugerindo ser a isoforma mais ativa sob condições de salinidade.

A atividade da APX foi reduzida por concentrações de NaCl acima 50 mM. Esse resultado sugere sensibilidade da APX ao aumento da concentração de íons salinos no tecido e sua menor importância na eliminação do H₂O₂, comparado à CAT, em plantas de cajueiro sob condições salinas. Sugere ainda, que a produção do H₂O₂ ocorreu de forma localizada, no peroxissomo, e que nessas condições o aumento da atividade da CAT foi essencial para evitar o acúmulo e vazamento de EROs para outros sítios celulares, impedindo dano oxidativo. Essa duas enzimas, APX e CAT, possuem papel similar na remoção do H₂O₂, sendo consideradas vias redundantes na remoção do H₂O₂ em plantas (Foyer e Noctor, 2000). Recentemente, foi demonstrado que a inibição *in vivo* da CAT em plantas de feijão de corda induz a expressão de RNAm da APX, sugerindo sincronia de respostas entre esses dois mecanismos de remoção de H₂O₂ em espécies relativamente adaptadas ao ambiente do semi-árido (Lima, 2007).

A APX catalisa a redução do H₂O₂ utilizando o ascorbato reduzido (ASA) como doador de elétrons, e o aumento de sua atividade pode acarretar redução no estado redox desse antioxidante (Noctor e Foyer, 1998). No entanto, no presente estudo, o balanço redox do ASA apresentou relação inversa com a atividade da APX. O ASA foi menor na presença de 200 mM do sal, que ocorreu associado ao aumento do ascorbato oxidado (DHA) a partir de 150 mM, indicando consumo do ascorbato reduzido e sugerindo o papel do ASA na proteção oxidativa pela reação direta com H₂O₂. A diminuição do ascorbato reduzido associada à baixa atividade da APX e forte inibição da CAT, na presença de 200 mM do sal, sustenta a hipótese de uma eficiente interação dos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos na proteção oxidativa na espécie, sob condições de alta salinidade.

A glutationa e o ASA são os principais antioxidantes não enzimáticos da célula vegetal (Noctor e Foyer, 1998). Os resultados mostram que o incremento do NaCl resultou num sensível aumento no conteúdo da glutationa reduzida (GSH) e redução da oxidada (GSSG), aumentando a relação GSH/GSSH em 125%, na presença de 200 mM do sal (Tabela 2). No ciclo do ascorbato-glutaciona, que atua na remoção do H₂O₂ consumindo ASA, a GSH doa elétrons para redução do DHA, regenerando o ASA, reação catalisada pela DHAR. A GSSG é reduzida para GSH pela GR, que utiliza NADPH como fonte de elétrons (Halliwell, 1987). Portanto, a mudança da relação GSH/GSSG, aqui observada, não pode ser atribuída ao papel da GSH na regeneração do ASA, uma vez que não ocorreu consumo de GSH e o conteúdo de ASA foi reduzido pela salinidade (Tabelas 1 e 2).

Por outro lado, o aumento de GSH, associado à expressiva elevação do estado redox da glutaciona (GSH/GSSG), está diretamente associado ao aumento da atividade de GR e consumo de NADPH. Esse mecanismo pode reduzir a concentração de NADPH na célula e favorecer a relação NADP⁺/NADPH, podendo auxiliar na dissipação de energia na CTE cloroplástica. A restrição da fixação de CO₂ na presença de alta luminosidade resulta no aumento de NADPH na célula e na sobrecarga do estado de redução, que pode danificar a membrana do tilacóide e gerar EROs (Foyer e Noctor, 2000). Além do favorecimento do aumento da relação NADP⁺/NADPH, o incremento de GSH pode ser utilizado como poder redutor por outras peroxidases, como prexidases de glutaciona (GPX) e glutaciona S-transeferases (GST), que auxiliam na remoção de diferentes EROs na célula (Roxas et al., 1997; Tausz et al., 2004).

A resistência ao estresse salino, apresentada por *Lycopersicum pennellii*, uma espécie selvagem de tomate, em relação ao tipo cultivado *Lycopersicum esculentum*, está associada ao aumento do estado redox (GSH/GSSG) da glutaciona. Além do aumento do conteúdo de GSH, favorecendo o balanço redox desse antioxidante, foi observado também significativo aumento na atividade das enzimas GPX e GST (Mittova et al., 2003). Em genótipos de arroz contrastantes na resistência à salinidade, foi demonstrado que a resistência diferenciada está associada ao maior acúmulo de GSH (Vaidynathan et al., 2003). Em adição, a elevação do conteúdo de GSH sob condições de estresses, favorecendo o estado redox do sistema glutaciona, aumentando a proteção antioxidante pelo

restabelecimento da homeostase redox celular, são considerados mecanismos de aclimação em plantas (Tausz et al., 2004).

Em conclusão, os resultados demonstram que apesar da restrição de crescimento imposta pela salinidade, plântulas de cajueiro possuem alta capacidade de aclimação à salinidade, podendo ser atribuída à restrição estomática, impedindo a desidratação, associada a uma eficiente combinação de mecanismos antioxidantes enzimáticos (SOD e CAT) e não enzimáticos (ASA e GSH), evitando o acúmulo excessivo de H₂O₂ e impedindo a peroxidação lipídica.

Bibliografia

- ALSCHER, R.G., ERTURK, N. e HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341. 2002.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. e LIPMAN, D.J. Gapped BLST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402. 1997.
- AMOR, N.B., JIMÉNEZ, A., MEGDICHE, W., LUNDQVIST, M., SEVILLA, F. e ABDELLY, C. Responses of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 446-457. 2006.
- APEL, K. e HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 55, p. 373-99. 2004.
- BEAUCHAMP, C. e FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 44, p. 276-287. 1971.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254. 1976.
- CHEESEMAN, J.M., Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 10, 2435-2444. 2006.
- DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVA, E., VAN MONTAGU, M., INZE, D. e VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, p. 779-795. 2000.
- DAVIES, W.J., KUDOYAROVA, G. e HARTUNG, W. Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. **J. Plant Growth Regul**, v. 24, p. 285-295. 2005.
- DIONISIO-SESE, M.L. e S. TOBITA. Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. **J. Plant Physiology**, v. 157, p. 54-58. 2000.
- FIDALGO, F., SANTOS, A., SANTOS, I. e SALEMA, R. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Ann. Appl. Biol.**, v. 145, p. 185-192. 2004.
- FOYER, C.H. Free radical processes in plants. **Biochem Soc Trans**, v. 24, p. 427-434. 1996.
- FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Tansley Review No. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytol**, v. 146, p. 359-388. 2000.

- FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355–364. 2003
- GARCÍA-SÁNCHEZ, F. e SYVERTSEN, J.P. Salinity tolerance of cleopatra mandarin and carrizo citrange citrus rootstock seedlings is affected by CO₂ enrichment during growth. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 131, n. 1, p. 24-31. 2006.
- GIANNOPOLOTIS, C.N. e RIES, S.K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314. 1977.
- GOMEZ, L.D., NOCTOR, G., KNIGHT, M. e FOYER, C. The intercellular distribution of glutathione synthesis and its response to chilling in maize. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1662-1671. 2004.
- GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem**, v. 106, p. 207-211. 1980.
- GUAN, L. e SCANDALIOS, J.G. Characterization of the Catalase antioxidant defense gene *Cat1* of maize, and its developmentally regulated expression in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, v. 3, p. 537-536. 1993.
- GUY, M. Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. **FEBS Letters**, v. 554, p. 417-421. 2003.
- HALLIWELL, B. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. **Chem Phys Lipids**, v. 44, p. 327–340. 1987.
- HAMED, K.B., YOUSSEF, N.B., RANIERI, A., ZARROUK, M. e ABDELLEY, C. Change in content and fatty acid profiles of total lipids and sulfolipids in the halophyte *Crithmum maritimum* under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 599-602. 2005.
- HAVIR, E.A. e MCHALE, N.A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco-Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455. 1987.
- HEATH, R.L. e PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n.1, p. 189-198. 1968.
- HERNANDEZ, J.A. e ALMANSA, M.S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. **Physiol Plant**, v. 115, p. 251–257. 2002.
- HOAGLAND, D.R. e ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil.: **California Agricultural Experiment Station**, Berkeley 32p. (Circular 347). 1950.
- HUS, S.Y. e KAO, C.H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regul**, v. 39, p. 83–9. 2003.
- IMLAY, J.A. Pathways of oxidative damage. **Annu Ver Microbiol**, v. 57, p. 395–418. 2003.
- KAMPFENKEL, K., MONTAGU, M.V. e INZÉ, R. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical biochemistry**, v. 225, p. 165-167. 1995.
- KUNCE, C.M. TRELEASE, R.N. Heterogeneity of catalase in maturing and germinated cotton seeds, **Plant Physiology**, v. 81, p.1134–1139.1986.
- KWON, S.Y., CHOI, S.M., AHN, Y.O., LEE, H.S., LEE, H.B., PARK, Y.M. e KWAK, S.S. Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human DHAR gene. **J Plant Physiol**, v. 160, p. 347–353. 2003.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680. 1970.

- LIMA, J. P. M. S. Sincronia entre Catalases e Peroxidases de Ascorbato na proteção contra danos oxidativos em folhas de feijão caupi expostas aos estresses hídrico e salino. (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007. 156 p.
- MARTINEZ, C.A., LOUREIRO, M.E., OLIVA, M.A. e MAESRRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilubum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Sci**, v. 160, p. 505-515. 2001.
- MELONI, D.A., OLIVA, M.A., MARTINEZ, C.A. e CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 69-76. 2003.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410. 2002.
- MITTOVA, V., THEODOULOU, F.L., KIDDLE, G., GÓMEZ, L., VOLOKITA, M., TAL, M., FOYER, C.H. e GUY, M. Coordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance in tomato. **FEBS Letters**, v. 554, p. 417-421. 2003.
- MØLLER, I.M., JENSEN, P.E. e HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 58, p. 459-81. 2007.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239-250. 2002.
- MUNNS, R. e TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 59, p. 651-81. 2008.
- NAKANO, Y. e ASADA K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. **Plant Cell Physiol**, v. 28, p. 131-40. 1987.
- NAKANO, Y. e ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 1068-1072. 1981.
- NETONDO, G.A., ONYANGO, J.C. e BECK, E. Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. **Crop Science**, v. 44, p. 806-811. 2004.
- NOCTOR, G. e FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, v. 49, p. 249-79. 1998.
- NYATHI, Y. e BAKER, A. Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 1478-1495. 2006.
- ROXAS, V.P., SMITH, R.K., ALLEN, E.R. e ALLEN, R.D. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 968-991. 1997.
- REUMANN, S., MA, C., LEMKE, S., e BABUJEE, L. AraPeroX. A database of putative Arabidopsis proteins from plant peroxisomes, **Plant Physiol**, v. 136, p. 2587-2608. 2004.
- SALIN, M.L. e BRIDGES, S.M. Localization of superoxide dismutase in chloroplasts from *Brassica campestris*. **Z Pflanzen**, v. 99, p. 37-45. 1981.
- SCANDALIOS J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol**, v. 101, p. 1-7. 1993.
- SOARES, L.S.P. Resistência de folhas de plântulas de cajueiro anão precoce aos danos oxidativos induzidos pelos estresses salino e osmótico. (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005, 125 p.

SOUZA, R.P., RIBEIRO, R.V., MACHADO, E.C., OLIVEIRA, R.F. e SILVEIRA, J.A.G. Photosynthetic responses of young cashew plants to varying environmental conditions. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 735-744. 2005.

SREENIVASULU, N., GRIMM, B., WOBUS, U. e WESCHKE, W. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). **Physiologia Plantarum**, v. 109, p. 435-442. 2000.

TAUSZ, M., SIRCELJ, H. e GRILL, D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 404, p. 1955-1962. 2004.

THORUP, O.A., STROLE, W.B. e LEAVELL., B.S. A method for the localization of catalase on starch gels. **J Lab Clin Med**, v. 58, p. 122-128. 1961.

TOWBIN, H., STAHELIN, T. e GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gell to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 76, p. 4350-4354. 1979.

VAIDYANATHAN, H., SIVAKUMAR, P., CHAKRABARTY, R. e THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) - differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, v. 165, p. 1411-1418. 2003.

YADAV, S.K., SINGLA-PAREEK, S.L., REDDY, M.K. e SOPORY, S.K. Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. **FEBS Letters**, v. 579, p. 6265-6271. 2005.

YEO, A. Predicting the interaction between the effects of salinity and climate change on crop plants. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 159-174. 1999.

ZIMMERMAM, P., HEINLEIN, C., ORENDI, G. e ZENTGRA, U. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant, cell and Environment**, v. 29, p. 1049-1060. 2006.

CAPÍTULO – II

PROTEÇÃO OXIDATIVA EM FOLHAS DE PLÂNTULAS DE CAJUEIRO SUBMETIDAS À SECA

Introdução

O estresse hídrico é um dos mais importantes fatores ambientais que regula o crescimento e o desenvolvimento vegetal. A redução da absorção de água e de nutrientes do solo, associada à intensa restrição fotossintética, são alguns dos impactos negativos do estresse hídrico no metabolismo vegetal, que resulta na redução da produtividade agrícola de várias espécies de importância econômica no mundo todo (Cattivelli et al., 2008). Sob condições moderadas de seca, a diminuição da fotossíntese ocorre principalmente devido ao fechamento estomático, e com a progressão da intensidade do estresse, alterações bioquímicas podem comprometer diretamente a eficiência da fixação do CO₂ (Bray et al., 2000).

As plantas possuem mecanismos morfofisiológicos que permitem o escape à seca (ex: ciclo de vida rápido), resistir à seca (ex: aprofundar raízes, impermeabilizar folhas e fechamento dos estômatos) e tolerar a seca (ex: ajustamento osmótico, fechamento estomático e indução de antioxidantes) (Levitt, 1980; Bray et al., 2000). Os mecanismos que permitem a convivência com a seca, resistência e tolerância, podem levar à limitação estomática e redução da fotossíntese pela limitação da fixação de CO₂. Essa limitação resulta no aumento da relação NADP⁺/NADPH no estroma dos cloroplastos, reduzindo a concentração de NADP⁺, o principal acceptor de elétrons fotossintéticos. Nessas condições, ocorre rapidamente uma sobrecarga de energia na CTE cloroplástica e o excesso de elétrons pode ser desviado para redução do O₂ (Foyer e Noctor, 2000).

O estado de alta redução dos fotossistemas I (PSI) e II (PSII), induzido por estresses abióticos, resulta no aumento significativo da fotoredução do O₂, produzindo excesso de radical superóxido (O₂^{•-}). Esse é o primeiro passo para uma seqüência de reações em cadeia que produz mais espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula, como o oxigênio singlet (¹O₂), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil ([•]OH) (Mittler, 2002). Essas formas intermediárias do oxigênio molecular são altamente reativas, e em excesso alteram rapidamente o estado redox celular, causando peroxidação de lipídios, desnaturação de proteínas e mutação no DNA (Dat et al., 2000; Imlay, 2003).

Para evitar danos oxidativos causados por EROs nos diferentes componentes celulares, a célula possui mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático inclui as dismutases de superóxido (SOD), peroxidases de

ascorbato (APX), catalases (CAT), além das redutases de dehidroascorbato (DHAR), de monodehidroascorbato (MDHR) e de glutathiona (GR) (Noctor e Foyer, 1998). As SODs representam a primeira linha de defesa oxidativa da célula e catalisam a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ (Alscher et al., 2002). As APXs são as principais peroxidases na remoção do H_2O_2 na célula (Foyer et al., 1997), e atuam em sincronia com as enzimas DHAR, MDHR e GR, na remoção de H_2O_2 no ciclo do ascorbato-glutathiona (Halliwell 1987). As CATs possuem menor afinidade pelo H_2O_2 comparado as APXs, mas são essenciais na remoção de H_2O_2 oriundo da fotorrespiração (Mittler, 2002).

O ascorbato é considerado o principal substrato para redução do H_2O_2 (Noctor e Foyer, 1998). As APXs utilizam duas moléculas do ascorbato reduzidas, como doadoras específicas de elétrons, para catalisar a redução de uma molécula do H_2O_2 para H_2O e O_2 . O ascorbato pode ainda reagir e neutralizar o $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $\cdot OH$ (Nakano e Asada, 1987) e hidroperóxidos de lipídios (Shao et al., 2008). A glutathiona é um tripeptídeo (γ -glu-cys-gly) que representa a principal forma de grupos SH não protéico da célula. No metabolismo vegetal, está relacionada com a regulação da absorção e assimilação do enxofre no tecido radicular, além de possuir papel central na proteção oxidativa, no tamponamento redox celular e na regulação da expressão de genes de defesa (Noctor e Foyer, 1998; Gomez et al., 2004).

Os mecanismos enzimáticos e não enzimáticos estão envolvidos com a proteção oxidativa durante a seca em diferentes espécies. Em plantas de *V. unguiculata* submetidas ao estresse hídrico ocorreu significativa indução do sistema enzimático SOD-CAT-APX, além aumento do conteúdo de ascorbato em tecidos de raízes, caule e folhas, demonstrando o papel desses antioxidantes na proteção dos diferentes tecidos e órgãos na espécie (Manivannan et al., 2007). Em plantas de arroz a resistência ao estresse hídrico está relacionada com a indução da atividade das enzimas SOD, CAT e APX, além do aumento do conteúdo do ASA, alterações que apresentam relação com a proteção da oxidação de lipídios e controle do acúmulo de H_2O_2 (Guo et al., 2006).

No presente estudo, foram avaliadas as alterações induzidas pelo estresse hídrico, sobre variáveis fisiológicas relacionadas com a condutância estomática e o *status* hídrico de plântulas de cajueiro, visando associar essas alterações com a produção de H_2O_2 e os mecanismos de injúria e proteção oxidativa na espécie. O papel da defesa oxidativa, enzimática e não enzimática, frente ao estresse hídrico na espécie é discutido.

Material e métodos

Material vegetal e aplicação do estresse hídrico

Sementes de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.), clone CCP 06, fornecidas pela EMBRAPA-CNPAT, foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 5% (v/v) e semeadas em vasos de 2,0 L, contendo vermiculita, sob condições de casa de vegetação. Durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas, a umidade do substrato foi mantida próxima da capacidade de campo, por irrigações freqüentes com água destilada, e após 35 dias do plantio plântulas homogêneas, apresentando 8 folhas expandidas, foram utilizadas no experimento. As plântulas foram mantidas em regime normal de irrigação (controle) ou submetidas ao estresse hídrico pela suspensão da rega, tempo suficiente para ocorrer restrição estomática superior a 80% por 10 dias. Durante o experimento foram realizadas medidas diárias da transpiração e da resistência estomática, e com base no critério da restrição estomática estabelecido, foram realizadas coletas aos 10, 15 e 20 dias após o início de suspensão da rega, período em que ocorreu à restrição estomática desejada. Durante as coleta foram coletados discos foliares para determinação do conteúdo relativo de água e do dano de membrana, em seguida as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado conforme Fidalgo et al., (2004). Ao final do experimento, foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro) e a massa fresca (MF) determinada imediatamente. Em seguida, os discos foram imersos em 30 ml de água deionizada por 8 h, em placas de petri, e após breve secagem dos discos em papel toalha, para remover o excesso de água, foi determinada a massa túrgida (MT). A massa seca (MS) foi determinada após secagem dos discos a 70°C, durante 48 h em estufa, e o CRA estimado pela seguinte relação: $[(MT - MS)/(MF - MS)] \times 100$.

Taxa de transpiração e resistência estomática

Após a suspensão da rega a taxa de transpiração e a resistência estomática das plântulas foram determinadas diariamente, com auxílio de um porômetro portátil modelo LI-COR 1600, sempre as 10:00 h, horário em que as condições ambientais apresentam pouca variação.

Conteúdo de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinado conforme Cheeseman et al., (2006). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas na presença de N₂ líquido até obtenção de farinha, seguido da adição de 0,75 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,4, contendo KCN 5 mM e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 13.000 x g por 20 min a 4°C e alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 0,9 ml de meio de reação

contendo 100 μM de FeSO_4 , 250 μM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 mM de H_2SO_4 , 100 μM de alaranjado de xilenol e 99 mM de sorbitol. A mistura foi incubada a 25 °C por 30 min e em seguida realizadas leituras de absorvância a 560 nm. As concentrações de peróxido de hidrogênio foram obtidas a partir de curva padrão, utilizando H_2O_2 , e os dados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme Heath e Packer (1968). Amostras (0,1 g) de folhas frescas foram maceradas em almofariz na presença de N_2 líquido, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 12.000 x g, durante 15 min a 4 °C, e 0,5 ml do sobrenadante foram adicionados a 2,0 ml do meio de reação contendo TCA 20% (p/v) e TBA 0,5% (p/v), em tubos hermeticamente fechados. A reação foi aquecida em banho maria a 95 °C, durante 1 h, e em seguida foi interrompida em banho de gelo. Após 30 min a 25 °C, foram realizadas leituras de absorvância a 532 e 660 nm, e depois de subtraídas as absorvâncias obtidas a 660 das obtidas a 532 nm, o conteúdo de TBARS foi estimado utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e expresso em nmol g^{-1} MF.

Dano de membrana

O dano de membrana foi determinado conforme Shanahan et al., (1990). Ao final do ensaio foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro) foram imersos em 10 ml de água deionizada em tubos fechados e incubados a 40 °C durante 30 min e determinada à condutividade elétrica da solução (C1). Em seguida, os tubos foram incubados a 100 °C por 1 h e após atingir a temperatura ambiente foi determinada à condutividade elétrica da solução (C2). O dano de membrana (DM) foi estimado pela relação, $(\text{C1}/\text{C2}) \times 100$.

Conteúdos de glutatona total, reduzida e oxidada

Os conteúdos de glutatona total (GSH+GSSG) e das formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram determinados conforme Griffith (1980). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N_2 líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 5% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min a 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação. Para determinação da GSH alíquotas de 0,2 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 2,6 ml de tampão fosfato de sódio 150 mM (pH 7,4), 1 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) e 0,2 ml de 5,5'-ditio-bis 2-ácido-nitrobenzóico (DTNB) 30 mM, em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). O conteúdo de glutatona total (GSH + GSSG) foi determinado pela adição de 0,2 ml do sobrenadante seguido da adição de 1,6 ml de tampão fosfato 150 mM (pH 7,4), contendo 1 unidade de GR, 1,0 ml de NADPH 0,15 mM, 1,0 ml de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) e 0,2 ml de DTNB 30 mM, em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). Em seguida a reação foi acondicionada em banho maria a 30°C, durante 10min. Ao final, foram

realizadas leituras de absorbância a 412 nm e os conteúdos de GSH e GSH + GSSG estimados com base em curva padrão, de GSH, e expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. O conteúdo da GSSG foi obtido pela subtração da glutatona reduzida da total.

Conteúdos de ascorbato total, reduzido e oxidado

Os conteúdos de ascorbato total (ASA+DHA), e das formas reduzida (ASA), e oxidada (DHA) foram determinados conforme Kampfenkel et al., (1995). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N_2 líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min a 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação. Para o ascorbato reduzido alíquotas de 0,1 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,3 ml de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,4), 0,1 ml de água destilada, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H_2PO_4 45%, 0,4 ml de biperidil 4% e 0,2 ml de FeCl_3 . O conteúdo de ascorbato total foi determinado pela adição de 0,1 ml do extrato ao meio de reação contendo 0,1 ml de DTT 10 mM (em tampão fosfato 200 mM), 0,2 ml e tampão fosfato de potássio 200mM (pH 7,4), 0,1 ml de N-etilmaleiamida 0,5%, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H_2PO_4 45%, 0,4 ml de biperidil 4% e 0,2 ml de FeCl_3 . A reação foi acondicionada em banho maria a 40°C, durante 30 min, e em seguida foram realizadas leituras de absorbância a 525 nm. Os conteúdos do ascorbato total (ASA+DHA) e reduzido (ASA) foram estimados com base em curva padrão, utilizando L – ascorbato, e expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. O conteúdo do DHA foi obtido pela subtração do ascorbato reduzido do total.

Extração de proteínas

A extração de proteína foi realizada conforme Zimmermam et al., (2006), com modificações. Amostra de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N_2 líquido seguido da adição de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), contendo 30 mM de DTT, 20% de glicerol e 3% de PEG-6000. Para determinação da atividade das enzimas peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido, o pH do tampão foi alterado para 7,0 e o DTT foi substituído por ascorbato 1 mM. Após a extração, o extrato foi centrifugado a 14.000 x g durante 30 min, a 4 °C. O conteúdo de proteínas solúveis foi determinado conforme Bradford (1976) e estimado com base em curva padrão, utilizando BSA.

Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS)

Para as PAGE-SDS alíquota de 20 μL de extrato protéico foram misturas a 20 μL do tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol, SDS 10% e azul de boromofenol) e 20 μL da mistura foi aplicado em cada poço. Os géis apresentavam a seguinte constituição: 12,5% (main gel) e 5% (stacking gel), e as eletroforeses foram realizadas a 125 V, 20 mA e 10 W, por cada gel, usando o tampão de corrida (Tris 25 mM/Glicina 192 mM, pH 8,3 e SDS 10%). Após a eletroforese, as

proteínas foram coradas com o *Comassie brilliant blue* R-250 0,025%, em ácido acético 10% e metanol 40%, durante 2 h. Em seguida os géis foram descorados em ácido acético 10% e metanol 40% (Laemmli, 1970).

Atividade enzimática

A atividade da peroxidase de ascorbato (APX; EC: 1.11.1.1) foi determinada conforme método descrito por Nakano e Asada (1981). Alíquotas de 0,1 ml de extrato protéico foram adicionadas ao meio de reação composto de 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo 0,5 mM de ácido ascórbico. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ (30 mM) ao meio de reação e acompanhada pelo decaimento da absorbância a 290 nm em espectrofotômetro durante 300 seg, com leitura sucessivas em intervalos de 30 seg. A atividade da APX foi estimada utilizando o coeficiente e de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ para o ascorbato, em 290 nm, e expressa como μmol AsA g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da catalase (CAT; EC: 1.11.1.6) foi determinada conforme Havir e McHale, (1987). Alíquotas de 0,05 ml de extrato protéico foram adicionadas a 2,95 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), contendo H₂O₂ (20 mM). A reação ocorreu a 30°C e foi acompanhado pelo decaimento da absorbância a 240 nm durante 300 seg, com leituras sucessivas a cada 30 seg. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ para o H₂O₂, em 240 nm, e expressa em nmol H₂O₂ g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da dismutase de superóxido (SOD; EC: 1.15.1.1) foi determinada conforme metodologia descrita por Gianopolitis e Ries (1977). Alíquotas de 0,1 ml do extrato protéico foram transferidas para meio de reação, em tubos protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 μM de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM de riboflavina e rápida transferência dos tubos, sem a proteção da luz, para câmara iluminada por lâmpada de 30 wats (30 μmol de fótons m⁻² s⁻¹), durante 6 minutos. A reação foi interrompida pelo desligamento da luz, os tubos foram revestidos por filme escuro e realizadas leituras a 540nm. A atividade foi estimada com base na inibição da redução do NBT, definindo-se uma unidade de atividade como a quantidade da enzima necessária para inibir 50% da fotoredução (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade foi expressa em U.A. g⁻¹ MF min⁻¹.

Zimograma e identificação das isoenzimas da dismutase de superóxido (SOD)

Inicialmente, as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida 10% sob condição nativa (PAGE nativa). Alíquotas (± 10 μl) de extrato protéico foram misturadas com tampão de aplicação (Tris 25 mM/glicina 190 mM, pH 8,3), na proporção 1/1 (v/v), e submetidas à eletroforese (125 V, 20 mA e 10 W por gel). Após a separação das proteínas, os géis foram revelados para atividade da SOD conforme Beauchamp e Fridovich (1971). Inicialmente foram incubados em 50 ml de NBT 2 mM por 15 min, rapidamente lavados com água destilada e novamente incubados, na ausência da luz, em 50 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), contendo TEMED 28 mM

e riboflavina (0,1 mg/ml), por 15 min. Em seguida, os géis foram lavados com água destilada e expostos à luz, em caixa boxe contendo lâmpada fluorescente de 30 wats ($30 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para indução da reação fotoquímica. Após revelação das bandas acromáticas a reação foi interrompida pelo desligamento da luz e sucessivas lavagens dos géis com água. A diferenciação das isoformas da SOD foi realizada pela prévia incubação dos géis por 15 min em tampão fosfato de potássio contendo H_2O_2 (5 mM) ou KCN (2 mM), conforme Martinez et al., (2001). As isoformas Cu/Zn-SOD e Fe-SOD são sensíveis ao H_2O_2 , a Fe-SOD é resistente ao cianeto, enquanto a Mn-SOD é resistente ao H_2O_2 e ao CN^- (Scandalios, 1993). Após a pré-incubação para inibição específica das isoformas os géis foram revelados conforme descrito acima.

Zimograma da catalase (CAT)

Após a separação das proteínas em gel de poliacrilamida a 7,5% os géis foram revelados para atividade de catalases conforme Thorup et al., (1961). Aliquotas (50 μl) de extrato protéico foram misturadas ao tampão de aplicação (Tris 25 mM/glicina 190 mM, pH 8,3), na proporção 1/1 (v/v) e 20 μl da mistura foi submetido à PAGE nativa (125 V, 20 mA e 10 W por gel). Após a eletroforese os géis foram pré-incubados em H_2O_2 0,3% (p/v) por 20 min, em agitação suave, seguido de rápida lavagem com água destilada e imersão em solução de FeCl_3 0,5% (p/v) e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ 0,5% (p/v). Após o surgimento das bandas acromáticas sobre o fundo verde dos géis a reação foi interrompida por lavagens com água destilada. As soluções de FeCl_3 e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ foram preparadas isoladamente, mantidas no escuro, e misturadas somente no momento da aplicação sobre os géis.

Delineamento estatístico e análise dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com os tratamentos dispostos em fatorial 2 x 3, dois níveis de umidade, irrigado e seca, e três tempos de coleta, 10, 15 e 20 dias de suspensão da rega, respectivamente. Todos os tratamentos foram representados por três repetições independentes, num total de 18 parcelas experimentais. Os dados foram submetidos ao teste F a 0,05 de probabilidade por análise de variância e as médias das variáveis submetidas ao teste de Tukey em mesmo nível de significância.

Resultados

Respostas fisiológicas de plântulas de cajueiro submetidas ao estresse hídrico

No presente estudo, plântulas de cajueiro foram submetidas ao estresse hídrico durante 20 dias. A suspensão da rega acarretou redução significativa da transpiração e intenso aumento da resistência estomática das plântulas (Figura 8). Nas plântulas submetidas ao estresse hídrico, durante 6 e 9 dias, a transpiração foi reduzida em 38 e 63%, respectivamente, enquanto que naquelas expostas a seca por 12, 15 e 20 dias a redução foi superior a 90%, em relação aos controles (Figura 8A). A resistência estomática das plântulas expostas à seca por 6 e 9 dias foi aumentada em 0,60 e 1,42 vezes, respectivamente, e a partir dos 12 dias de seca esse aumento foi de 12 vezes, em relação aos respectivos controles (Figura 8B).

A transpiração e a resistência estomática apresentaram forte relação com a umidade do solo. A suspensão da rega resultou na redução de 30, 70, 80, e 84% da umidade da capacidade de campo do substrato após 6, 9, 12, 15 e 20 dias, respectivamente (dados não mostrados). Essa redução apresentou alta correlação com a redução da transpiração ($R^2 = 0,969$) durante o experimento (Figura 8C). O conteúdo relativo de água foliar das plântulas submetidas ao estresse hídrico por 10 e 15 dias não foi alterado, enquanto que naquelas cultivadas por 20 dias sob condições de seca ocorreu redução ($p > 0,05$) significativa do CRA (Figura 8D).

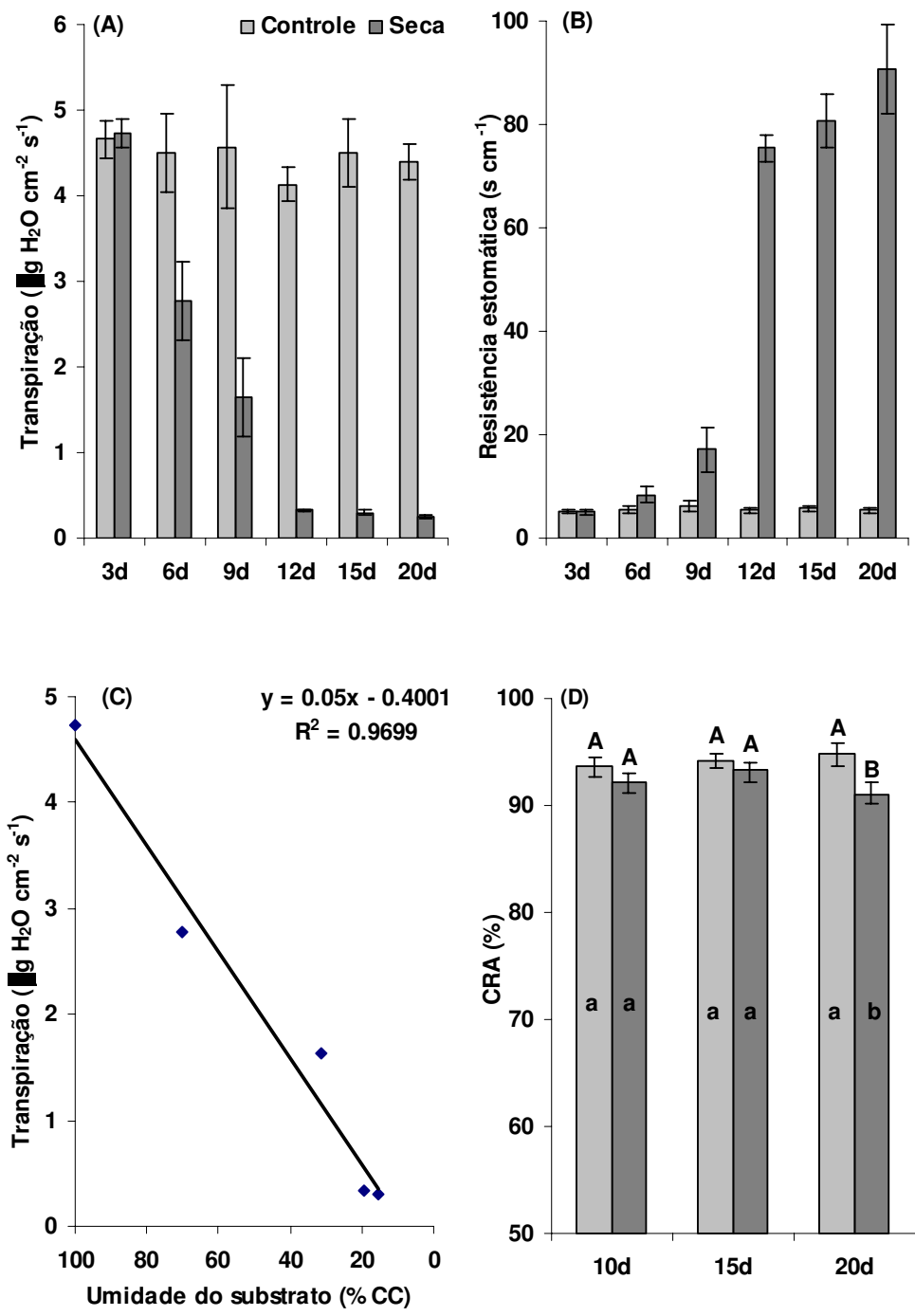


Figura 8 (A) Transpiração, (B) resistência estomática, (C) correlação entre transpiração e umidade do substrato e (D) conteúdo relativo de água de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) ou submetidas ao estresse hídrico durante 20 dias. Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas entre os tempos e minúsculas dentro de cada tempo, não diferem a 0,05 de probabilidade.

Alterações oxidativas em plântulas de cajueiro submetidas ao estresse hídrico

Os conteúdos de TBARS e de peróxido de hidrogênio foliar apresentaram respostas distintas em relação ao tempo de exposição ao estresse hídrico. O conteúdo de TBARS apresentou acréscimo médio de 20% aos 15 e 20 dias de tratamento, tanto na ausência quanto na presença do estresse hídrico, com relação aos 10 dias (Tabela 3). O conteúdo de peróxido de hidrogênio nas folhas das plântulas mantidas sob condições controle ou expostas ao estresse hídrico, durante 10 e 15 dias, não foi alterado. No entanto, nas plântulas submetidas à suspensão da rega durante 20 dias o conteúdo de H₂O₂ foliar foi 20% maior, comparado ao controle (Tabela 3). O dano de membrana, estimado com base na condutividade elétrica (CE), não diferiu entre as plântulas cultivadas sob condições controle (irrigadas) ou submetidas ao estresse hídrico durante 20 dias (Tabela 3).

Tabela 3 Conteúdos de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e TABRS, e dano de membrana em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) ou submetidas ao estresse hídrico durante 10, 15 e 20 dias

Tratamentos		H ₂ O ₂ ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	TBARS (nmol g^{-1} MF)	Dano de membrana (CE)
10 dias	Controle	3,93Ba	81,29Ba	10,03Aa
	Seca	4,21Ba	78,92Ba	9,78Aa
15 dias	Controle	3,91Ba	96,12Aa	11,20Aa
	Seca	3,88Ba	99,56Aa	10,20Aa
20 dias	Controle	4,10Bb	102,59 Aa	10,12Aa
	Seca	4,98Aa	101,47Aa	11.02Aa

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula entre os tempos e minúscula dentro de cada tempo, não difere ao nível de 0,05 de probabilidade por Tukey.

Mudanças na atividade das enzimas antioxidativas de plântulas de cajueiro submetidas ao estresse hídrico

O estresse hídrico reduziu o conteúdo de proteína solúvel foliar e afetou diferentemente a atividade das enzimas oxidativas. A seca estimulou a atividade da SOD, reduziu a atividade da CAT e não afetou a atividade da APX (Figuras 9 e 10). O conteúdo de proteína solúvel foi igualmente reduzido em 30% nas plântulas cultivadas sob condições de restrição hídrica durante 10, 15 e 20 dias, comparado aos respectivos controles (Figuras 9A e 10A). A análise por SDS-PAGE do perfil dos polipeptídios de folhas das plântulas controle e estressadas, apresentou resultado compatível com a proteína solúvel, forte redução de todas as bandas sob condições de estresse hídrico (Figura 10A).

A atividade total da dismutase de superóxido apresentou aumento de 16% nas plântulas submetidas ao estresse hídrico (Figura 9B). A análise qualitativa, por PAGE nativa, das diferentes isoformas da SOD, na presença ou ausência de inibidores específicos (H_2O_2 e KCN), revelou a existência de duas isoformas Fe-SOD e três isoformas Cu/Zn-SOD. O aumento da atividade total da SOD foi compatível com incrementos de regiões descoloridas no gel, indicando aumento de atividade das isoformas Cu/Zn-SOD e principalmente de uma das isoformas Fe-SOD (Figura 10B). A atividade da APX não foi afetada pelo estresse hídrico e foi constante ao longo do experimento nas plântulas controle ou estressadas (Figura 9D).

A atividade da CAT foi fortemente reduzida pelo estresse hídrico durante o experimento. As plântulas submetidas à suspensão da rega apresentaram redução de 70% da atividade dessa enzima, comparado ao controle, aos 10, 15 e 20 dias de seca (Figura 9C). A análise por zimograma revelou padrão de resposta similar ao observado para a atividade total da CAT, regiões descoloridas associadas ao tratamento controle, indicando atividade, e ausência de atividade nos tratamentos de seca aos 10, 15 e 20 dias (Figura 10C).

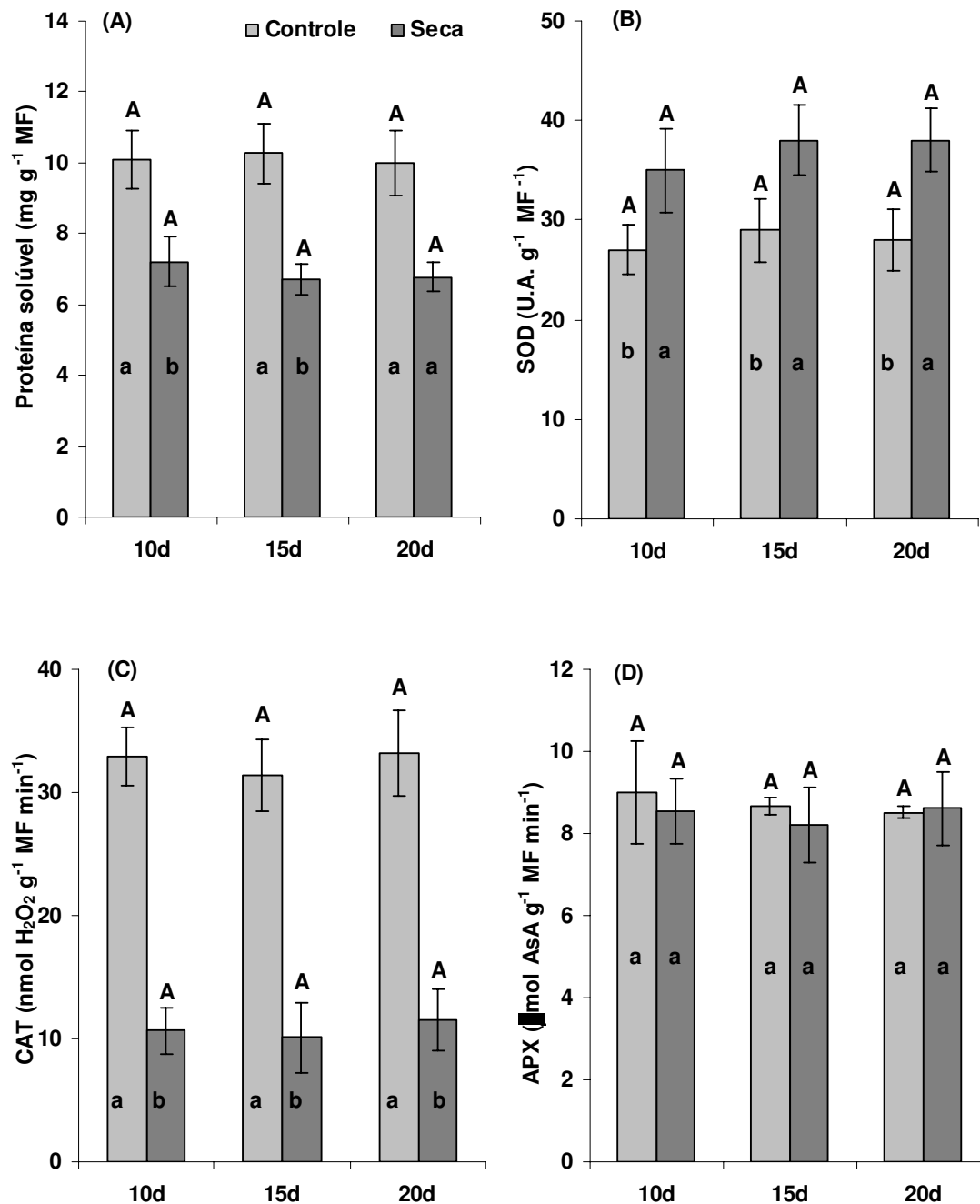


Figura 9 (A) Conteúdo de proteína solúvel e atividade das enzimas (B) dismutase de superóxido, (C) catalase e (D) peroxidase de ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) ou submetidas ao estresse hídrico durante 20 dias. Médias seguidas da mesma letra, maiúsculas entre os tempos e minúsculas dentro de cada tempo, não diferem a 0,05 de probabilidade.

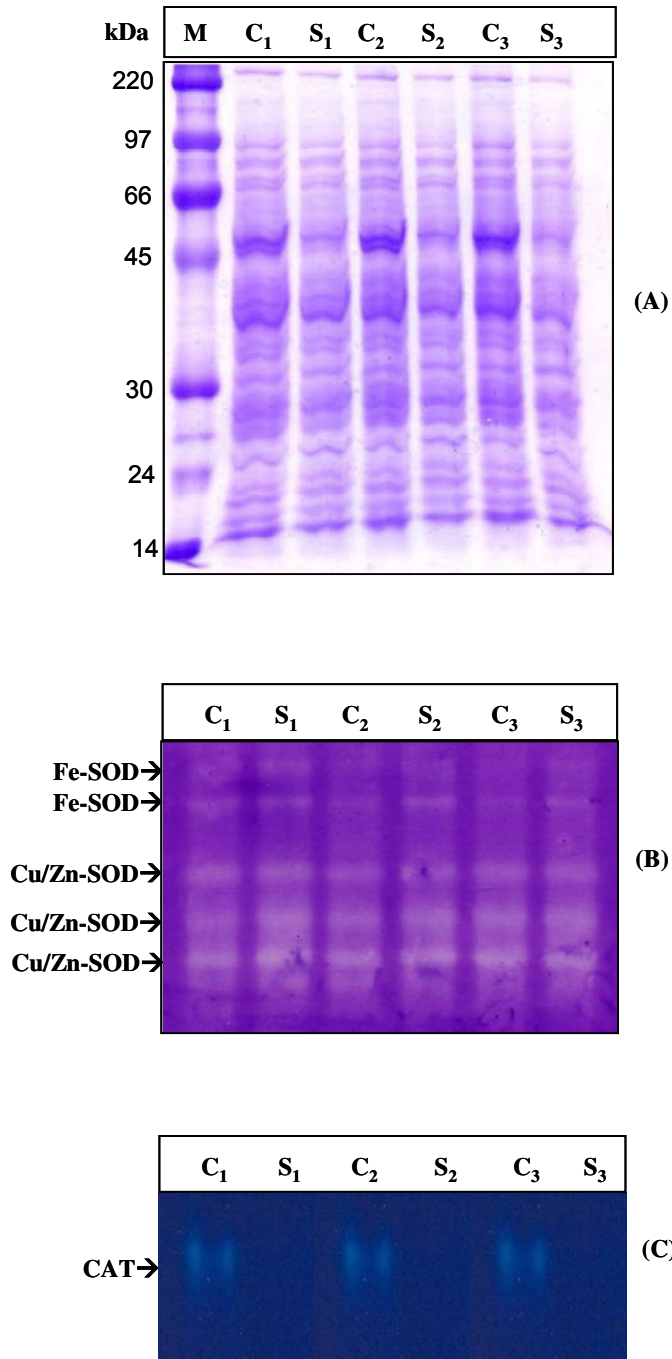


Figura 10 (A) SDS-PAGE e zimograma para (B) dismutases do superóxido e (C) catalases de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) ou submetidas ao estresse hídrico durante 20 dias. Os poços C1, C2, C3 e S1, S2 e S3, representam os tratamento controle e estresses aos 10, 15 e 20 dias, respectivamente. Em todas as eletroforeses foram aplicados 20 μ l de extrato protéico em cada poço, \pm 40 μ g de proteína, exceto para o zimograma da SOD que foi aplicado apenas 10 μ l, \pm 20 μ g de proteína.

Mudanças do conteúdo e estado redox do ascorbato e da glutathiona em plântulas de cajueiro submetidas ao estresse hídrico

O estresse hídrico afetou o conteúdo e o estado redox dos antioxidantes ascorbato e glutathiona (Tabelas 4 e 5). Os conteúdos de ascorbato total e de ascorbato reduzido nas plântulas submetidas ao estresse hídrico foi cerca de 20% menor ao longo do experimento, comparado ao controle (Tabela 4). O conteúdo do ascorbato oxidado nas plântulas controle foi aumentado em 80 % entre 15 e 20 dias, enquanto que nas plântulas estressadas não foi alterado e apresentou conteúdo 52% menor após os 15 dias de experimento, em relação ao controle. A relação ASA/DHA das plântulas controle foi reduzida em 53 e 37% aos 15 e 20 dias, respectivamente, enquanto que nas plântulas estressadas esse balanço não foi alterado e foi maior que no controle aos 15 e 20 dias (Tabela 4).

O conteúdo da glutathiona total foi maior nas plântulas submetidas ao estresse hídrico ao longo do experimento (Tabela 5). O conteúdo de glutathiona reduzida sob condições controle e de estresse não diferiu e foi constante durante o experimento. O teor da glutathiona oxidada das plântulas controle ou estressadas não foi alterado pelo tempo de exposição à seca. No entanto, nas plântulas cultivadas sob condições de estresse hídrico o conteúdo da glutathiona oxidada foi 2,2 vezes maior, em relação ao controle. A relação reduzida/oxidada da glutathiona das plântulas sob condições de seca foi 50% menor, comparado ao controle, durante o período experimental (Tabela 5).

Tabela 4 Conteúdo ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) de ascorbato total (ASA+DHA), reduzido (ASA) e oxidado (DHA), e balanço redox (ASA/DHA) do ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) e submetidas a 10, 15 e 20 dias de estresse hídrico

Seca	Total		Reduzido		Oxidado		Reduzido/Oxidado	
	Controle	Seca	Controle	Seca	Controle	Seca	Controle	Seca
10 d	13.04Aa	9.71Ab	11.12Aa	8.25Ab	1.92Ba	1.46Aa	5,79Aa	5,65Aa
15 d	13.79Aa	10.83Ab	10.07Aa	9.06Ab	3.72Aa	1.77Ab	2,70Bb	5,11Aa
20 d	14.62Aa	11.09Ab	11.45Aa	9.38Ab	3.17Aa	1.71Ab	3,61Bb	5,48Aa

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 5 Conteúdo ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) da glutatona total (GSH+GSSG), reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e balanço redox (GSH/GSSG) da glutatona em folhas de plântulas de cajueiro cultivadas sob condições controle (irrigadas) e submetidas a 10, 15 e 20 dias de estresse hídrico

Seca	GSH+GSSG		GSH		GSSG		GSH/GSSG	
	Controle	Seca	Controle	Seca	Controle	Seca	Controle	Seca
10 d	1,31Ab	2,00Aa	0,96Aa	1,04Aa	0,19Ab	0,59Aa	5,05Aa	1,76Ab
15 d	1,50Ab	1,96Aa	1,02Aa	1,10Aa	0,17Ab	0,54Aa	6,00Aa	2,03Ab
20 d	1,70Ab	2,11Aa	1,11Aa	1,06Aa	0,19Ab	0,58Aa	5,84Aa	1,82Ab

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem ao nível de 0,05 pelo teste de Tukey.

Discussão

O fechamento estomático em plantas submetidas ao estresse hídrico ocorre como consequência da redução do potencial hídrico do solo, e é modulado pelo aumento da síntese e distribuição do ácido abscísico (Fricke et al., 2006). Sob condições de estresse hídrico a restrição estomática, é uma das principais respostas fisiológicas que ocorre na planta, e está diretamente relacionada com a redução da produção de massa seca (García-Sánchez e Syvertsen, 2006). As plântulas de cajueiro apresentaram forte redução da transpiração, associada ao intenso aumento da resistência estomática, ao longo de 20 dias de estresse hídrico. Após 12 dias de seca, a transpiração alcançou restrição superior a 90% e a resistência estomática foi 12 vezes maior, em relação aos respectivos controles.

Os resultados indicam que o estresse hídrico induz forte restrição estomática na espécie. O controle estomático em plantas de café submetidas ao estresse hídrico é considerado um importante mecanismo de adaptação à seca, e está associado com a resistência diferencial à seca na espécie (DaMatta e Ramalho, 2006). A forte restrição estomática observada nas plântulas de cajueiro, sob estresse hídrico, pode ter sido essencial para a manutenção do CRA foliar durante 15 dias (Figura 8D). No entanto, nas plântulas submetidas à seca durante 20 dias ocorreu redução significativa do CRA, indicando que a restrição estomática não impediu a alteração do *status* hídrico foliar, nessa condição. Em plantas expostas à seca, a manutenção do *status* hídrico é essencial para manter o turgor e a expansão celular, além da manutenção do crescimento e resistência à seca (Cattivelli et al., 2008).

Apesar de representar um mecanismo de aclimatação à seca, o fechamento estomático induzido por estresses abióticos limita a fixação do CO₂ e resulta na produção excessiva de EROs (Mittler, 2002). Embora existam na célula como subprodutos do metabolismo aeróbico e atuem na sinalização celular (Date et al., 2000), o excesso de EROs causa peroxidação de lipídios, desnaturação de proteínas e oxidação do DNA, podendo induzir danos irreversíveis de importante componentes celulares (Møller et al., 2007). A taxa fotossintética em plantas do tipo C₃ e C₄ pode ser inibida pela redução do potencial hídrico ou do conteúdo relativo de água, que indicam perda de turgor celular (Cushman, 2001), e a limitação fotossintética apresenta relação direta com o desbalanço da produção e remoção de EROs, resultando em dano oxidativo (Munns e Tester, 2008).

No presente estudo, o conteúdo de H₂O₂ nas plântulas expostas ao estresse hídrico durante 10 e 15 dias não foi alterado, enquanto que naquelas expostas à seca durante 20 dias ocorreu aumento de 21% no conteúdo de H₂O₂ foliar (Tabela 3). Esse resultado pode estar associado à redução do CRA, observado aos 20 dias de estresse hídrico. A perda de turgor observada no tecido foliar indica desidratação e redução de volume celular, que podem funcionar como estímulo para desencadear a produção de EROs (Bray et al., 2000). O CRA foliar em duas espécies de gramíneas, *Festuca arundinacea* e *Poa pratensis*, plantas resistentes à seca, foi intensamente reduzido a partir de 18 dias de exposição ao estresse hídrico, e essa redução ocorreu associada ao intenso aumento do conteúdo de TBARS, indicando peroxidação de lipídios induzida pela seca (Jiang e Huang, 2001).

Apesar do aumento do conteúdo de H₂O₂ foliar nas plântulas de cajueiro, observado aos 20 dias de seca, esse aumento não resultou em dano de membrana, com base na peroxidação de lipídios e no vazamento de eletrólitos. Esse resultado pode ser atribuído à forte proteção oxidativa, enzimática e não enzimática, da espécie. O cajueiro é uma espécie nativa de regiões semi-áridas, onde é largamente cultivado sob condições extensivas nessas áreas, sem nenhuma prática de irrigação. Portanto, essa cultura está constantemente exposta à restrição hídrica em intensidades variadas, típicas dessas regiões. Dessa forma, essa espécie deve possuir diferentes mecanismos bioquímicos e fisiológicos que conferem relativa aclimação às flutuações de umidade.

Uma das principais alterações metabólicas que ocorre em plantas durante o estresse hídrico é a mudança no conteúdo de proteína, que ocorre em função de alterações da síntese e/ou degradação, sendo um dos processos metabólicos associados com a suscetibilidade ou tolerância à seca (Chandler e Robertson, 1994; Ouvrard et al., 1996). O estresse hídrico induziu redução significativa do conteúdo de proteína em importantes culturas, como beterraba açucareira (Shah e Loomis, 1965), trigo (Stutte e Todd, 1969), ervilha (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998) e citrus (Wu et al., 2006). O conteúdo de proteína solúvel em folhas das plântulas de cajueiro foi severamente reduzido pelo estresse hídrico. A partir dos 10 dias de seca o conteúdo de proteína solúvel em folhas das plântulas estressadas foi 30% menor, comparado aos respectivos controles (Figuras 9A e 10A).

Estudos realizados com segmentos de coleótilos de plantas de aveia, utilizando aminoácidos marcados com técnicas radioativas, revelaram que o

estresse hídrico pode resultar na redução quantitativa e qualitativa do conteúdo de proteínas do tecido vegetal (Dhindsa e Cleland, 1975). Os resultados do referido estudo demonstraram que a taxa de incorporação do aminoácido leucina, durante a síntese protéica, foi reduzida em 80% na presença de 300 mM de manitol durante 3 h. Resultados similares foram obtidos utilizando prolina como aminoácido (Cleland, 1967). O estresse hídrico pode afetar diferentemente o conteúdo de algumas proteínas. Em gramíneas submetidas ao estresse hídrico, pode ocorrer a inibição diferencial da síntese de algumas proteínas (Jiang e Huang, 2002). Em plantas de cevada, o conteúdo da redutase de nitrato foi mais afetado pelo estresse hídrico do que o da Rubisco (Huffaker et al., 1970).

Apesar da redução do conteúdo de proteína induzida pela seca, a atividade total da SOD apresentou aumento significativo, indicando que a síntese dessas enzimas foi estimulada durante a seca. As SODs catalisam a remoção do O_2^- e possui papel central na proteção oxidativa durante estresses abióticos, e sua atividade em plantas está relacionada com a resistência ao estresse hídrico (Manivannan et al., 2007; Sharma e Dubey, 2005; Guo et al., 2006). O aumento da atividade total da SOD observado, ocorreu pela indução das isoformas Fe-SOD e Cu/Zn-SOD, que estão localizadas em cloroplastos e peroxissomos (Alscher, 2002), os principais sítios de produção de EROs em plantas, sob condições fisiológicas ou de estresses (Foyer e Noctor, 2003). Dessa forma, o aumento de atividade da SOD no cajueiro, em locais estratégicos da célula, representa um importante mecanismo de resistência ao estresse oxidativo sob condições de seca.

A análise quantitativa do teor de proteína solúvel indica que ocorreu redução diferencial do conteúdo de algumas proteínas frente estresse hídrico, indicado pelo aumento do conteúdo da SOD, redução do conteúdo da CAT e manutenção do conteúdo da APX. A atividade da catalase foi intensamente inibida pelo estresse hídrico em folhas de plântulas de cajueiro (Figuras 9C e 10C). Resultado similar foi observado em gramíneas submetidas ao estresse hídrico de longa duração, durante 30 dias (Liu et al., 2008). A forte redução da atividade da CAT indica que essa proteína está entre aquelas que tiveram a síntese reduzida e/ou a atividade inativada durante o estresse hídrico. A baixa atividade da CAT, associada à não ocorrência de peroxidação de lipídios, indica ainda que essa enzima possui papel secundário na proteção oxidativa nessa espécie sob condições de seca.

As CATs possuem baixa afinidade pelo H_2O_2 , mas apresentam alta atividade catalítica, elevados valores de V_{max} , atuando na remoção do H_2O_2 em concentrações de mM, enquanto as APXs possuem maior afinidade e menor atividade catalítica, operando na sua remoção em concentrações de μM (Mittler, 2002). Apesar da menor afinidade da CAT pelo H_2O_2 , essa enzima é a principal removedora do H_2O_2 no peroxissomo, durante a fotorrespiração, impedindo o acúmulo nessa organela e o vazamento para outros sítios celulares (Foyer e Noctor, 2000). A diferença de afinidade dessas duas enzimas pelo substrato sustenta a hipótese de que as APXs estão mais relacionadas com a modulação fina da concentração do H_2O_2 celular, exercendo controle indireto das vias de sinalização moduladas pelo H_2O_2 , enquanto que as CATs atuam na remoção do peróxido sob condições de explosão oxidativa (Mittler, 2002).

No entanto, sob condições que inibem a atividade das CATs, as APXs podem desempenhar importante papel na eliminação do H_2O_2 , visto que essas duas enzimas são consideradas mecanismos redundantes e compensatórios da proteção oxidativa em plantas (Palatnic et al., 2002). Dessa forma, apesar da atividade constante da APX, não pode ser descartada a hipótese de que a APX foi essencial para a remoção do H_2O_2 , sob condições de baixa atividade da CAT. A manutenção da atividade da APX indica estabilidade dessa enzima sob condições de estresse hídrico no cajueiro. Além disso, considerando a redução de 25% do conteúdo de proteína solúvel, e tendo em vista que a atividade da APX foi apresentada aqui na base de massa fresca, a atividade específica da APX foi estimulada sob condições de estresse hídrico. Portanto, a atividade dessa enzima pode ser importante no controle do acúmulo do H_2O_2 foliar no cajueiro, durante a seca.

As APXs utilizam o ascorbato reduzido (ASA) como doador específico de elétrons para reduzir o H_2O_2 para H_2O e O_2 , liberando ascorbato oxidado (DHA) e alterando o estado redox da célula (Noctor e Foyer, 1998). Além de atuar na eliminação do H_2O_2 via APX, o ASA reage e neutraliza o $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ e hidroperóxidos de lipídios (Shao et al., 2008). No presente estudo, os conteúdos do ascorbato total, reduzido e oxidado foram menores nas plântulas expostas à seca. A redução do conteúdo do ascorbato total pode ocorrer pela redução da sua síntese ou por degradação, que se dá inicialmente pela oxidação do ASA para o DHA, seguido da degradação do DHA para tartarato e oxalato (Noctor e Foyer, 1998). No entanto, não foi verificado aumento no conteúdo de DHA sob condições de seca, indicando

que a redução do conteúdo do ascorbato total pode ter ocorrido também por inibição da sua síntese, provavelmente associada à redução e/ou inibição das enzimas de sua biosíntese, sob condições de seca.

Por outro lado, o papel do ASA como antioxidante sob condições de seca pode ter resultado na redução do seu conteúdo total. As coletas foram realizadas somente a partir dos 10 dias de estresse hídrico. Portanto, essa estabilidade dos níveis do ascorbato pode ser reflexo de um momento metabólico mais estável, e posterior às alterações metabólicas induzidas nos primeiros dias de seca. A redução do ascorbato total em plantas de arroz expostas à seca ocorreu associada ao aumento do O_2^- , seguida da degradação do DHA na célula (Sharma e Dubey, 2005). O DHA é instável sob condições fisiológicas, pH maior que 6,5, e pode ser rapidamente degradado para tartarato e oxalato, caso não seja regenerado para ASA (Noctor e Foyer, 1998). Dessa forma, a redução do *pool* total desse antioxidante em plântulas de cajueiro expostas ao estresse hídrico pode indicar seu papel como um protetor antioxidante não enzimático.

A glutathiona (GSH) e o ascorbato (ASA) são os principais antioxidantes não enzimáticos da célula vegetal (Noctor e Foyer, 1998). O conteúdo da glutathiona total foi maior nas plântulas submetidas ao estresse, enquanto o conteúdo da GSH não foi afetado pela seca. No entanto, o conteúdo da forma oxidada (GSSG) foi duas vezes maior sob condições de seca, indicando consumo de GSH nas plântulas submetidas ao estresse hídrico e conseqüente acúmulo da forma oxidada. A GSH representa a principal forma de grupos SH não protéico na célula, e atua como uma barreira entre os grupos SH de proteínas e as EROs, sob condições fisiológicas ou de estresses (Foyer e Noctor, 2005). Esse sistema de tamponamento redox é essencial para impedir a oxidação e a desnaturação de proteínas, além de modular a atividade de enzimas ativadas pela alteração do seu estado redox, como várias enzimas do estroma dos cloroplastos (Buchanan e Balmer, 2005).

Além de atuar diretamente na proteção oxidativa, a GSH é componente chave da via metabólica do ascorbato-glutathiona, responsável pela remoção do H_2O_2 e regeneração do *pool* de ASA na célula (Foyer e Noctor, 2000). No geral, os estudos demonstram que o aumento da GSSG ocorre associado à redução da GSH, afetando o estado redox GSH/GSSG (Law et al., 1983; Song et al., 2005). No entanto, em plântulas de cajueiro expostas à seca por 10, 15 e 20 dias, foi observado aumento do conteúdo da glutathiona total, associado à manutenção da

GSH, e o incremento da GSSG. Esse panorama pode indicar um equilíbrio dinâmico do sistema glutationa na proteção oxidativa, onde o aumento da glutationa total ocorreu para manter o conteúdo de GSH constante, sob condições de seca. Dessa forma, o aumento da forma GSSG representa o consumo da GSH sintetizada *de novo*, sob condições de estresse hídrico.

Em conclusão, os dados demonstram que plantas de cajueiro possuem alta capacidade de aclimação ao estresse hídrico, combinando a restrição estomática, evitando desidratação excessiva, com uma eficiente proteção oxidativa enzimática (SOD e APX) e não enzimática (GSH e ASA), resultando no controle do acúmulo de H₂O₂ e impedindo a peroxidação de lipídios e dano de membranas na espécie. Indicam ainda, que a atividade da CAT parece ser menos importante na eliminação do H₂O₂ sob condições de seca.

Bibliografia

AGNEW, C. e WARREN, A. A frame work for talking drought and land degradation, **Journal Arid Environment**, v. 33, p. 309–320. 1996.

ALSCHER, R.G., ERTURK, N. e HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341. 2002.

ASADA, K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 50, p. 601–639. 1999.

BEAUCHAMP, C. e FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 44, p. 276–287. 1971.

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

BRAY, E.A., BAILEY, S.J. e WERETILNYK, E. Responses to Abiotic Stresses. In: B.B. Buchana, W. Grisse, et al., (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: America Society of Plant Physiologists. v. 2000, p. 1158-1203.

BUCHANAN, B.B. e BALMER, Y. Redox Regulation: A Broadening Horizon. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 56, p. 187–220. 2005.

CATTIVELLI, L., RIZZA, F., BADECK, F.W., MAZZUCOTELLI, E., MASTRANGELO, A.M., FRANZIA, E., MARÉ, CATERINA., TONDELLI, A. e STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v. 105, p. 1–14. 2008.

CHANDLER, P.M. e ROBERTSON, M. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 45, p. 113-141. 1994.

CHEESEMAN, J.M., Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 10, 2435-2444. 2006.

- CUSHMAN, J.C. Crasulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. **Plant Physiol**, v. 127, p. 1439–1448. 2001.
- DAMATTA, F.M. e RAMALHO, J.D.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 55–81. 2006.
- DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVÁ, E., MONTAGU, M.V., INZÉ, D. e BREUSEGEM, F.V. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 779–795. 2000.
- DHINDSA, R.S. e CLELAND, R.E. Water Stress and Protein Synthesis I. Differential inhibition of protein synthesis. **Plant Physiology**, v. 55, p. 778-781. 1975.
- FIDALGO, F., SANTOS, A., SANTOS, I. e SALEMA, R. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Ann. Appl. Biol.**, v. 145, p. 185-192. 2004.
- FOYER, C. e NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, cell and Environmental**, v. 28, p. 1056-1071. 2005.
- FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355–364. 2003.
- FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Tansley Review No. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytol**, v. 146, p. 359-388. 2000.
- FOYER, C.H., LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J.F. e SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling, **Physiol. Plant**, v. 100, p. 241–254. 1997.
- FRICKE, W., AKHIYAROVA, G., WEI, W., ALEXANDERSSON, E. e MILLER, A. The short-term growth response to salt of the developing barley leaf. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1079–95. 2006.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, F. e SYVERTSEN, J.P. Salinity tolerance of cleopatra mandarin and carrizo citrange citrus rootstock seedlings is affected by CO₂ enrichment during growth. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 131, n. 1, p. 24-31. 2006.
- GIANNOPOLOTIS, C.N. e RIES, S.K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314. 1977.
- GOMEZ, L.D., NOCTOR, G., KNIGHT, M. e FOYER, C. The intercellular distribution of glutathione synthesis and its response to chilling in maize. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1662-1671. 2004.
- GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem**, v. 106, p. 207-211. 1980.
- GUO, Z., OU, W., LU, S. e ZHONG, Q. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 828–836. 2006.
- HAVIR, E.A. e MCHALE, N.A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco-Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455. 1987.
- HEATH, R.L. e PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n.1, p. 189-198. 1968.
- HUFFAKER, R.C., RADIN, G., KLEINKOPF, E. e COX, E. L. Effects of mild water stress on enzymes of nitrate assimilation and of the carboxylative phase of photosynthesis in barley. **Crop Sci.**, v. 10, p. 471-474. 1970.

- IMLAY, J.A. Pathways of oxidative damage. **Annu Ver Microbiol**, v. 57, p. 395–418. 2003.
- ITURBE-ORMAETXE, I., ESCUREDO, P.R., ARRESE-IGOR, C. e BECANA, M. Oxidative Damage in Pea Plants Exposed to Water Deficit or Paraquat. **Plant Physiol**, v. 116, p. 173-181. 1998.
- JIANG, Y. e HUANG, B. Drought e Heat Stress Injury to Two Cool-Season Turfgrasses in Relation to Antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation. **Crop Sci**, v. 41, p. 436–442. 2001.
- JIANG, Y. e HUANG, B. Protein alterations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid. **Crop Science**, v. 42, p. 202-207. 2002.
- KAMPFENKEL, K., MONTAGU, M.V. e INZÉ, R. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical biochemistry**, v. 225, p. 165-167. 1995.
- KUZNIAK, E. e SKLODOWSKA, M. Compartment-specific role of the ascorbate–glutathione cycle in the response of tomato leaf cells to *Botrytis cinerea* infection. **J. Exp. Bot**, v. 56, p. 921–933. 2005.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680. 1970.
- LAW, M.Y., CHARLES, S.A. e HALLIWELL, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. **Biochem J.**, v. 210, p. 899–903. 1983.
- LEVITT, J. Responses of Plants to Environmental Stress, Vol II. Water, Radiation, Salt and Other Stresses. **Academic Press**, New York. 1980.
- LIU, J., XIE, X., DU, J., SUN, J. e BAI, X. Effects of simultaneous drought and heat stress on Kentucky bluegrass. **Scientia Horticulturae**, v. 115, p. 190-195. 2008.
- MANIVANNAN, P., JALEEL, A.C., KISHOREKUMAR, A., SANKAR, B., SOMASUNDARAM, R., SRIDHARAN, R. e PANNEERSELVAM, R. Changes in antioxidant metabolism of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. by propiconazole under water deficit stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 57, p. 69-74. 2007.
- MARTINEZ, C.A., LOUREIRO, M.E., OLIVA, M.A. e MAESRRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilubum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Sci**, v. 160, p. 505-515. 2001.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410. 2002.
- MØLLER, I.M., JENSEN, P.E. e HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 58, p. 459–81. 2007.
- MUNNS, R. e TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 59, p. 651-81. 2008.
- NAKANO, Y. e ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 1068-1072. 1981.
- NAKANO, Y. e ASADA K. Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. **Plant Cell Physiol**, v. 28, p. 131–40. 1987.
- NOCTOR, G. e FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annu. Rev. Plant Physiol**. *Plant Mol. Biol*, v. 49, p. 249-79. 1998.
- NOCTOR, G. Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. **Plant Cell Environ**, v. 29, p. 409-425. 2006.

- OUVRARD, O., CELLIER, F., FERRARE, K., TOUSCH, D., LAMAZE, T., DUPUIS, J.M. e CASSE-DELBART, F. Identification and expression of water stress-and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. **Plant Mol. Boil.**, v. 31, p. 819-829. 1996.
- PALATNIC, J.F., VALLE, E.M., FEDERICO, M.L., GOMEZ, L.D., MRLCHIORRE, M.N., PALEO, A.D., CARRILLO, N. e ACEVEDO, A. Status of antioxidant metabolites and enzymes in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Science**, v. 162, n. 3, p. 363-371. 2002.
- SCANDALIOS J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol**, v. 101, p. 1-7. 1993.
- SHAH, C. B. e LOOMIS, R.W. Ribonucleic acid and protein metabolism in sugar beet during drought. **Physiol. Plant.**, v. 18, p. 240-254. 1965.
- SHANAHAN, J.F., EDWARDS, I.B., QUICK, J.S. e FENWICK, J.R. Membrane thermostability and heat tolerance of spring wheat. **Crop Sci.**, v. 30, p. 247-251. 1990
- SHAO, H.B., CHU, L.Y., LU, Z.H. e KANG, C.M. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 8-14. 2008.
- SHAO, H.B., LIANG, Z.S. e SHAO, M.A. Adaptation of higher plants to stresses and stress signal transduction. **Acta Ecol Sin.**, v 25, p. 1871-1882. 2005a.
- SHAO, H.B., LIANG, Z.S. e SHAO, M.A. Dynamic changes of anti-oxidative enzymes of 10 wheat genotypes at soil water deficits. **Biointerfaces**, v. 42, n.3-4, p. 187-195. 2005b.
- SHARMA, P. e DUBEY, R.S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 46, p. 209-221. 2005.
- SONG, X.S., HU, W.H., MAO, W.H., OGWENO, J.O., ZHOU, Y.H e YU, J.Q. Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1082-1088. 2005.
- STUTTE, C. A. e TODD, G.W. Some enzyme and protein changes associated with water stress in wheat leaves. **Crop. Sci.**, v. 9, p. 510-512. 1969.
- THORUP, O.A., STROLE, W.B. e LEAVELL., B.S. A method for the localization of catalase on starch gels. **J Lab Clin Med**, v. 58, p. 122-128. 1961.
- WU, Q.S., ZOU, Y.N. e XIA, R.X. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. 166-172. 2006.
- ZIMMERMAM, P., HEINLEIN, C., ORENDI, G. e ZENTGRA, U. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant, cell and Environment**, v. 29, p. 1049-1060. 2006.

CAPÍTULO – III

RESPOSTA OXIDATIVA DE FOLHAS DE PLÂNTULAS DE CAJUEIRO SUBMETIDAS A TEMPERATURAS ELEVADAS

Introdução

O estresse térmico, induzido por temperaturas elevadas, causa uma série de alterações morfofisiológicas e bioquímicas nas plantas que afeta intensamente a produtividade vegetal. O estresse térmico ocorre pelo aumento da temperatura acima de um limiar e por período de tempo suficiente para causar dano irreversível no desenvolvimento vegetal. No geral, elevações transientes da temperatura entre 10 e 15 °C, acima da temperatura ambiental, é considerado um choque térmico, enquanto o estresse térmico é uma função complexa, envolvendo interações de intensidade, duração e taxa de incremento da temperatura (Wahid et al., 2007).

Redução fotossintética e indução da fotorrespiração são alguns dos distúrbios metabólicos em plantas atribuídos ao excesso de calor. Diferente dos estresses hídrico e salino, que afetam a eficiência fotossintética pelo fechamento estomático, temperaturas elevadas limitam a fotossíntese por alterações bioquímicas diretas (Crafts-Brandner e Salvucci, 2002; Wise et al., 2004). Em plantas C₃, a inibição fotossintética que ocorre durante a exposição das plantas a temperaturas relativamente altas é atribuída ao aumento de atividade de oxigenase da rubisco (Sharkey, 2005). O excesso de calor aumenta a solubilidade do O₂ mais do que a do CO₂ e favorece o incremento da relação O₂/CO₂, reduzindo a capacidade carboxilase da rubisco e favorecendo a de oxigenase, condições propícias para fotorrespiração (Deuce e Neuburger, 1999).

Além de alterar a relação O₂/CO₂ e induzir fotorrespiração, as alterações nas reações fotoquímicas, na membrana dos tilacóides, e no metabolismo do carbono, no estoma dos cloroplastos, são distúrbios primários do metabolismo vegetal induzidos por temperaturas elevadas (Wise et al., 2004). A atividade do fotossistema II (PSII) é intensamente reduzida, ou até mesmo inibida, pelo calor (Camejo et al., 2005), resposta atribuída a propriedades da membrana do tilacóide, onde está localizado o PSII (McDonald e Paulsen, 1997). O estresse térmico pode induzir a dissociação do complexo protéico de liberação de O₂, resultando em desbalanço do fluxo de elétrons fotoquímico entre esse complexo e os centros de reação do PSII e PSI, levando à geração de espécies reativas de oxigênio (Wahid et al., 2007).

As EROs geradas durante o estresse térmico incluem o radical superóxido (\dot{O}_2^-), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil ($\dot{O}H$), distúrbios metabólicos induzidos por temperaturas elevadas (Liu e Huang, 2000). O \dot{O}_2^- e o

H_2O_2 são formados durante o fluxo de elétrons em diferentes sítios celulares e são menos reativos que o $\cdot OH$, que é formado pela combinação do O_2^- com o H_2O_2 na presença de Fe^{+3} , na reação de Haber-Weiss (Dat et al., 2000). O excesso de EROs causa peroxidação auto catalítica de lipídios, induzindo perda de permeabilidade de membrana (Xu et al., 2006), oxidação da guanina, causando mutação do DNA, e peroxidação dos resíduos de cisteína, metionina, histidina, prolina, triptofano e lisina, causando desnaturação e inativação de proteínas (Møller et al., 2007).

Para evitar danos oxidativos, a célula vegetal possui um complexo sistema antioxidantes não enzimáticos, como o sistema ascorbato/glutationa, e enzimáticos, constituído pelas enzimas SODs, APXs, CATs e redutases de dehidroascorbato (DHAR), de monodehidroascorbato (MDHR) e de glutaciona (GR) (Noctor e Foyer, 1998). As SODs são consideradas a primeira linha de defesa oxidativa da célula e catalisam a dismutação do O_2^- para H_2O_2 e O_2 (Alscher et al., 2002). As APXs são as principais peroxidases na remoção do H_2O_2 na célula (Foyer, 1996), que atuando em sincronia com as enzimas DHAR, MDHR e GR, realizam a remoção de H_2O_2 no ciclo do ascorbato-glutationa (Halliwell, 1987). As CATs possuem menor afinidade pelo H_2O_2 comparado as APXs, mas são essenciais na remoção de H_2O_2 oriundo da fotorrespiração (Foyer e Noctor, 2000).

A atividade da CAT foi duas vezes maior em gramíneas (Jiang e Huang, 2001) e batata (Lopez-Delgado et al., 1998) expostas à temperatura elevada, indicando seu papel protetor contra danos oxidativos induzidos por estresse térmico nessas espécies. Plantas de *Citrus* submetidas a temperaturas elevadas apresentaram indução do sistema enzimático SOD-CAT-APX-DHAR, associado ao aumento do O_2^- e H_2O_2 no tecido foliar (Guo et al., 2006). O aumento de expressão da GR conferiu maior tolerância a fotoinibição e maior proteção oxidativa, em função do significativo aumento do conteúdo de ascorbato e glutaciona nos cloroplastos (Foyer et al., 1995). Plântulas de cajueiro apresentaram redução da atividade de carboxilação do mesofilo acima de 35 °C, indicando perda de atividade enzimática fotossintética e indução de fotorrespiração (Souza et al., 2005).

No presente estudo, plântulas de cajueiro foram submetidas a temperaturas crescentes visando associar o excesso de calor com a indução de estresse oxidativo na espécie. O limiar de temperatura que induz dano oxidativo e os mecanismos de injúrias e a proteção oxidativa na espécie, frente ao estresse térmico, são discutidos.

Material e métodos

Material vegetal e aplicação do tratamento

Sementes de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.), clone CCP 06, fornecidas pela EMBRAPA-CNPAT, foram submetidas à esterilização com hipoclorito de sódio 5% (v/v) e semeadas em vasos de 2,0 L, contendo vermiculita, em casa de vegetação. Durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas, a umidade do substrato foi mantida próxima da capacidade de campo, por irrigações freqüentes com água destilada. Após 35 dias do plantio plântulas homogêneas, apresentando 8 folhas expandidas, foram submetidas às temperaturas de 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C (± 1), por fotoperíodo de 12 h, em câmara com condições controladas de luminosidade ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e umidade relativa ($65 \pm 5\%$). Para aplicação dos tratamentos as plântulas foram transferidas para câmara B.O.D. (CIENITEC/modelo 708) no final da tarde (18:00 h), onde permaneceram por 12 h no escuro em temperatura ambiente, e no início do dia seguinte (06:00 h) foram submetidas aos respectivos tratamentos. Após 9 h de tratamento (15:00 h) foram realizadas medidas da transpiração e da resistência estomática, com auxílio de um porômetro portátil, e ao final do fotoperíodo (18:00 h) foram coletados discos foliares para determinar o conteúdo relativo de água, o dano de membrana e realizar o coramento *in situ* do H_2O_2 . Em seguida as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado conforme Fidalgo et al., (2004). Ao final do experimento, foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro) e a massa fresca (MF) determinada imediatamente. Em seguida, os discos foram imersos em 30 ml de água deionizada por 8 h, em placas de petri, e após breve secagem dos discos em papel toalha, para remover o excesso de água, foi determinada a massa túrgida (MT). A massa seca (MS) foi determinada após secagem dos discos a 70°C, durante 48 h em estufa, e o CRA estimado pela seguinte relação: $[(MT - MS)/(MF - MS)] \times 100$.

Dano de membrana

O dano de membrana foi determinado conforme Shanahan et al., (1990). Ao final do ensaio foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro) foram imersos em 10 ml de água deionizada em tubos fechados e incubados a 40 °C durante 30 min e determinada a condutividade elétrica da solução (C1). Em seguida, os tubos foram incubados a 100 °C por 1 h e após atingir a temperatura ambiente foi determinada a condutividade elétrica da solução (C2). O dano de membrana (DM) foi estimado pela relação, $(C1/C2) \times 100$.

Determinação in situ do H_2O_2

A detecção *in situ* do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi realizada conforme Schraudner et al., (1998). Discos foliares (10 mm de diâmetro) foram coletados e imersos em 20 mL de solução de

diaminobenzidina (1 mg/mL) em tubos de ensaio. O meio líquido contendo os discos foi submetido a um vácuo por 5 min e mantido por 8 h no escuro. Em seguida os discos foram lavados, secos em papel de filtro e submetidos a despigmentação com etano 80% em banho maria sob 70 °C, durante 30 min. Em seguida os discos foram fixados numa solução de etanol: ácido láctico: glicerol 3:1:1 (v/v/v) e fotografadas

Conteúdo do peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinado conforme Cheeseman et al., (2006). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas na presença de N₂ líquido até obtenção de farinha, seguido da adição de 0,75 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,4, contendo KCN 5 mM e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 13.000 x g por 20 min a 4°C e alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 0,9 ml de meio de reação contendo 100 µM de FeSO₄, 250 µM de (NH₄)₂SO₄, 25 mM de H₂SO₄, 100 µM de alaranjado de xilenol e 99 mM de sorbitol. A mistura foi incubada a 25 °C por 30 min e em seguida realizadas leituras de absorvância a 560 nm. As concentrações de peróxido de hidrogênio foram obtidas a partir de curva padrão, utilizando H₂O₂, e os dados expressos em µmol g⁻¹ MF.

Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme Heath e Packer (1968). Amostras (0,1 g) de folhas frescas foram macerados em almofariz na presença de N₂ líquido, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 12.000 x g, durante 15 min a 4 °C, e 0,5 ml do sobrenadante foram adicionados a 2,0 ml do meio de reação contendo TCA 20% (p/v) e TBA 0,5% (p/v), em tubos hermeticamente fechados. A reação foi aquecida em banho maria a 95 °C, durante 1 h, e em seguida foi interrompida em banho de gelo. Após 30 min a 25 °C, foram realizadas leituras de absorvância a 532 e 660 nm, e depois de subtraídas as absorvâncias obtidas a 660 das obtidas a 532 nm, o conteúdo de TBARS foi estimado utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ e expresso em nmol g⁻¹ MF.

Conteúdos de glutatona total, reduzida e oxidada

Os conteúdos de glutatona total (GSH+GSSG) e das formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram determinados conforme Griffith (1980). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 5% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min a 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação. Para determinação da GSH alíquotas de 0,2 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 2,6 ml de tampão fosfato de sódio 150 mM (pH 7,4), 1 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) e 0,2 ml de 5,5'-ditio-bis 2-ácido-nitrobenzóico (DTNB) 30 mM, em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). O conteúdo de glutatona total (GSH + GSSG) foi determinado pela adição de 0,2 ml do sobrenadante seguido da adição de 1,6

ml de tampão fosfato 150 mM (pH 7,4), contendo 1 unidade de GR, 1,0 ml de NADPH 0,15 mM, 1,0 ml de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) e 0,2 ml de DTNB 30 mM, em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). Em seguida a reação foi acondicionada em banho maria a 30°C, durante 10min. Ao final, foram realizadas leituras de absorvância a 412 nm e os conteúdos de GSH e GSH + GSSG estimados com base em curva padrão, de GSH, e expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. O conteúdo da GSSG foi obtido pela subtração da glutatona reduzida da total.

Conteúdos de ascorbato total, reduzido e oxidado

Os conteúdos de ascorbato total (ASA+DHA), e das formas reduzida (ASA), e oxidada (DHA) foram determinados conforme Kampfenkel et al., (1995). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min a 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação. Para o ascorbato reduzido alíquotas de 0,1 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,3 ml de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,4), 0,1 ml de água destilada, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H₂PO₄ 45%, 0,4 ml de biperidil 4% e 0,2 ml de FeCl₃. O conteúdo de ascorbato total foi determinado pela adição de 0,1 ml do extrato ao meio de reação contendo 0,1 ml de DTT 10 mM (em tampão fosfato 200 mM), 0,2 ml e tampão fosfato de potássio 200mM (pH 7,4), 0,1 ml de N-etilmaleiamida 0,5%, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H₂PO₄ 45%, 0,4 ml de biperidil 4% e 0,2 ml de FeCl₃. A reação foi acondicionada em banho maria a 40°C, durante 30 min, e em seguida foram realizadas leituras de absorvância a 525 nm. Os conteúdos do ascorbato total (ASA+DHA) e reduzido (ASA) foram estimados com base em curva padrão, utilizando L – ascorbato, e expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. O conteúdo do DHA foi obtido pela subtração do ascorbato reduzido do total.

Extração de proteínas

A extração de proteína foi realizada conforme Zimmermam et al., (2006), com modificações. Amostra de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido seguido da adição de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), contendo 30 mM de DTT, 20% de glicerol e 3% de PEG-6000. Para determinação da atividade das enzimas peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido, o pH do tampão foi alterado para 7,0 e o DTT foi substituído por ascorbato 1 mM. Após a extração, o extrato foi centrifugado a 14.000 x g durante 30 min, a 4 °C. O conteúdo de proteínas solúveis foi determinado conforme Bradford (1976) e estimado com base em curva padrão, utilizando BSA.

Eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de SDS (PAGE-SDS)

Para as PAGE-SDS alíquota de 20 μL de extrato protéico foram misturas a 20 μL do tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol, SDS 10% e azul de boromofenol) e 20 μL da mistura foi

aplicado em cada poço. Os géis apresentavam a seguinte constituição: 12,5% (main gel) e 5% (stacking gel), e as eletroforeses foram realizadas a 125 V, 20 mA e 10 W, por cada gel, usando o tampão de corrida (Tris 25 mM/Glicina 192 mM, pH 8,3 e SDS 10%). Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com o *Comassie brilliant blue* R-250 0,025%, em ácido acético 10% e metanol 40%, durante 2 h. Em seguida os géis foram descorados em ácido acético 10% e metanol 40% (Laemmli, 1970).

Atividade enzimática

A atividade da peroxidase de ascorbato (APX; EC: 1.11.1.1) foi determinada conforme método descrito por Nakano e Asada (1981). Alíquotas de 0,1 ml de extrato protéico foram adicionadas ao meio de reação composto de 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo 0,5 mM de ácido ascórbico. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ (30 mM) ao meio de reação e acompanhada pelo decaimento da absorbância a 290 nm em espectrofotômetro durante 300 seg, com leitura sucessivas em intervalos de 30 seg. A atividade da APX foi estimada utilizando o coeficiente e de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ para o ascorbato, em 290 nm, e expressa como μmol AsA g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da catalase (CAT; EC: 1.11.1.6) foi determinada conforme Haver e McHale, (1987). Alíquotas de 0,05 ml de extrato protéico foram adicionadas a 2,95 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), contendo H₂O₂ (20 mM). A reação ocorreu a 30°C e foi acompanhado pelo decaimento da absorbância a 240 nm durante 300 seg, com leituras sucessivas a cada 30 seg. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ para o H₂O₂, em 240 nm, e expressa em nmol H₂O₂ g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da dismutase de superóxido (SOD; EC: 1.15.1.1) foi determinada conforme metodologia descrita por Gianopolitis e Ries (1977). Alíquotas de 0,1 ml do extrato protéico foram transferidas para meio de reação, em tubos protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 μM de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM de riboflavina e rápida transferência dos tubos, sem a proteção da luz, para câmara iluminada por lâmpada de 30 wats (30 μmol de fótons m⁻² s⁻¹), durante 6 minutos. A reação foi interrompida pelo desligamento da luz, os tubos foram revestidos por filme escuro e realizadas leituras a 540nm. A atividade foi estimada com base na inibição da redução do NBT, definindo-se uma unidade de atividade como a quantidade da enzima necessária para inibir 50% da fotoredução (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade foi expressa em U.A. g⁻¹ MF min⁻¹.

Zimograma e caracterização das isoenzimas da dismutase de superóxido (SOD)

Inicialmente, as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida 10% sob condição nativa (PAGE nativa). Alíquotas (± 10 μl) de extrato protéico foram misturadas com tampão de aplicação (Tris 25 mM/glicina 190 mM, pH 8,3), na proporção 1/1 (v/v), e submetidas à eletroforese (125 V, 20 mA e 10 W por gel). Após a separação das proteínas, os géis foram revelados para

atividade da SOD conforme Beauchamp e Fridovich (1971). Inicialmente foram incubados em 50 ml de NBT 2 mM por 15 min, rapidamente lavados com água destilada e novamente incubados, na ausência da luz, em 50 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), contendo TEMED 28 mM e riboflavina (0,1 mg/ml), por 15 min. Em seguida, os géis foram lavados com água destilada e expostos à luz, em caixa boxe contendo lâmpada fluorescente de 30 wats ($30 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), para indução da reação fotoquímica. Após revelação das bandas acromáticas a reação foi interrompida pelo desligamento da luz e sucessivas lavagens dos géis com água. A diferenciação das isoformas da SOD foi realizada pela prévia incubação dos géis por 15 min em tampão fosfato de potássio contendo H_2O_2 (5 mM) ou KCN (2 mM), conforme Martinez et al., (2001). As isoformas Cu/Zn-SOD e Fe-SOD são sensíveis ao H_2O_2 , a Fe-SOD é resistente ao cianeto, enquanto a Mn-SOD é resistente ao H_2O_2 e ao CN^- (Scandalios, 1993). Após a pré-incubação para inibição específica das isoformas os géis foram revelados conforme descrito acima.

Zimograma da catalase (CAT)

Após a separação das proteínas em gel de poliacrilamida a 7,5% os géis foram revelados para atividade de catalases conforme Thorup et al., (1961). Alíquotas (50 μl) de extrato protéico foram misturadas ao tampão de aplicação (Tris 25 mM/glicina 190 mM, pH 8,3), na proporção 1/1 (v/v) e 20 μl da mistura foi submetido à PAGE nativa (125 V, 20 mA e 10 W por gel). Após a eletroforese os géis foram pré-incubados em H_2O_2 0,3% (p/v) por 20 min, em agitação suave, seguido de rápida lavagem com água destilada e imersão em solução de FeCl_3 0,5% (p/v) e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ 0,5% (p/v). Após o surgimento das bandas acromáticas sobre o fundo verde dos géis a reação foi interrompida por lavagens com água destilada. As soluções de FeCl_3 e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ foram preparadas isoladamente, mantidas no escuro, e misturadas somente no momento da aplicação sobre os géis.

Delineamento estatístico e análise dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos, temperaturas de 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C. Cada tratamento foi representado por três repetições independentes, consistindo de um vaso contendo uma plântula, num total de 18 parcelas experimentais. Os dados foram submetidos ao teste F a 0,05 de probabilidade por meio de análise de variância e as médias das variáveis submetidas ao teste de Tukey em mesmo nível de significância.

Resultados

Respostas fisiológicas de plântulas de cajueiro submetidas a temperaturas crescentes

No presente estudo, plântulas de cajueiro foram submetidas a intensidades crescentes de temperatura. As plântulas foram expostas ao tratamento térmico por 12 h, sob condições controladas de luminosidade e umidade relativa do ar. As plântulas submetidas aos tratamentos de 25, 30, 35, 40 e 45 °C não apresentaram alterações morfológicas visíveis, quando avaliadas a perda de turgor e a presença de pontos cloróticos e/ou necróticos no limbo foliar. No entanto, as plântulas submetidas a 50 °C apresentaram perda de turgor foliar e murchamento da região apical da parte aérea, a partir de 9 h de tratamento (Figura 11).

A transpiração das plântulas foi intensamente aumentada pelo incremento da temperatura (Figura 12A). As plântulas submetidas a 30 e 35 °C apresentaram acréscimos de 36% e 71%, respectivamente, da transpiração, comparadas ao controle (25 °C durante 9 h). Nas plântulas expostas a 40 e 45°C o aumento da transpiração foi cerca de 3 vezes, enquanto naquelas submetidas a 50 °C foi apenas 1 vez maior, comparadas ao controle, e 43% menor em relação àquelas submetidas a 40 e 45 °C. A resistência estomática das plântulas apresentou decréscimos proporcionais ao incremento da temperatura (Figura 12B). As plântulas expostas a 30 e 35 °C apresentaram reduções de 15% da resistência, enquanto naquelas expostas a 40 e 45 °C a redução foi de 40%. Entretanto, a resistência estomática das plântulas submetidas a 50 °C foi 50 % maior comparado ao controle.

O conteúdo relativo de água foliar das plântulas submetidas a temperaturas entre 25 e 45 °C durante 12 h não apresentou mudanças significativas. No entanto, nas plântulas expostas a 50 °C o conteúdo relativo de água foi significativamente menor, comparado aos demais tratamentos (Figura 12C). A exposição das plântulas ao incremento de temperatura por 12 h não afetou a integridade de membrana foliar, medida pelo vazamento de eletrólitos (Figura 12D).

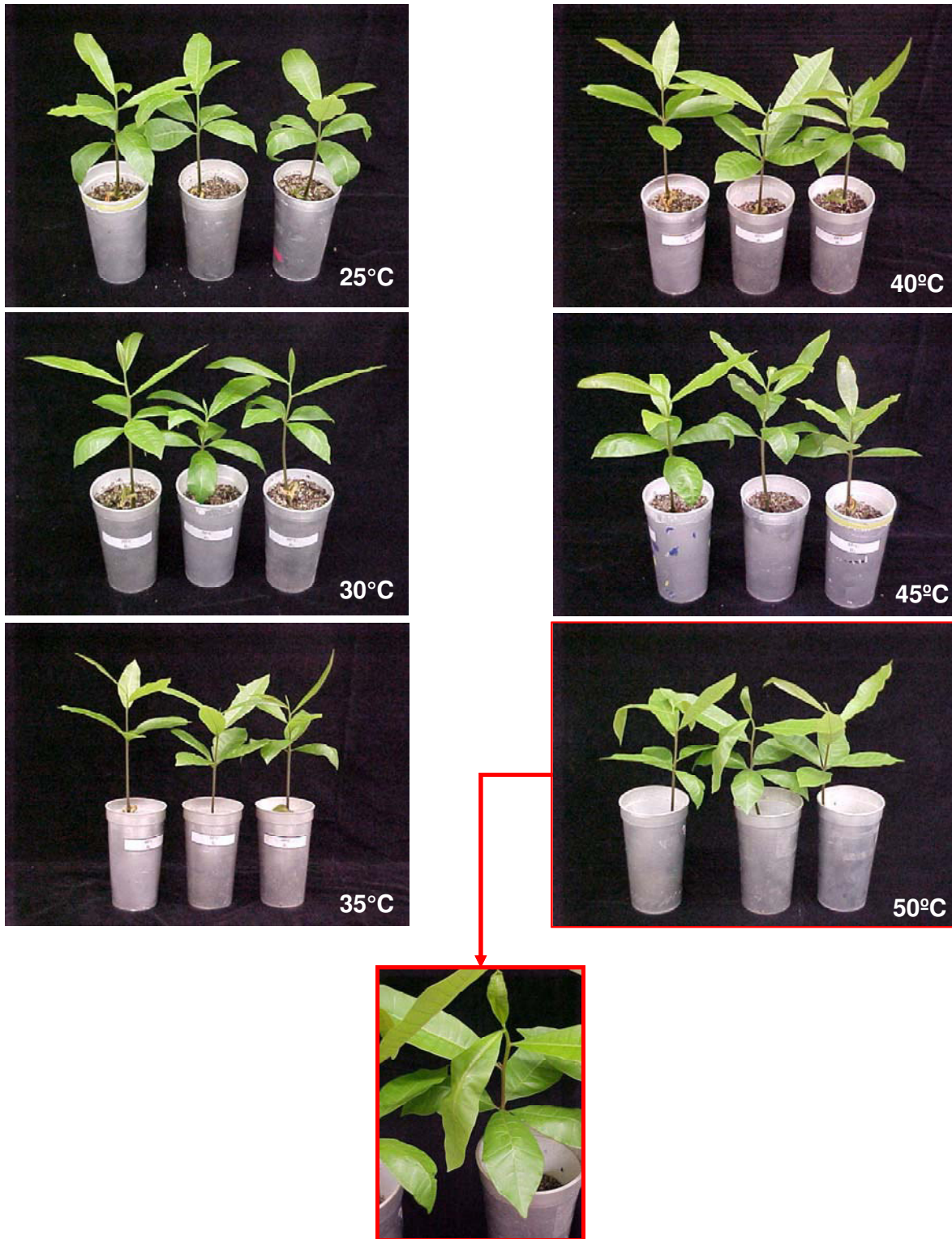


Figura 11 Aspecto visual das plântulas de cajueiro submetidas às temperaturas de 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C, durante 12 horas. O detalhe demonstra a perda de turgor das folhas e do segmento apical do caule ocorrido a partir das 9 horas de exposição das plântulas ao tratamento de 50 °C.

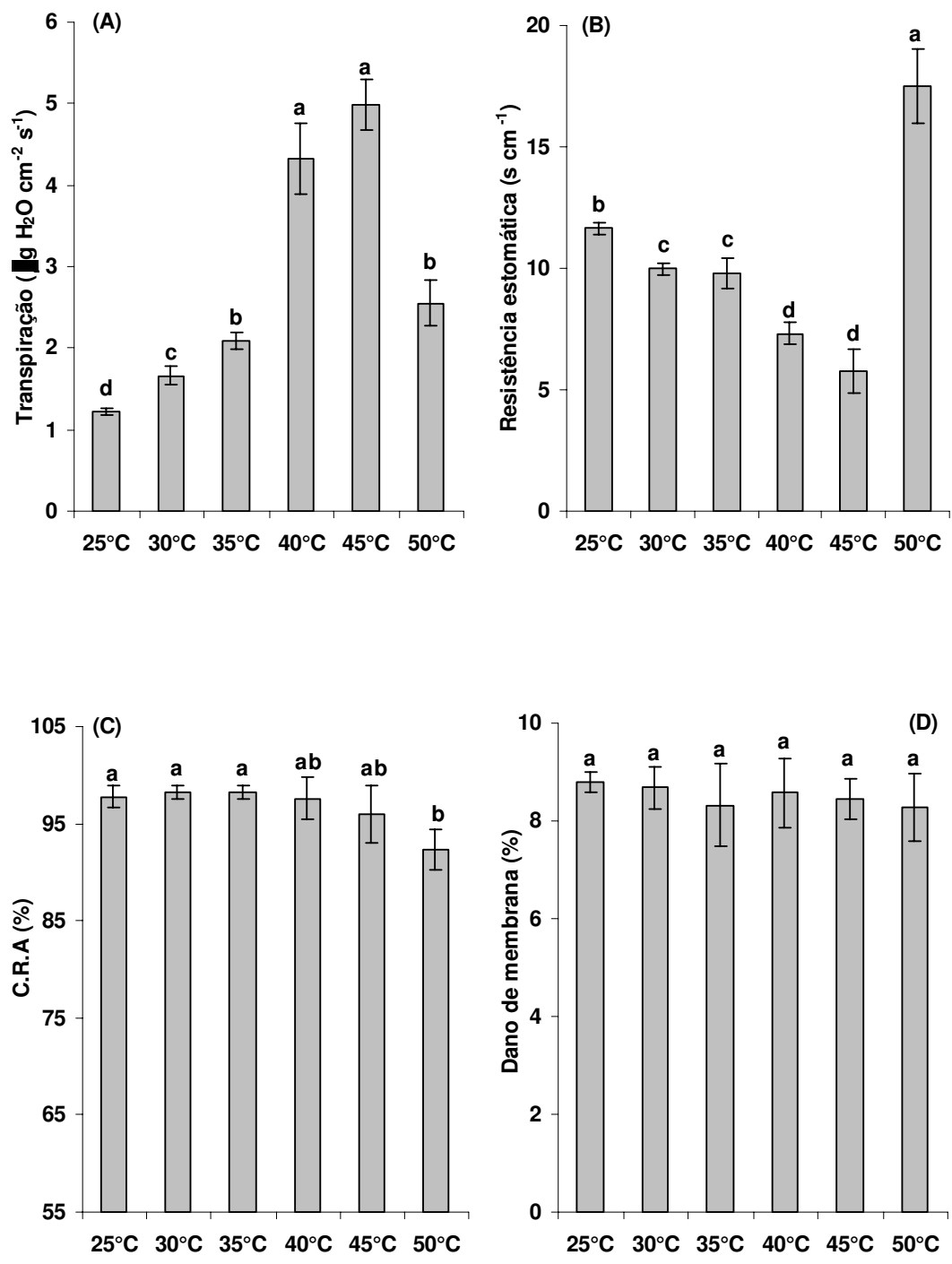


Figura 12 (A) Transpiração, (B) resistência estomática, (C) conteúdo relativo de água e (C) dano de membrana em plântulas de cajueiro submetidas a temperaturas crescentes, 25; 30; 35; 40; 45 e 50 °C, durante 12 horas. Os dados são médias de três repetições independentes.

Alterações oxidativas induzidas pelo aumento da temperatura em plântulas de cajueiro

O aumento de temperatura a partir de 45 °C resultou em incrementos significativos do conteúdo de H₂O₂ foliar (Figura 13A). As plântulas exposta a 45 e 50 °C apresentaram aumento de cerca de 60% do conteúdo de H₂O₂, com relação ao controle a 25 °C, e o coramento histoquímico do H₂O₂ *in situ*, em discos foliares, apresentou resultado compatível com o acúmulo (Figura 13B). As plântulas expostas a temperaturas a partir de 35 °C apresentaram aumento significativo do conteúdo de TBARS foliar (Figura 13C).

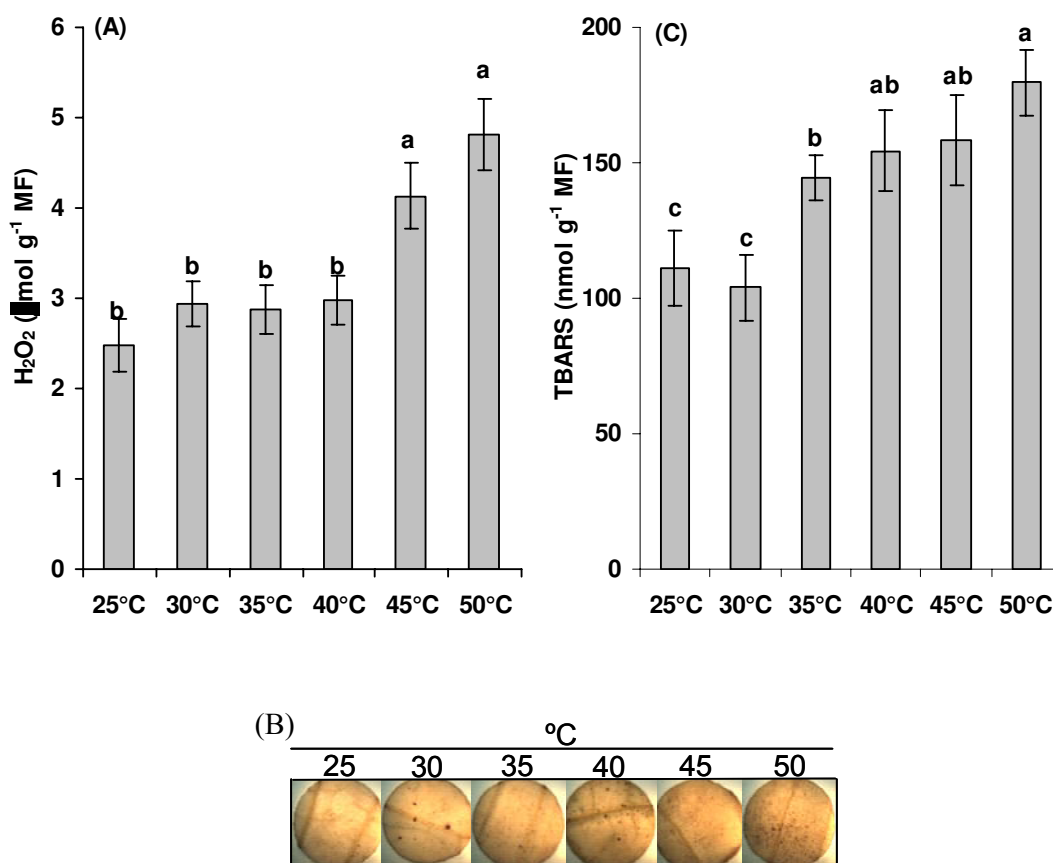


Figura 13 (A) Conteúdo e (B) coramento histoquímico *in situ* do H₂O₂, e (C) conteúdo de TBARS em folhas de plântulas de cajueiro submetidas as temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C, durante 12 horas. Os dados são médias de três repetições independentes.

Mudanças na atividade de enzimas antioxidativas em plântulas de cajueiro submetidas à temperatura crescente

O conteúdo de proteína solúvel e as atividades das enzimas oxidativas SOD, CAT e APX, apresentaram aumentos significativos com o incremento da temperatura (Figura 14). O conteúdo de proteína solúvel em folhas das plântulas expostas aos tratamentos de 30, 35 e 40 °C foi cerca de 28 % maior em relação ao controle, enquanto que nas plântulas submetidas aos tratamentos de 45 e 50 °C esse aumento foi cerca de 65% e 100%, respectivamente (Figura 14A). O aumento do conteúdo de proteína solúvel foi compatível com a mudança de intensidade do perfil dos polipeptídios, com todos apresentando aumento de intensidade, particularmente àqueles com massa molecular próxima de 50 kDa (Figura 15A).

A atividade da SOD apresentou acréscimo proporcional ao incremento da temperatura (Figuras 14B e 15B). Nas plântulas submetidas aos tratamentos de 35, 40, 45 e 50°C a atividade da SOD foi 85% maior comparada às plântulas expostas a 25 °C (controle) ou 30 °C (Figura 14B). Compatível com a atividade total da SOD, o aumento das regiões descoloridas do gel, indicando atividade, demonstra que todas as isoformas da SOD foram induzidas pelo aumento da temperatura (Figura 15B). A inibição específica das diferentes isoformas, utilizando H₂O₂ ou KCN, revelou que todas as isoformas identificadas são Cu/Zn-SOD.

A atividade da catalase apresentou acréscimo proporcional ao incremento da temperatura (Figura 14C). Nas plântulas expostas a 30 °C a atividade da CAT foi similar ao controle, enquanto nas plântulas submetidas aos tratamentos de 35, 40, 45 e 50 °C a atividade da CAT apresentou aumentos de 78, 152, 226 e 317%, respectivamente, comparado ao controle. A atividade em gel da CAT apresentou padrão similar, com aumento de intensidade na banda, indicando atividade CAT no gel em função da temperatura (Figura 15C). A atividade da APX foi estimulada em 20% a partir de 30 °C (Figura 14D).

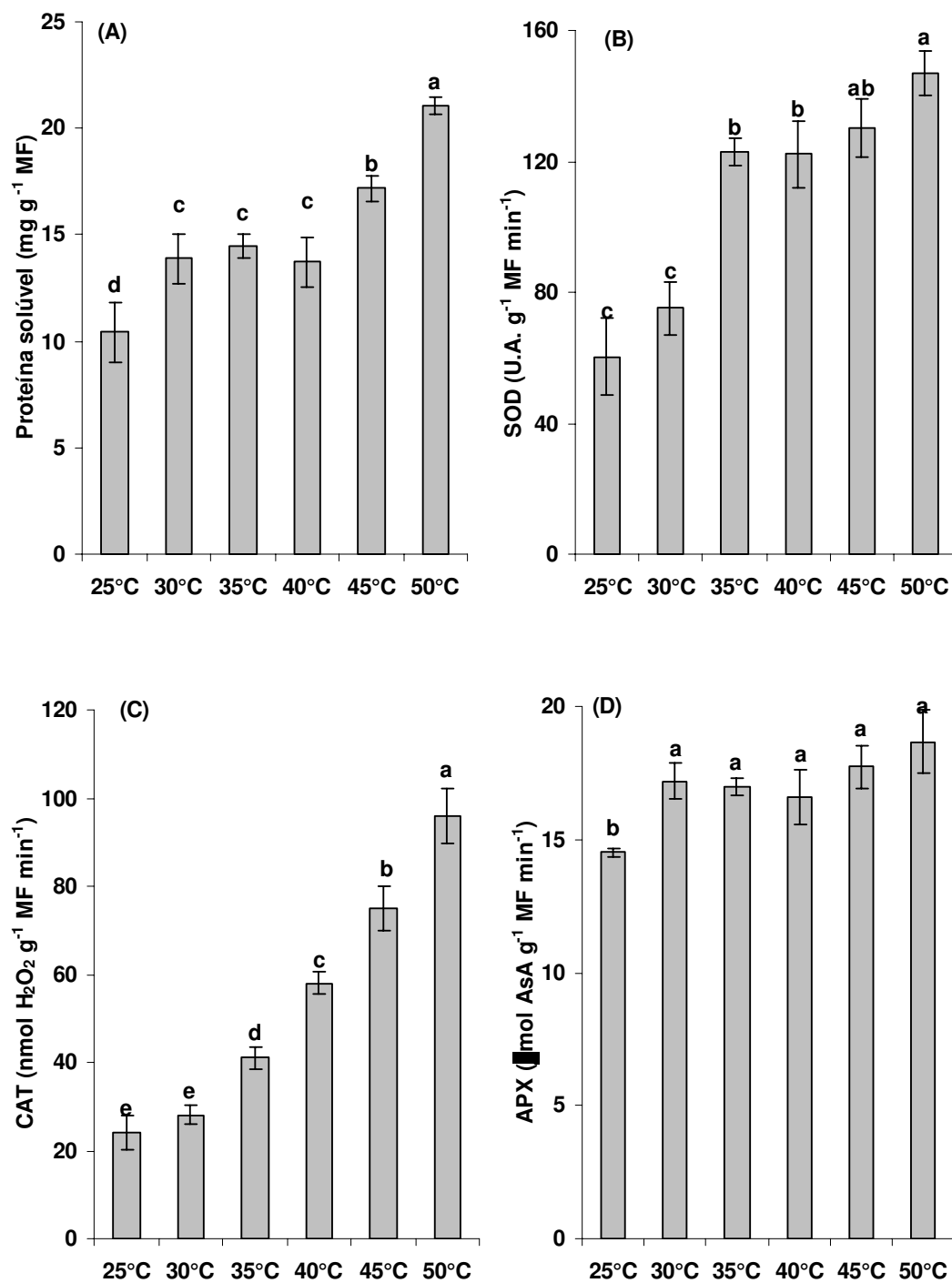


Figura 14 (A) Conteúdo de proteína solúvel e atividades das enzimas (B) dismutase de superóxido, (C) catalase e (D) peroxidase de ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro submetidas a temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C, durante 12 horas. Os dados são médias de três repetições independentes.

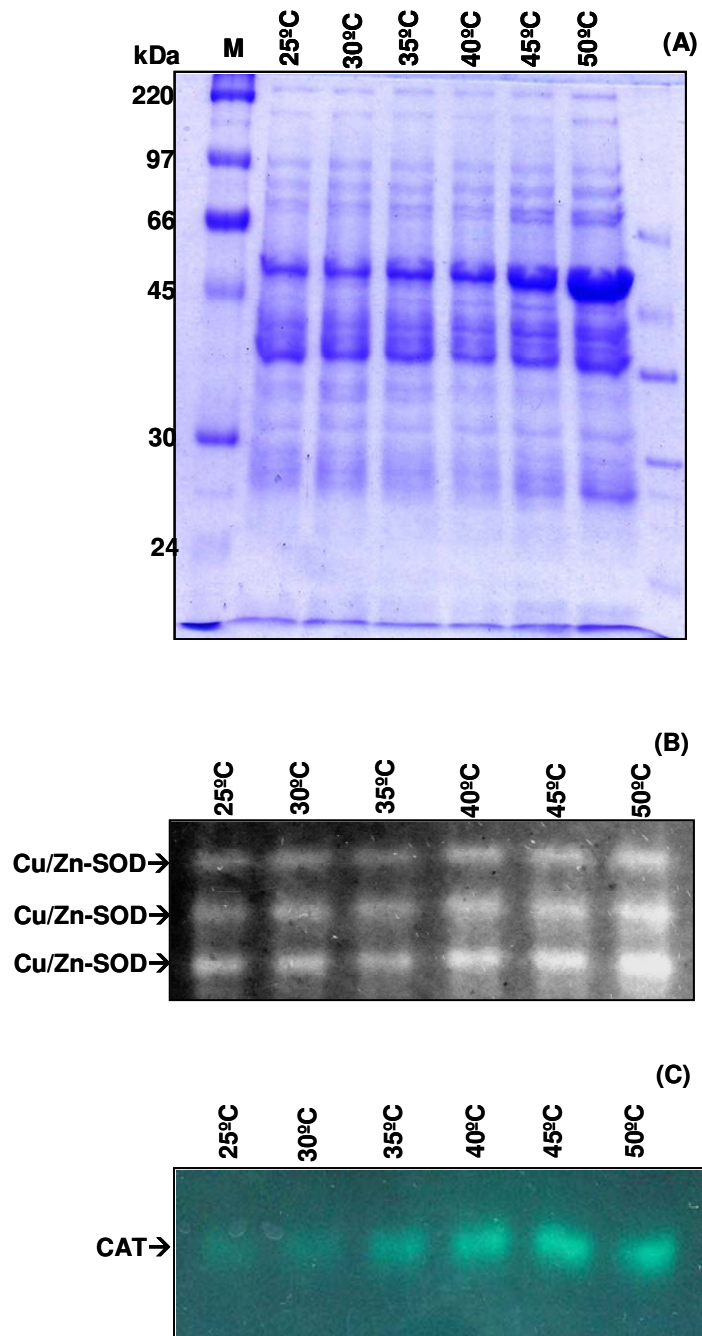


Figura 15 (A) SDS-PAGE e zimograma para (B) dismutases de superóxido e (C) catalases em folhas de plântulas de cajueiro submetidas as temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C, durante 12 horas. Em todas as eletroforeses foram aplicados 20µl de extrato protéico em cada poço, ±40 µg de proteína, exceto para o zimograma da SOD que foram aplicados 10 µl, ±20 µg de proteína.

Mudanças do conteúdo de ascorbato e glutathiona em plântulas de cajueiro submetidas a temperaturas crescentes

O aumento da temperatura induziu mudanças significativas nos conteúdos e no balanço redox dos antioxidantes ascorbato e glutathiona (Tabela 6). O conteúdo do ascorbato total não foi alterado pelo incremento da temperatura. No entanto, as plântulas expostas a 45 e 50 °C, durante 12 h, apresentaram redução de 35% no conteúdo de ascorbato reduzido, comparado às plântulas submetidas aos demais tratamentos. O conteúdo de ascorbato oxidado nas plântulas expostas a 40, 45 e 50 °C foi aumentado em 28, 49 e 42%, respectivamente, comparadas ao controle. O balanço redox do ascorbato (ASA/DHA) foi reduzido em 26% nas plântulas expostas a 40 °C, e em mais de 40% naquelas submetidas a 45 e 50 °C (Tabela 6).

O conteúdo de glutathiona total foi significativamente aumentado pelo incremento da temperatura (Tabela 7). Nas plântulas submetidas aos tratamentos de 45 e 50 °C, o conteúdo da glutathiona total foi 80% maior, comparado aos demais tratamentos. O conteúdo da glutathiona reduzida não foi afetado pelo aumento da temperatura. Por outro lado, o conteúdo da glutathiona oxidada nas plântulas expostas aos tratamentos de 40, 45 e 50 °C foi aumentado em 1,08, 2,09 e 2,38 vezes, respectivamente, comparado aos demais tratamentos. O balanço redox da glutathiona (GSH/GSSG) nas plântulas expostas a 40, 45 e 50 °C apresentou redução média de 40% (Tabela 7).

Tabela 6 Conteúdos do ascorbato total (ASA+DHA), reduzido (ASA), oxidado (DHA) e balanço redox do ascorbato (ASA/DHA) em folhas de plântulas de cajueiro expostas a temperaturas crescentes, durante 12 horas

Tratamento °C	AsA+DHA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	AsA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	DHA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	AsA/DHA (%)
25	7,28a	4,78a	2,89b	1,66a (100)
30	7,21a	4,79a	2,42b	1,97a (118)
35	7,73a	5,07a	2,66b	1,90a (114)
40	7,88a	4,58a	3,71a	1,23b (74)
45	7,66a	2,96b	4,31a	0,68c (40)
50	6,98a	3,24b	4,11a	0,94c (56)

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 7 Conteúdos da glutathiona total (GSH+GSSG), reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e balanço redox da glutathiona (GSH/GSSG) em folhas de plântulas de cajueiro expostas a temperatura crescente, durante 12 horas

Tratamento °C	GSH+GSSG ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	GSH ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	GSSG ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	GSH/GSSG (%)
25	2,01b	1,28a	0,73c	1,75a (100)
30	1,98b	1,45a	0,76c	1,60a (91)
35	2,19b	1,70a	0,82c	1,67a (95)
40	2,95ab	1,43a	1,52b	0,94b (53)
45	3,65a	1,39a	2,26a	0,61b (34)
50	3,95a	1,48a	2,47a	0,59b (33)

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey.

Discussão

O *status* hídrico foliar é uma das variáveis fisiológicas mais afetadas pelas mudanças de intensidade da temperatura (Mazorra et al., 2002). Sob condições favoráveis de umidade do solo, as plantas mantêm o *status* hídrico constante, independente da temperatura, enquanto que sob condições de restrição hídrica esse equilíbrio é afetado (Simões-Araujo et al., 2003). Plântulas de cajueiro apresentaram um intenso aumento da transpiração quando expostas à temperatura crescente, até 45 °C, que ocorreu associado à manutenção no CRA, indicando que o aumento do fluxo transpiratório foi essencial para manutenção do turgor celular e equilíbrio do *status* hídrico foliar. Além de manter o CRA, o aumento da condutância estomática, em plantas expostas a temperaturas altas, atua na dissipação do calor auxiliando na redução da temperatura foliar (Rizhsky et al., 2002; Wahid et al., 2007).

Apesar do intenso aumento da transpiração observado entre 25 e 45 °C, nas plântulas expostas a 50 °C a transpiração foi reduzida, e a resistência estomática aumentou significativamente, indicando que temperaturas acima de 45 °C rompem a capacidade de aclimação dessa espécie ao calor. Reforçando essa hipótese, o CRA nas plântulas expostas a 50 °C foi reduzido significativamente, comparado aos demais tratamentos. Esse resultado indica que em temperaturas acima de 45 °C plântulas de cajueiro não são capazes de ajustar o fluxo transpiratório à hidratação foliar, resultando em perda de turgor foliar e murchamento da parte aérea. No entanto, esses sintomas morfológicos da ocorrência de estresse térmico foram totalmente recuperados após 12 h de recuperação a 25 °C, mostrando que o tratamento de 50 °C por 12 h não foi letal para as plântulas (dados não mostrados).

Além da desidratação e do aquecimento do tecido, temperaturas ambientais elevadas podem causar estresse oxidativo. Em plantas de metabolismo C₃ e C₄, o aumento de temperatura acima dos valores ótimos para o desenvolvimento resulta na redução da fotossíntese (Crafts-Brandner e Salvucci, 2002). Essa redução ocorre pelo aumento de atividade de oxigenase da Rubisco, devido a menor especificidade dessa enzima pelo CO₂ sob temperaturas elevadas, e maior taxa de difusão do O₂, resultando em incremento da atividade fotorrespiratória com perdas significativas de carbono pelo ciclo do glicolato (Jordan e Ogren, 1984). Além do aumento da fotorrespiração, temperaturas elevadas afetam reações fotoquímicas na membrana dos tilacóides e o metabolismo do C no estroma dos cloroplastos (Wise et al., 2004),

levando à produção excessiva do O_2^- , H_2O_2 e HO^- , indicativos de injúrias oxidativas em plantas submetidas a temperaturas elevadas (Liu e Huang, 2000).

No presente estudo, plântulas de cajueiro submetidas a temperaturas crescentes, entre 25 e 40 °C, não apresentaram aumento do conteúdo de peróxido de hidrogênio foliar. No entanto, as plântulas expostas a 45 e 50 °C apresentaram intenso acúmulo de H_2O_2 nas folhas (Figuras 13A e B). O aumento de H_2O_2 em plantas C_3 , como o cajueiro, submetidas ao estresse de temperaturas altas pode estar relacionado ao incremento da atividade fotorrespiratória, que ocorre pelo aumento da atividade de oxigenase da Rubisco (Sage e Sharkey, 1987). Plântulas de cajueiro apresentaram máxima atividade fotossintética em temperaturas entre 25 e 35 °C, e redução da atividade de carboxilação do mesófilo foliar, indicando perda de atividade enzimática fotossintética, acima de 35 °C (Souza et al., 2005). Portanto, o aumento do conteúdo de H_2O_2 foliar induzido pelo excesso de calor na espécie pode ser atribuído à indução de fotorrespiração.

O acúmulo de H_2O_2 em plantas durante estresses abióticos resulta na peroxidação de lipídios e perda de estabilidade de membranas (Møller et al., 2007). Quando dois cultivares de *Citrus* foram submetidos a 38 °C durante 15 dias, foi observado aumento de 100% no conteúdo de H_2O_2 (Guo et al., 2006). No presente estudo, o aumento no conteúdo do H_2O_2 induzido pelo estresse térmico em folhas de plântulas de cajueiro ocorreu associado ao aumento da peroxidação de lipídios, indicando que o excesso de calor causa estresse oxidativo na espécie. Em plantas de *Phalaenopsis* foi observado intenso aumento na peroxidação de lipídios de membranas, após exposição a 40 °C durante 48 horas (Ali et al., 2005). Dois genótipos de gramínea submetidos a 35 °C durante 42 dias apresentaram aumento significativo da peroxidação de lipídios (Huang et al., 2001).

O aumento da temperatura induziu um intenso acúmulo de proteína solúvel no tecido foliar, que ocorreu associado a um significativo aumento de atividade das enzimas oxidativas SOD, CAT e APX. A atividade da SOD apresentou aumento de 100% a partir de 35 °C. Essa enzima promove a remoção do O_2^- e está localizada em diferentes sítios celulares (Foyer e Noctor, 2000). O estudo das isoformas da SOD demonstrou que o aumento da atividade total dessa enzima ocorreu em função de incrementos de atividade das três isoformas Cu/Zn-SOD, induzidos pelo estresse térmico, as quais estão presentes nos cloroplastos e/ou no citosol (Alscher et al., 2002). Dessa forma, o aumento de atividade da SOD localizado no cloroplasto

representa um importante mecanismo de proteção oxidativa sob condições de temperaturas elevadas no cajueiro. Em plantas de *Chenopodium murale*, a isoforma Cu/Zn-SOD, presente no estroma dos cloroplastos apresentou maior estabilidade ao calor do que a isoforma Cu/Zn-SOD do tilacóide, e foi responsável pela proteção cloroplástica durante o estresse térmico (Khanna-Chopra e Sabarinath, 2004).

A CAT é a principal removedora de H_2O_2 durante a fotorrespiração (Mittler, 2002). Nas plântulas de cajueiro submetidas ao aumento de temperatura, ocorreu intenso aumento de atividade da CAT, enzima responsável pela remoção do H_2O_2 no peroxissomo durante a fotorrespiração. A ação dessa enzima impede o acúmulo excessivo de H_2O_2 nessa organela, além de prevenir seu vazamento para outros sítios celulares, evitando dano oxidativo (Foyer e Noctor, 2000). Os resultados mostram que o aumento de atividade da CAT, até 40 °C, ocorreu associado à manutenção do conteúdo de H_2O_2 foliar. No entanto, o aumento de atividade da CAT nas plântulas expostas a 45 e 50 °C não impediu o acúmulo do H_2O_2 , resultando em peroxidação de lipídios e indicando a ocorrência de fotorrespiração induzida pelo excesso de calor no cajueiro.

A APX está presente em diferentes organelas celulares e é responsável pela remoção do excesso de H_2O_2 , sob condições fisiológicas ou de estresse (Foyer e Noctor, 2003). As plântulas de cajueiro apresentaram um significativo aumento de atividade da APX a partir de 30 °C, sugerindo que o estresse térmico apresenta alta capacidade de indução desse sistema enzimático na espécie. As APXs possuem alta afinidade pelo H_2O_2 e atuam na sua eliminação em concentrações da ordem de μM . Em função da alta afinidade pelo substrato, a APX pode modular indiretamente eventos de sinalização controlados por flutuações suaves da concentração de H_2O_2 (Mittler, 2002; Buchanan e Balmer, 2005). Dessa forma, o aumento de atividade da APX já a partir de 30 °C pode indicar que essa enzima está relacionada não somente com a remoção do excesso de H_2O_2 , mas, também, pode atuar na modulação de outras vias metabólicas responsáveis pela proteção contra o estresse térmico na espécie.

As APXs promovem a redução do H_2O_2 utilizando ascorbato reduzido (ASA) como doador específico de elétrons, produzindo ascorbato oxidado (DHA) e alterando o estado redox (ASA/DHA) do sistema ascorbato (Noctor e Foyer, 1998). No presente estudo, o aumento e a manutenção da atividade da APX a partir de 30 °C ocorreu associado ao incremento do ascorbato oxidado e significativa redução do

estado redox desse antioxidante a partir de 40 °C. Esse resultado sugere o papel do ascorbato como doador de elétrons, via atividade da APX, para remoção do H₂O₂ celular em plântulas de cajueiro submetidas ao estresse térmico. A redução do conteúdo do ascorbato em plantas de *Cucumis sativus*, submetidas ao estresse de temperatura alta, ocorreu associado ao aumento de atividade das APXs mitocondrial, citosólica e, principalmente, da isoforma do estroma dos cloroplastos (Song et al., 2005).

A glutathiona (GSH) e o ASA são os principais antioxidantes não enzimáticos da célula vegetal (Noctor e Foyer, 1998). O conteúdo da glutathiona total nas plântulas de cajueiro aumentou a partir de 40 °C, o conteúdo da glutathiona reduzida (GSH) não foi afetado, e o teor da oxidada (GSSG) apresentou intenso aumento com o incremento da temperatura, indicando consumo de GSH nas plântulas submetidas ao estresse térmico (Tabela 7). A GSH representa a principal forma de grupos SH não protéicos na célula, e atua como uma barreira entre os grupos SH de proteínas e as EROs, sob condições fisiológicas ou de estresses (Foyer e Noctor, 2005). Esse sistema de tamponamento redox é essencial para impedir a oxidação e a desnaturação de proteínas, além modular a atividade de enzimas ativadas pela alteração do seu estado redox, como várias enzimas do estroma dos cloroplastos (Buchanan e Balmer, 2005).

No geral, os estudos demonstram que o aumento da GSSG ocorre associado à redução da GSH, afetando o estado redox GSH/GSSG (Law et al., 1983; Song et al., 2005). As alterações induzidas pelo estresse térmico no sistema glutathiona em plântulas de cajueiro resultou em redução de 60% do estado redox (GSH/GSSG) da glutathiona. A análise desse balanço sugere a ocorrência de um equilíbrio dinâmico do sistema glutathiona frente ao estresse térmico, onde a síntese do *pool* da glutathiona total ocorreu para repor o conteúdo da GSH celular, sob condições de estresse térmico. Dessa forma, o aumento da forma GSSG, induzido pelo calor, pode representar o consumo da GSH que é sintetizada *de novo*, sob condições de estresse, que contribuiu para manutenção constante da GSH e maior fornecimento de GSH para proteção oxidativa celular.

Além de atuar diretamente na proteção oxidativa, a GSH é componente chave da via metabólica do ascorbato-glutathiona, responsável pela remoção do H₂O₂ e regeneração do *pool* de ASA (Foyer e Noctor, 2000). Nessa via metabólica, que atua na remoção do H₂O₂ consumindo ASA, a GSH doa elétrons para redução do DHA,

regenerando o ASA numa reação catalisada pela DHAR (Noctor e Foyer, 1998). A GSSG é reduzida para GSH pela GR, que utiliza NADPH como fonte de elétrons (Halliwell, 1987). No entanto, plântulas de cajueiro submetidas a temperaturas crescentes apresentaram aumento de GSSG e manutenção da GSH, sugerindo limitação de redução da GSSG para GSH e indicando principalmente redução de atividade da GR sob estresse térmico. Por outro lado, o incremento da GSSG pode indicar consumo de GSH por outras peroxidases, como peroxidases de glutatona (GPX) e glutatona S-transferases (GST), importantes vias removedoras de EROs da célula vegetal (Roxas et al., 1997; Tausz et al., 2004).

Em conclusão, os resultados demonstram que temperaturas acima de 35 °C induzem estresse oxidativo no cajueiro, associado ao acúmulo excessivo de H₂O₂ e peroxidação de lipídios, indicando ocorrência de fotorrespiração. Indicam, ainda, que a proteção oxidativa na espécie, frente a temperaturas elevadas, ocorre pela indução coordenada dos sistemas antioxidantes enzimáticos (SOD-CAT-APX) e não enzimáticos (ASA e GSH).

Bibliografia

ALI, M.B., HAHN, E.J. e PAEK, K.Y. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 213–223. 2005.

ALSCHER, R.G., ERTURK, N. e HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341. 2002.

FIDALGO, F., SANTOS, A., SANTOS, I. e SALEMA, R. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Ann. Appl. Biol.**, v. 145, p. 185-192. 2004.

BEAUCHAMP, C. e FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 44, p. 276–287. 1971.

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

BUCHANAN, B.B. e BALMER, Y. Redox Regulation: A Broadening Horizon. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 56, p. 187–220. 2005.

CAMEJO, D., RODRÍGUEZ, P., MORALES, M.A., DELLÁMICO, J.M., TORRECILLAS, A. e ALARCÓN, J.J. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 281–289. 2005.

CHEESSEMAN, J.M., Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 10, 2435-2444. 2006.

CRAFTS-BRANDNER, S.J. e SALVUCCI, M.E. Sensitivity of Photosynthesis in a C₄ Plant, Maize, to Heat Stress. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1773-1780. 2002.

DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVA, E., MONTAGU, M.V., INZE, D. e BREUSEGEM, F.V. Dual action of the active oxygen species during plant stress Responses. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 779-795. 2000.

DEUCE, R e NEUBURGER, M. Biochemical dissection of photorespiration. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 2, p. 214-222. 1999.

FOYER, C. e NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, cell and Environmental**, v. 28, p. 1056-1071. 2005.

FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355-364. 2003

FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Tansley Review No. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytol**, v. 146, p. 359-388. 2000.

FOYER, C.H., SOURIAU, N., PERRET, S., LELANDAIS, M., KUNERT, K.J., PRUVOST, C. e JOUANIN, L. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. **Plant Physiol**, v. 109, p. 1047-1057. 1995.

FOYER, C.H. Free radical processes in plants. **Biochem Soc Trans**, v. 24, p. 427-434. 1996.

GIANNOPOLOTIS, C.N. e RIES, S.K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314. 1977.

GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem**, v. 106, p. 207-211. 1980.

GUO, Y.P., ZHOU, H.F. e ZHANG, L.C. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. *Scientia Horticulturae*, v. 108, p. 260-267. 2006.

HALLIWELL, B. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. **Chem Phys Lipids**, v. 44, p. 327-340. 1987.

HAVIR, E.A. e MCHALE, N.A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco-Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455. 1987.

HEATH, R.L. e PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n.1, p. 189-198. 1968.

HUANG, B., LIU, X. e XU, Q. Supraoptimal Soil Temperatures Induced Oxidative Stress in Leaves of Creeping Bentgrass Cultivars Differing in Heat Tolerance. **Crop Sci.**, v. 41, p. 430-435. 2001.

JIANG, Y. e HUANG, B. Effect of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool season grasses. **J. Exp. Bot.**, v. 52, p. 341-349. 2001.

JORDAN, D.V. e OGREN, W.L. The CO₂/O₂ specificity of ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: dependence on ribulose bisphosphate concentration, pH and temperature. **Planta**, v. 161, p. 308-313. 1984.

KAMPFENKEL, K., MONTAGU, M.V. e INZE, R. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical biochemistry**, v. 225, p. 165-167. 1995.

- KHANNA-CHOPRA, R. e SABARINATH, S. Heat-stable chloroplastic Cu/Zn-SOD in *Chenopodium murale*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 320, p. 1187–1192. 2004.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680. 1970.
- LAW, M.Y., CHARLES, S.A. e HALLIWELL, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem J.*, v. 210, p. 899–903. 1983.
- LIU, X. e HUANG, B. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bent grass. *Crop Sci.*, v. 40, p. 503–510. 2000.
- LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J.F., FOYER, C.H. E e SCOTT, J.A. Induction of thermo-tolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *J. Exp. Bot.*, v. 49, p. 713-720. 1998.
- MARTINEZ, C.A., LOUREIRO, M.E., OLIVA, M.A. e MAESRRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilubum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Sci*, v. 160, p. 505-515. 2001.
- MAZORRA, L.M., NUNEZ, M., ECHERARRIA, E., COLL, F. e SÁNCHEZ-BLANCO, M.J. Influence of brassinosteroids and antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. *Plant Biol.*, v. 45, p. 593–596. 2002.
- MCDONALD, G.K. e PAULSEN, G.M. High temperature effects on photosynthesis and water relations of grain legumes. *Plant Soil*, v. 196, p. 47–58. 1997.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science*, v. 7, n. 9, p. 405-410. 2002.
- MØLLER, I.M., JENSEN, P.E. e HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol*, v. 58, p. 459–81. 2007.
- NAKANO, Y. e ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, v. 22, p. 1068-1072. 1981.
- NOCTOR, G. e FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, v. 49, p. 249–79. 1998.
- RIZHSKY, L., LIANG, H. e MITTLER, R. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiology*, v. 130, p. 1143–1151. 2002.
- ROXAS, V.P., SMITH, R.K., ALLEN, E.R. e ALLEN, R.D. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology*, v. 15, p. 968-991. 1997.
- SAGE, R.F. e SHARKEY, T.D. The effect of temperature on the occurrence of O₂ and CO₂ insensitive photosynthesis in field growth plant. *Plant Physiology*, v. 84, p. 658-664. 1987.
- SCANDALIOS J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol*, v. 101, p. 1-7. 1993.
- SCHRAUDNER, M., MOEDER, W. WIESE, C. CAMP, W.V., INZÉ, D. e LANGEBARTELS, C. Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3, *Plant Journal*, v.16, p. 235–245. 1998.
- SHARKEY, T.D. Effects of moderate heat stress on photosynthesis: importance of thylakoid reactions, rubisco deactivation, reactive oxygen species, and thermotolerance provided by isoprene. *Plant Cell Environ.*, v. 28, p. 269–277. 2005.

- SIMOES-ARAUJO, J.L., RUMJANEK, N.G. e MARGIS-PINHEIRO, M. Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. **Brazilian. J. Plant Physiol.**, v. 15, p. 33–41. 2003.
- SONG, X.S., HU, W.H., MAO, W.H., OGWENO, J.O., ZHOU, Y.H e YU, J.Q. Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1082–1088. 2005.
- SOUZA, R.P., RIBEIRO, R.V., MACHADO, E.C., OLIVEIRA, R.F. e SILVEIRA, J.A.G. Photosynthetic responses of young cashew plants to varying environmental conditions. **Revista Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, v. 40, n. 8, p. 753-744. 2005.
- TAUSZ, M., SIRCELJ, H. e GRILL, D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 404, p. 1955–1962. 2004.
- THORUP, O.A., STROLE, W.B. e LEAVELL., B.S. A method for the localization of catalase on starch gels. **J Lab Clin Med**, v. 58, p. 122–128. 1961.
- WAHID, A., GELANI, S., ASHRAF, M. e FOOLAD, M.R. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 199–223. 2007.
- WISE, R.R., OLSON, A.J., SCHRADER, S.M. e SHARKEY, T.D. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. **Plant Cell Environ.**, v. 27, p. 717–724. 2004.
- XU, S., LI, J., ZHANG, X., WEI, H. e CUI, L. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. **Environ. Exp. Bot.**, v. 56, p. 274–285. 2006.
- ZIMMERMAM, P., HEINLEIN, C., ORENDI, G. e ZENTGRA, U. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant, cell and Environment**, v. 29, p. 1049-1060. 2006.

CAPÍTULO - IV

RESPOSTA OXIDATIVA EM FOLHAS DE PLÂNTULAS DE CAJUEIRO AOS ESTRESSES COMBINADOS DE SALINIDADE E DE TEMPERATURA ELEVADA

Introdução

Salinidade e temperaturas elevadas são estresses abióticos comumente relacionados com a indução de estresse oxidativo em plantas (Wang et al., 2003). A salinidade reduz a fotossíntese pelo fechamento estomático, limitando a fixação de CO₂ (Munns e Tester, 2008), enquanto temperaturas altas afetam a fotossíntese por alterações bioquímicas diretas, pelo aumento da atividade oxigenase da rubisco e pela dissociação do complexo de evolução do O₂ nos cloroplastos, alterando o fluxo de elétrons entre os PSII e PSI (Wahid et al., 2007). Nos dois casos, pode ocorrer produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), por fotorrespiração ou por redução direta do O₂ (Mittler, 2002).

As EROs geradas durante os estresses salino e térmico incluem o radical superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil (OH⁻), sintomas típicos de injúrias celulares durante temperaturas elevadas (Liu e Huang, 2000). O O₂⁻ e o H₂O₂ são formados durante o fluxo de elétrons em diferentes sítios celulares e são menos reativos que o [•]OH, que é formado pela combinação de O₂⁻ com H₂O₂ na presença de Fe⁺³, na reação de Haber-Weiss (Dat et al., 2000). O excesso de EROs causa peroxidação auto catalítica de lipídios, induzindo perda de permeabilidade de membrana (Xu et al., 2006), oxidação da guanina, causando mutação do DNA, e peroxidação dos resíduos de cisteína, metionina, histidina, prolina, triptofano e lisina, causando desnaturação e inativação de proteínas (Møller et al., 2007).

Para evitar danos oxidativos, a célula vegetal possui um complexo sistema antioxidante não enzimático, como o sistema ascorbato/glutationa, e enzimático, constituído pelas enzimas SODs, APXs, CATs e redutases de dehidroascorbato (DHAR), de monodehidroascorbato (MDHR) e de glutaciona (GR) (Noctor e Foyer, 1998). As SODs são consideradas a primeira linha de defesa oxidativa da célula e catalisam a dismutação do O₂⁻ para H₂O₂ e O₂ (Alscher et al., 2002). As APXs são as principais peroxidases na remoção do H₂O₂ na célula (Foyer, 1996), que atuando em sincronia com as enzimas DHAR, MDHR e GR, realizam a remoção de H₂O₂ no ciclo do ascorbato-glutationa (Halliwell, 1987). As CATs possuem menor afinidade pelo H₂O₂ comparado as APXs, mas são essenciais na remoção de H₂O₂ oriundo da fotorrespiração (Foyer e Noctor, 2000).

Essas enzimas são responsáveis pela proteção oxidativa em plantas. A atividade da catalase foi aumentada, mais de duas vezes, em gramíneas (Jiang e Huang, 2001) e batata (Lopez-Delgado et al., 1998), expostas ao estresse de temperatura elevada, indicando seu papel na proteção contra o calor nessas espécies. Plantas de *Citrus* submetidas a temperaturas elevadas apresentaram indução do sistema enzimático SOD-CAT-APX-DHAR, associado ao aumento do O_2^- e H_2O_2 no tecido foliar (Guo et al., 2006). O aumento de expressão da GR conferiu maior tolerância à fotoinibição e maior proteção oxidativa, em função do significativo aumento do conteúdo de ascorbato e glutatona nos cloroplastos (Foyer et al., 1995).

Os sistemas antioxidantes estão relacionados com a proteção dos danos oxidativos induzidos pelo estresse salino. Vaidyanathan et al., (2003), trabalhando com dois cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.), observaram que o cultivar resistente apresentou menor peroxidação de lipídios associada à maior atividade das enzimas SOD, CAT e GR. Em cultivares de milho contrastando na resistência à salinidade, foi demonstrado que a resistência está associada à melhor integridade de membranas e maior expressão e atividade das enzimas SOD e APX (Sreenivasulu et al., 2000). Em algodoeiro (*Gossypium hirsutum*), foi demonstrado que a resistência à salinidade está condicionada à eficiência fotossintética e maior indução do sistema antioxidante SOD, GR, POD, sob condições salinas (Meloni et al., 2003).

No entanto, apesar do grande número de estudos focados na compreensão dos efeitos isolados dos estresses salino e térmico sobre o desempenho vegetal, estudos relacionados aos efeitos combinados desses estresses sobre o metabolismo vegetal são praticamente inexistentes. No campo, as plantas estão expostas à combinação de diferentes estresses abióticos, como salinidade e temperaturas altas, que afetam severamente o desempenho vegetal (Mittler, 2006). Estudos recentes têm mostrado que as respostas metabólicas atribuídas aos efeitos combinados dos estresses salino, de seca e de temperaturas extremas são únicas, não podendo ser obtidas com base nas respostas induzidas pelos efeitos isolados desses estresses (Kreps et al., 2002; Rizhsky et al., 2002; Rizhsky et al., 2004; Mittler, 2006)

No presente estudo, foram avaliadas as alterações induzidas pelos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada sobre variáveis fisiológicas relacionadas com a condutância estomática e o *status* hídrico de plântulas de cajueiro, visando associar essas alterações com a produção de H_2O_2 e com os mecanismos de injúria e proteção oxidativa na espécie.

Material e métodos

Material vegetal e aplicação dos tratamentos

Sementes de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.), clone CCP 06, fornecidas pela EMBRAPA-CNPAT, foram esterilizadas em hipoclorito de sódio 5% (v/v) e semeadas em vasos de 0,8 L, contendo vermiculita, sob condições de casa de vegetação. Durante as fases de germinação e crescimento inicial das plântulas, a umidade do substrato foi mantida próxima da capacidade de campo, por irrigações freqüentes com água destilada, e após 35 dias plântulas homogêneas, com 8 folhas expandidas, foram utilizadas no experimento. Inicialmente as plântulas foram submetidas ao estresse salino por irrigação com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) diluída 1/4, livre (controle) ou adicionada de 100 mM de NaCl, aplicado em duas doses (50 mM) no intervalo de 24 h. As plântulas permaneceram expostas ao sal por um tempo suficiente para ocorrer redução de 80% da transpiração e em seguida foram submetidas aos tratamentos de temperatura. Com base nesse critério os tratamentos de temperatura foram aplicados após 13 dias de tratamento salino. Plântulas controle ou estressadas foram transferidas para câmara B.O.D. (CIENTEC/modelo 708) e submetidas a 25 °C ou 45° C, sob condições controladas de luminosidade ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e umidade relativa ($65 \pm 5\%$), por fotoperíodo de 12 h. Para aplicação dos tratamentos, as plântulas foram transferidas para a câmara no final da tarde (18:00 h), onde permaneceram por 12 h no escuro à temperatura ambiente, e no início do dia seguinte (06:00 h) foram submetidas aos respectivos tratamentos. Após 9 h do início do tratamento (15:00 h) foram realizadas medidas de transpiração, com auxílio de um porômetro portátil, e ao final do fotoperíodo (18:00 h) foram coletados discos foliares para as determinações de conteúdo relativo de água e dano de membrana. Em seguida, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado conforme Fidalgo et al., (2004). Ao final do experimento, foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro) e a massa fresca (MF) determinada imediatamente. Em seguida, os discos foram imersos em 30 ml de água deionizada por 8 h, em placas de petri, e após breve secagem dos discos em papel toalha, para remover o excesso de água, foi determinada a massa túrgida (MT). A massa seca (MS) foi determinada após secagem dos discos a 70°C, durante 48 h em estufa, e o CRA estimado pela seguinte relação: $[(MT - MS)/(MF - MS)] \times 100$.

Dano de membrana

O dano de membrana foi determinado conforme Shanahan et al., (1990). Ao final do ensaio foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro), foram imersos em 10 ml de água deionizada em tubos fechados e incubados a 40 °C durante 30 min e determinada a condutividade elétrica da solução (C1). Em seguida, os tubos foram incubados a 100 °C por 1 h e após atingir a temperatura ambiente foi determinada a condutividade elétrica da solução (C2). O dano de membrana (DM) foi estimado pela relação: $DM = (C1/C2) \times 100$.

Conteúdo de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinado conforme Cheeseman et al., (2006). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas na presença de N_2 líquido até obtenção de farinha, seguido da adição de 0,75 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,4, contendo KCN 5 mM e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 13.000 x g por 20 min a 4°C e alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 0,9 ml de meio de reação contendo 100 μM de FeSO_4 , 250 μM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 mM de H_2SO_4 , 100 μM de alaranjado de xilenol e 99 mM de sorbitol. A mistura foi incubada a 25 °C por 30 min e em seguida realizadas leituras de absorvância a 560 nm. As concentrações de peróxido de hidrogênio foram obtidas a partir de curva padrão, utilizando H_2O_2 , e os dados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme Heath e Packer (1968). Amostras (0,1 g) de folhas frescas foram macerados em almofariz na presença de N_2 líquido, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 12.000 x g, durante 15 min a 4 °C, e 0,5 ml do sobrenadante foram adicionados a 2,0 ml do meio de reação contendo TCA 20% (p/v) e TBA 0,5% (p/v), em tubos hermeticamente fechados. A reação foi aquecida em banho maria a 95 °C, durante 1 h, e em seguida foi interrompida em banho de gelo. Após 30 min a 25 °C, foram realizadas leituras de absorvância a 532 e 660 nm, e depois de subtraídas as absorvâncias obtidas a 660 das obtidas a 532 nm, o conteúdo de TBARS foi estimado utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e expresso em nmol g^{-1} MF.

Conteúdos de glutatona total, reduzida e oxidada

Os conteúdos de glutatona total (GSH+GSSG) e das formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram determinados conforme Griffith (1980). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N_2 líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 5% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min a 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação. Para determinação da GSH alíquotas de 0,2 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 2,6 ml de tampão fosfato de sódio 150 mM (pH 7,4), 1 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) e 0,2 ml de 5,5'-ditio-bis 2-ácido-nitrobenzóico (DTNB) 30 mM, em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). O conteúdo de glutatona total (GSH + GSSG) foi determinado pela adição de 0,2 ml do sobrenadante seguido da adição de 1,6 ml de tampão fosfato 150 mM (pH 7,4), contendo 1 unidade de GR, 1,0 ml de NADPH 0,15 mM, 1,0 ml de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) e 0,2 ml de DTNB 30 mM, em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). Em seguida a reação foi acondicionada em banho maria a 30°C, durante 10min. Ao final, foram realizadas leituras de absorvância a 412 nm e os conteúdos de GSH e GSH + GSSG estimados com base em curva padrão, de GSH, e expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. O conteúdo da GSSG foi obtido pela subtração da glutatona reduzida da total.

Conteúdos de ascorbato total, reduzido e oxidado

Os conteúdos de ascorbato total (ASA+DHA), e das formas reduzida (ASA), e oxidada (DHA) foram determinados conforme Kampfenkel et al., (1995). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min a 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação. Para o ascorbato reduzido alíquotas de 0,1 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,3 ml de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,4), 0,1 ml de água destilada, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H₂PO₄ 45%, 0,4 ml de biperidil 4% e 0,2 ml de FeCl₃. O conteúdo de ascorbato total foi determinado pela adição de 0,1 ml do extrato ao meio de reação contendo 0,1 ml de DTT 10 mM (em tampão fosfato 200 mM), 0,2 ml e tampão fosfato de potássio 200mM (pH 7,4), 0,1 ml de N-etilmaleiamida 0,5%, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H₂PO₄ 45%, 0,4 ml de biperidil 4% e 0,2 ml de FeCl₃. A reação foi acondicionada em banho maria a 40°C, durante 30 min, e em seguida foram realizadas leituras de absorvância a 525 nm. Os conteúdos do ascorbato total (ASA+DHA) e reduzido (ASA) foram estimados com base em curva padrão, utilizando L – ascorbato, e expressos em μmol g⁻¹ MF. O conteúdo do DHA foi obtido pela subtração do ascorbato reduzido do total.

A extração de proteína foi realizada conforme Zimmermam et al., (2006), com modificações. Amostra de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N₂ líquido seguido da adição de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), contendo 30 mM de DTT, 20% de glicerol e 3% de PEG-6000. Para determinação da atividade das enzimas peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido, o pH do tampão foi alterado para 7,0 e o DTT foi substituído por ascorbato 1 mM. Após a extração, o extrato foi centrifugado a 14.000 x g durante 30 min, a 4 °C. O conteúdo de proteínas solúveis foi determinado conforme Bradford (1976) e estimado com base em curva padrão, utilizando BSA.

Eletrforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS)

Para as PAGE-SDS alíquota de 20 μL de extrato protéico foram misturas a 20 μL do tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol, SDS 10% e azul de boromofenol) e 20 μL da mistura foi aplicado em cada poço. Os géis apresentavam a seguinte constituição: 12,5% (main gel) e 5% (stacking gel), e as eletrforeses foram realizadas a 125 V, 20 mA e 10 W, por cada gel, usando o tampão de corrida (Tris 25 mM/Glicina 192 mM, pH 8,3 e SDS 10%). Após a eletrforese, as proteínas foram coradas com o *Comassie brilliant blue* R-250 0,025%, em ácido acético 10% e metanol 40%, durante 2 h. Em seguida os géis foram descorados em ácido acético 10% e metanol 40% (Laemmli, 1970).

Atividade enzimática

A atividade da peroxidase de ascorbato (APX; EC: 1.11.1.1) foi determinada conforme método descrito por Nakano e Asada (1981). Alíquotas de 0,1 ml de extrato protéico foram adicionadas ao meio de reação composto de 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo 0,5 mM de ácido ascórbico. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ (30 mM) ao meio de reação e acompanhada pelo decaimento da absorbância a 290 nm em espectrofotômetro durante 300 seg, com leitura sucessivas em intervalos de 30 seg. A atividade da APX foi estimada utilizando o coeficiente e de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ para o ascorbato, em 290 nm, e expressa como μmol AsA g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da catalase (CAT; EC: 1.11.1.6) foi determinada conforme Havir e McHale, (1987). Alíquotas de 0,05 ml de extrato protéico foram adicionadas a 2,95 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), contendo H₂O₂ (20 mM). A reação ocorreu a 30°C e foi acompanhado pelo decaimento da absorbância a 240 nm durante 300 seg, com leituras sucessivas a cada 30 seg. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ para o H₂O₂, em 240 nm, e expressa em nmol H₂O₂ g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da dismutase de superóxido (SOD; EC: 1.15.1.1) foi determinada conforme metodologia descrita por Gianopolitis e Ries (1977). Alíquotas de 0,1 ml do extrato protéico foram transferidas para meio de reação, em tubos protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 μM de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM de riboflavina e rápida transferência dos tubos, sem a proteção da luz, para câmara iluminada por lâmpada de 30 wats (30 μmol de fótons m⁻² s⁻¹), durante 6 minutos. A reação foi interrompida pelo desligamento da luz, os tubos foram revestidos por filme escuro e realizadas leituras a 540nm. A atividade foi estimada com base na inibição da redução do NBT, definindo-se uma unidade de atividade como a quantidade da enzima necessária para inibir 50% da fotoredução (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade foi expressa em U.A. g⁻¹ MF min⁻¹.

Zimograma e identificação das isoenzimas da dismutase do superóxido (SOD)

Inicialmente, as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida 10% sob condição nativa (PAGE nativa). Alíquotas (± 10 μl) de extrato protéico foram misturadas com tampão de aplicação (Tris 25 mM/glicina 190 mM, pH 8,3), na proporção 1/1 (v/v), e submetidas à eletroforese (125 V, 20 mA e 10 W por gel). Após a separação das proteínas, os géis foram revelados para atividade da SOD conforme Beauchamp e Fridovich (1971). Inicialmente foram incubados em 50 ml de NBT 2 mM por 15 min, rapidamente lavados com água destilada e novamente incubados, na ausência da luz, em 50 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), contendo TEMED 28 mM e riboflavina (0,1 mg/ml), por 15 min. Em seguida, os géis foram lavados com água destilada e expostos à luz, em caixa boxe contendo lâmpada fluorescente de 30 wats (30 μmol de fótons m⁻² s⁻¹), para indução da reação fotoquímica. Após revelação das bandas acromáticas a reação foi interrompida pelo desligamento da luz e sucessivas lavagens dos géis com água. A diferenciação das

isoformas da SOD foi realizada pela prévia incubação dos géis por 15 min em tampão fosfato de potássio contendo H_2O_2 (5 mM) ou KCN (2 mM), conforme Martinez et al., (2001). As isoformas Cu/Zn-SOD e Fe-SOD são sensíveis ao H_2O_2 , a Fe-SOD é resistente ao cianeto, enquanto a Mn-SOD é resistente ao H_2O_2 e ao CN^- (Scandalios, 1993). Após a pré-incubação para inibição específica das isoformas os géis foram revelados conforme descrito acima.

Zimograma da catalase (CAT)

Após a separação das proteínas em gel de poliacrilamida a 7,5% os géis foram revelados para atividade de catalases conforme Thorup et al., (1961). Alíquotas (50 μ l) de extrato protéico foram misturadas ao tampão de aplicação (Tris 25 mM/glicina 190 mM, pH 8,3), na proporção 1/1 (v/v) e 20 μ l da mistura foi submetido à PAGE nativa (125 V, 20 mA e 10 W por gel). Após a eletroforese os géis foram pré-incubados em H_2O_2 0,3% (p/v) por 20 min, em agitação suave, seguido de rápida lavagem com água destilada e imersão em solução de $FeCl_3$ 0,5% (p/v) e $K_2Fe(CN)_6$ 0,5% (p/v). Após o surgimento das bandas acromáticas sobre o fundo verde dos géis a reação foi interrompida por lavagens com água destilada. As soluções de $FeCl_3$ e $K_2Fe(CN)_6$ foram preparadas isoladamente, mantidas no escuro, e misturadas somente no momento da aplicação sobre os géis.

Delineamento estatístico e análise dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em fatorial 2 x 2, dois níveis de NaCl (0 e 100 mM) e duas temperaturas (25 °C e 45 °C), respectivamente. O desenho experimental resultou nas seguintes combinações de tratamentos: (0 mM de NaCl+25 °C / 100 mM de NaCl+25 °C / 0 mM de NaCl+45 °C / 100 mM de NaCl+45 °C), com três repetições. Os dados foram submetidos ao teste F a 0,05 de significância, por análise de variância, e as médias das variáveis submetidas ao teste de Tukey em mesmo nível de probabilidade.

Resultados

Respostas fisiológicas de plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada

No presente estudo, plântulas de cajueiro foram submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada, estresses ambientais que comumente ocorrem no campo. As plântulas expostas somente ao sal apresentaram redução de 50% da transpiração, naquelas submetidas a 45 °C ocorreu um aumento de 80%, e nas plântulas expostas à combinação dos estresses de salinidade e temperatura elevada a transpiração não foi alterada (Figura 16A). Os tratamentos de salinidade e de temperatura elevada, aplicados isoladamente ou de forma combinada, não afetaram o conteúdo relativo de água (CRA) foliar nem induziram danos de membranas, medido pelo vazamento de eletrólitos (Figuras 16B e C). O conteúdo de sódio foliar foi três vezes maior nas plântulas submetidas ao estresse salino, independente dos tratamentos de temperatura (Figura 16D).

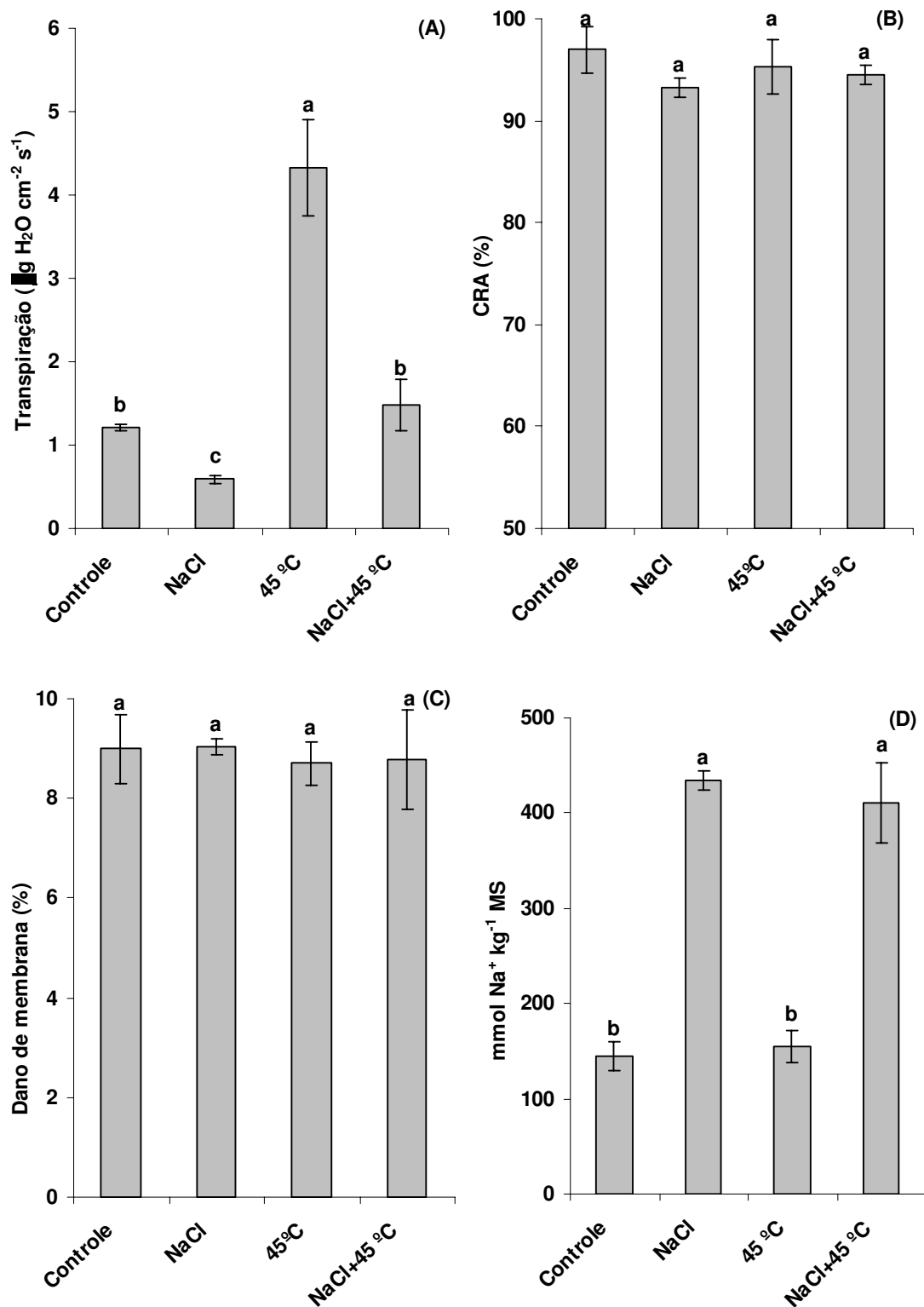


Figura 16 (A) Transpiração, (B) conteúdo relativo de água, (C) dano de membrana e (D) conteúdo de sódio em folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada. (Controle); (NaCl – 12 dias a 100 mM); (45 °C – 12 h em 45 °C); (NaCl+45 °C – 12 dias a 100 mM + 12 h em 45 °C).

Respostas oxidativas de plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada

Os conteúdos de H_2O_2 e TBARS foliar foram diferentemente afetados pelos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada (Figura 17). Nas plântulas submetidas aos estresses salino e de temperatura alta ocorreu aumento de 35% do conteúdo de H_2O_2 , enquanto nas plântulas submetidas ao efeito combinado dos estresses não ocorreu alteração do conteúdo de H_2O_2 (Figura 17A). O conteúdo de TBARS foliar foi aumentado em 20% nas plântulas expostas aos estresses salino e de temperatura elevada, isoladamente, em relação ao controle. No entanto, plântulas expostas à combinação dos estresses não apresentaram aumento do conteúdo de TBARS foliar.

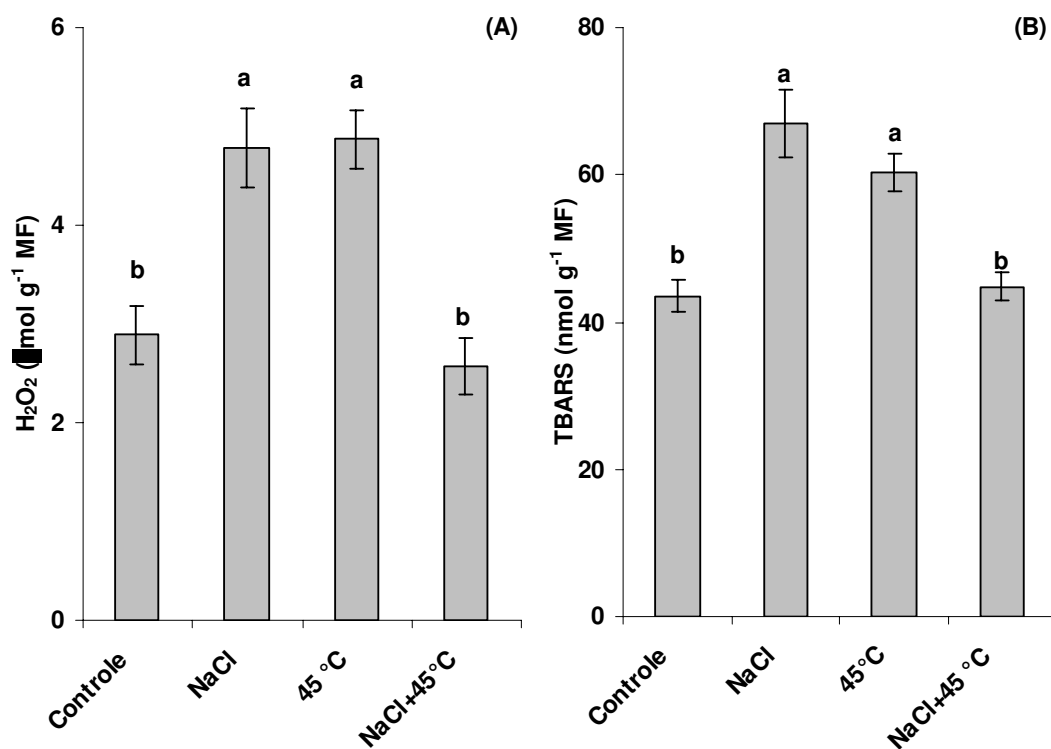


Figura 17 (A) Conteúdo de peróxidos de hidrogênio e (B) TBARS em folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de alta temperatura. (Controle); (NaCl – 12 dias a 100 mM); (45 °C – 12 h em 45 °C); (NaCl+45 °C – 12 dias a 100 mM + 12 h em 45 °C).

Proteína solúvel e atividade de enzimas antioxidativas em plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada

O conteúdo de proteína solúvel e as atividades das enzimas SOD, CAT e APX foram diferentemente afetados pelos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada (Figura 18). O sal não afetou o conteúdo de proteína solúvel. No entanto, nas plântulas expostas a 45 °C o conteúdo de proteína foi 35% maior, independente do sal (Figura 17A). As atividades da SOD e da CAT foram 18% e 100% maior, respectivamente, nas plântulas expostas a 45 °C, independente do NaCl (Figuras 18B e C). A atividade da APX foi reduzida em 25% pelo NaCl, aumentada em 42% por 45 °C e estimulada em 30% pela combinação dos estresses, comparado ao controle (Figura 18D). A atividade em gel da CAT e da SOD confirmou o incremento da atividade total, observado nas plântulas expostas a temperatura elevada ou a combinação dos estresses (Figuras 18B e C). A caracterização das isoformas da SOD demonstrou que o incremento da atividade total dessa enzima ocorreu pelo aumento de atividade de três isoformas Cu/Zn-SOD, independente do sal (Figura 19B).

A análise por SDS-PAGE do perfil dos diferentes polipeptídios foi compatível com a indução do conteúdo de proteína solúvel (Figura 19A). O estresse térmico resultou na indução generalizada de todos os polipeptídios, na ausência e na presença do estresse salino. Diferentes polipeptídios com massa molecular entre 24 e 97 kDa foram fortemente induzidos nas plântulas submetidas aos tratamentos de temperatura elevada e/ou combinação de salinidade e temperatura, particularmente aqueles com massa molecular próxima de 50 kDa.

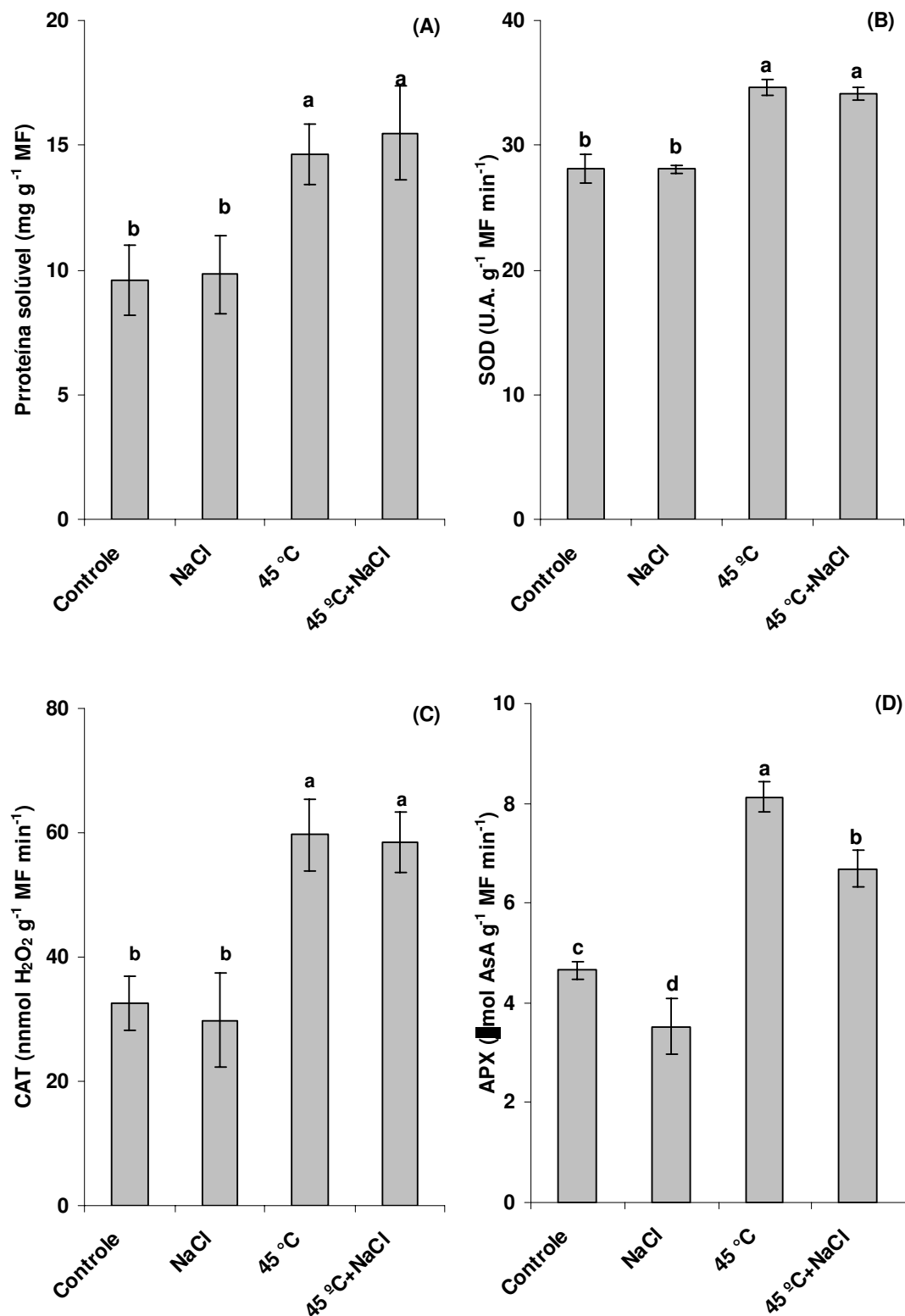


Figura 18 (A) Conteúdo de proteína solúvel e atividade das enzimas (B) dismutase do superóxido, (C) catalases e (D) peroxidase do ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada. (Controle); (NaCl – 12 dias a 100 mM); (45 °C – 12 h em 45 °C); (NaCl+45 °C – 12 dias a 100 mM + 12 h em 45 °C).

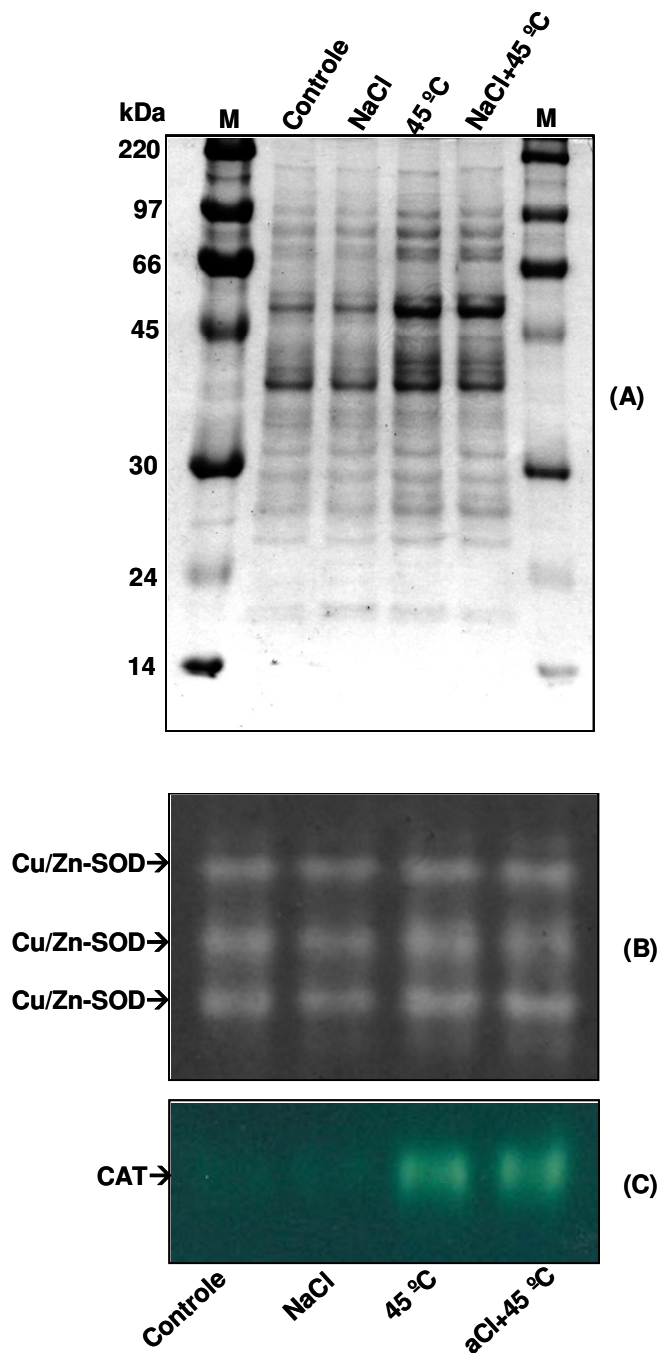


Figura 19 (A) SDS-PAGE e zimograma para (B) SOD e (C) CAT de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura alta. (Controle); (NaCl – 12 dias a 100 mM); (45 °C – 12 h em 45 °C); (NaCl+45 °C – 12 dias a 100 mM + 12 h em 45 °C). Para o SDS-PAGE e o zimograma da CAT foram aplicados 20 µl de extrato protéico por poço e para o zimograma da SOD 10 µl.

Mudanças do conteúdo e no balanço redox do ascorbato e da glutathiona em plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada

Os conteúdos de ascorbato e glutathiona foram diferentemente alterados pelos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e de temperatura elevada (Tabelas 8 e 9). O conteúdo ascorbato total foi reduzido em 20% pelo NaCl e aumentado em 18% pela combinação dos estresses. Nas plântulas submetidas aos estresses salino ou de temperatura elevada isolados ocorreu redução de 30% do ASA, enquanto naquelas submetidas à combinação dos estresses a redução foi de 14%. O conteúdo do DHA nas plântulas expostas a 45 °C ou combinação dos estresses foi aumentado em 73% e 100%, respectivamente. A relação ASA/DHA foi reduzida em 38, 61 e 60% pelos estresses salino, térmico e combinação dos estresses, respectivamente (Tabela 8).

As plântulas submetidas ao estresse salino ou a combinação dos estresses não apresentaram alteração do conteúdo de glutathiona. No entanto, nas plântulas submetidas a 45 °C o conteúdo da glutathiona total foi 66% maior, comparado aos demais tratamentos. O conteúdo da glutathiona oxidada foi aumentado em 177% e o balanço redox da glutathiona nas plântulas submetidas à temperatura elevada foi 65% menor, comparada ao controle (Tabela 9).

Tabela 8 Conteúdos de ascorbato total (ASA+DHA), reduzido (ASA), oxidado (DHA) e balanço do estado redox do ascorbato (ASA/DHA) em plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e temperatura elevada

Tratamentos	ASA+DHA ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$)	ASA ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$)	DHA ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$)	ASA/DHA
Controle	10.16b	7.35a	2.80c	2.64a
NaCl	8.16c	5.05c	3.10c	1.63b
45 °C	9.81b	4.93c	4.87b	1.01c
NaCl + 45 °C	12.07a	6.26b	5.80a	1.08c

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey. (Controle); (NaCl – 12 dias a 100 mM); (45 °C – 12 h em 45 °C); (45 °C+NaCl – 12 dias a 100 mM + 12 h em 45 °C).

Tabela 9 Conteúdos de glutatona total (GSH+GSSG), reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e balanço do estado redox da glutatona (GSH/GSSG) em plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e temperatura elevada

Tratamentos	GSH+GSSG ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$)	GSH ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$)	GSSG ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$)	GSH/GSSG
Controle	2.20b	1.37a	0.83b	1.64b
NaCl	2.21b	1.46a	0.75b	2.02a
45 °C	3.67a	1.36a	2.30a	0.59c
NaCl + 45 °C	2.12b	1.45a	0.70b	2.07a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey. (Controle); (NaCl – 12 dias a 100 mM); (45 °C – 12 h em 45 °C); (45 °C+NaCl – 12 dias a 100 mM + 12 h em 45 °C).

Discussão

A transpiração das plântulas foi reduzida pelo NaCl, aumentada por 45 °C e não foi alterada pela combinação dos estresses, indicando que o comportamento estomático de plantas submetidas à combinação de salinidade e calor é diferente daquele atribuído aos efeitos isolados desses estresses. O aumento da transpiração em plantas expostas a temperaturas elevadas funciona como mecanismo fisiológico de dissipação de calor, evitando o aquecimento foliar (Rizhsky et al., 2002). Dessa forma, o incremento da transpiração nas plântulas expostas a 45 °C pode ter contribuído para reduzir a temperatura foliar. No entanto, nas plântulas expostas à combinação dos estresses a taxa de transpiração não foi alterada, indicando que a salinidade pode limitar a dissipação de calor, via fluxo transpiratório, nessas condições, podendo provavelmente resultar em aquecimento e dano celular.

Além da dissipação térmica, a modulação do fluxo transpiratório em plantas expostas a condições adversas pode auxiliar na manutenção do *status* hídrico foliar, ajustando a necessidade hídrica da planta à nova condição ambiental (Cattivelli et al., 2008). O potencial hídrico e o conteúdo relativo de água são variáveis fisiológicas indicadoras do *status* hídrico foliar, e são severamente afetados por estresses que alteram a condutância estomática das plantas, como seca (Khanna-Chopra e Selote, 2007), salinidade (Hernández e Almansab, 2002) e temperaturas elevadas (Wahid et al., 2007). Dessa forma, as bruscas alterações ocorridas na transpiração das plântulas de cajueiro frente aos estresses salino, térmico e combinação desses estresses, podem justificar a estabilidade do CRA foliar observada, sugerindo alta capacidade de aclimatação da espécie a flutuações ambientais extremamente adversas ao desempenho vegetal.

O estresse salino causa fechamento estomático e limita a fixação de CO₂, reduzindo, indiretamente, a fotossíntese, podendo resultar no desbalanço entre a produção e remoção de espécies reativas de oxigênio celular (Mittler, 2002). Por outro lado, temperaturas elevadas podem limitar a capacidade fotossintética por alterações bioquímicas diretas (Crafts-Brandner e Salvucci, 2002; Wise et al., 2004). Em plantas C₃ e C₄, a redução fotossintética ocorre quando as plantas são expostas a temperaturas moderadamente altas, em função do aumento da atividade oxigenase da rubisco e dissociação do complexo de evolução do O₂ nos cloroplastos, alterando o fluxo fotoquímico de elétrons entre os PSII e PSI,

combinação que resulta em aumento da fotorrespiração e conseqüente produção de EROs (Sage e Sharkey, 1987; Deuce e Neuburger, 1999; Wahid et al., 2007).

No presente estudo, ocorreu aumento significativo do conteúdo de H_2O_2 foliar, associado ao incremento do conteúdo de TBARS nas plântulas submetidas aos estresses salino ou de temperatura elevada, isoladamente, indicando ocorrência de dano oxidativo. O aumento da peroxidação de lipídios, associado ao acúmulo do H_2O_2 , é um distúrbio metabólico comum que ocorre em diferentes espécies vegetais submetidas à salinidade (Demiral e Türkan, 2005) e temperaturas elevadas (Ali et al., 2005), como conseqüência do desbalanço entre a produção e a remoção de EROs na célula vegetal (Mittler, 2002). Dessa forma, o aumento do conteúdo de H_2O_2 e TBARS nas plântulas submetidas à salinidade e ao estresse térmico indicam a ocorrência de dano oxidativo, provavelmente associado à indução de fotorrespiração e limitada capacidade de remoção de EROs, nas duas condições.

A proteção oxidativa em plantas ocorre pela indução coordenada de uma complexa via metabólica constituída de mecanismos não enzimáticos e enzimáticos, incluindo ASA e GSH, além das enzimas SOD, APX, CAT, e as redutases de dehidroascorbato (DHAR), de monodehidroascorbato (MDHR) e de glutathione (GR) (Noctor e Foyer, 1998). A SOD é considerada a primeira linha de defesa oxidativa da célula e catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ para H_2O_2 e O_2 (Alscher et al., 2002). As APXs são importantes peroxidases que atuam em sincronia com as enzimas DHAR, MDHR e GR na remoção de H_2O_2 no ciclo do ascorbato-glutathione (Foyer, 1996). As CATs possuem menor afinidade pelo H_2O_2 comparado as APXs, mas são essenciais na remoção de H_2O_2 oriundo da fotorrespiração (Foyer e Noctor, 2000).

Os estresses salino, térmico e a combinação desses estresses afetaram diferentemente o conteúdo de proteínas solúvel e a atividade das enzimas SOD, CAT e APX. A atividade total da SOD nas plântulas expostas a 45 °C e a combinação dos estresses foram maiores comparadas ao controle ou às plântulas submetidas ao sal. A SOD catalisa a remoção do $O_2^{\cdot -}$ e possui papel central na defesa oxidativa da célula, podendo estar localizada em vários compartimentos celulares potencialmente produtores de EROs, como cloroplastos, peroxissomos e mitocôndria (Alscher et al., 2002). No presente estudo, a caracterização das isoformas da SOD demonstrou que o aumento de atividade dessa enzima ocorreu pela indução de três isoformas Cu/Zn-SOD, que podem está localizadas nos

cloroplastos, o principal sítio de produção de EROs em tecidos fotossintetizantes (Foyer e Noctor, 2003).

Portanto, o aumento de atividade das Cu/Zn-SOD observado representa um importante mecanismo de proteção oxidativa no cajueiro, durante a ocorrência de temperaturas elevadas ou exposição simultânea aos estresses salino e temperatura alta. As SODs dos cloroplastos podem estar localizadas no estroma ou ligadas a membrana do tilacóide, próxima ao complexo do PSI, um dos principais pontos de produção do O_2^- no cloroplasto (Nijs e Kelley, 1991). Em plantas de *Chenopodium murale*, a isoforma Cu/Zn-SOD, presente no estroma dos cloroplastos apresentou maior estabilidade ao calor do que a isoforma Cu/Zn-SOD, ligada à membrana do tilacóide, e foi a principal responsável pela proteção oxidativa dos cloroplastos durante o estresse térmico (Khanna-Chopra e Sabarinath, 2004).

A atividade da CAT foi fortemente induzida pelo estresse de temperatura alta e pela combinação dos estresses (Figuras 18C e 19C). Estudos recentes demonstram a existência de três isoformas de catalase, CAT1, CAT2 e CAT3, em plantas de *Arabidopsis*, todas localizadas na matrix do peroxissomo (Nyathi e Baker, 2006). Sob condições fisiológicas normais, a taxa de produção do H_2O_2 nessa organela está próxima de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, podendo aumentar rapidamente durante fotorrespiração, induzida por estresses de salinidade e de temperaturas elevadas (Foyer e Noctor, 2003). O H_2O_2 produzido no peroxissomo durante a fotorrespiração pode danificar componentes dessa organela ou vazar para outros compartimentos celulares e causar dano oxidativo (Foyer e Noctor, 2000).

As CATs possuem baixa afinidade pelo H_2O_2 comparadas as APXs mas apresentam alta atividade catalítica, atuando na remoção do H_2O_2 em concentrações da ordem de mM (Mittler, 2002), e na proteção celular durante o incremento brusco da fotorrespiração (Foyer e Noctor, 2000). Foi observado aumento de 100% da atividade da CAT nas plântulas de cajueiro, quando submetidas ao estresse de temperatura elevada ou a combinação de salinidade e temperatura alta. Esse resultado sugere que a CAT desempenha importante papel na proteção oxidativa do cajueiro sob condições de temperaturas elevadas, e que o excesso de sais não acarreta limitação dessa enzima na proteção oxidativa durante a ocorrência de temperaturas elevadas.

A atividade da APX apresentou modulação distinta em resposta aos estresses salino, temperatura elevada e combinação dos estresses. As plântulas expostas ao

sal apresentaram redução de atividade da APX, independente do estresse térmico. As plântulas expostas somente ao estresse térmico apresentaram aumento de 43% de atividade da APX, enquanto naquelas expostas à combinação dos estresses esse aumento foi de apenas 30%. A redução de atividade da APX nas plântulas submetidas ao sal pode indicar sensibilidade iônica dessa enzima, atribuída ao excesso de sódio acumulado no tecido foliar (Figura 18D). Os resultados indicam ainda o importante papel da APX na remoção do H_2O_2 durante o estresse térmico e que o estresse salino pode limitar a ação dessa enzima na proteção oxidativa sob condições de temperaturas elevadas. Embora não existam estudos demonstrando o papel da APX na proteção oxidativa de plantas expostas à combinação de salinidade e calor, diversos relatos demonstram seu papel na proteção oxidativa frente ao estresse salino (Lee et al., 2007) e de temperatura elevada (Guo et al., 2006).

Durante a redução do H_2O_2 para H_2O e O_2 , as APXs utilizam o ASA como doador específico de elétrons, liberando DHA e afetando o estado redox desse antioxidante (Noctor e Foyer, 1998). As plântulas submetidas somente ao estresse salino apresentaram redução de 20% no conteúdo de ascorbato total, associado à redução do ascorbato reduzido e da relação ASA/DHA. A redução do *pool* total do ascorbato da célula pode ocorrer pela redução da síntese ou pela degradação, que ocorre inicialmente pela oxidação do ASA para DHA, seguido da degradação do DHA para tartarato e oxalato, caso não seja rapidamente convertido para ASA pelo ciclo do ascorbato-glutationa (Noctor e Foyer, 1998). Entretanto, não foi observado aumento do DHA, dessa forma a redução do *pool* de ascorbato pode ter ocorrido pela redução da síntese, provavelmente associado à redução, induzida pela salinidade, da atividade das enzimas da sua biossíntese.

A redução do conteúdo de ascorbato, induzida pelo NaCl, ocorreu associada com a redução da atividade da APX. Por outro lado, nas plântulas expostas ao estresse térmico não ocorreu alteração do ascorbato total, mas foi observada redução de 30% do ASA e aumento de 73% do DHA, reduzindo a relação ASA/DHA em 60%. Essa alteração do estado redox do ascorbato ocorreu associada à máxima atividade da APX, indicando o papel do ascorbato na remoção do H_2O_2 via atividade da APX em plântulas de cajueiro submetidas a temperaturas elevadas. A redução do conteúdo do *pool* de ascorbato em plantas de *Cucumis sativus* submetidas ao estresse de temperatura alta ocorreu associado ao aumento de atividade das APXs

mitocondrial, citosólica e principalmente da isoforma presente no estroma dos cloroplastos (Song et al., 2005).

Por outro lado, nas plântulas submetidas à combinação dos estresses ocorreu aumento de 18% do conteúdo de ascorbato total, associado à redução de 15% do ASA e aumento de 100% do DHA. Esse resultado sugere a hipótese de uma forte interação de mecanismos antioxidantes na proteção oxidativa em plântulas de cajueiro em condições de estresses múltiplos, considerando que essa alteração do sistema ascorbato ocorreu associada à máxima atividade das enzimas SOD e CAT e elevada atividade da APX. Reforçando essa hipótese, nas plântulas expostas à combinação dos estresses não ocorreu aumento de H_2O_2 nem de TBARS (Figura 17), indicando ausência de dano oxidativo. Dessa forma, o aumento do ascorbato total e o intenso aumento do DHA, indicando consumo de ASA, associado a forte indução do sistema SOD-CAT-APX, representa um complexo mecanismo de proteção oxidativa em plântulas de cajueiro expostas a combinação de salinidade e temperaturas elevadas.

O conteúdo da glutatona total nas plântulas de cajueiro submetidas ao estresse de temperatura elevada foi aumentado em 66% (Tabela 9). Esse aumento ocorreu associado à manutenção do conteúdo da glutatona reduzida (GSH), incremento de 177% da glutatona oxidada (GSSG) e redução de 64% da relação GSH/GSSG, indicando consumo de GSH nas plântulas submetidas ao estresse térmico. A GSH representa a principal forma de grupos SH não protéico na célula e atua como uma barreira entre os grupos SH de proteínas e as EROs, sob condições fisiológicas ou de estresses (Foyer e Noctor, 2005). Esse sistema de tamponamento redox é essencial para impedir a oxidação e a desnaturação de proteínas, além de modular a atividade de enzimas ativadas pela alteração do estado redox, como algumas localizadas no estroma dos cloroplastos (Buchanan e Balmer, 2005).

No geral, os estudos demonstram que o aumento da GSSG ocorre associado à redução da GSH, afetando ao estado redox GSH/GSSG (Law et al., 1983; Song et al., 2005). As alterações induzidas pelo estresse térmico no sistema glutatona em plântulas de cajueiro resultaram na manutenção no teor da GSH e redução superior a 60% do estado redox da glutatona. A análise desse balanço sugere a ocorrência de um equilíbrio dinâmico do sistema glutatona frente ao estresse térmico, onde a síntese do *pool* da glutatona total ocorreu para repor o conteúdo da GSH celular, sob condições de estresse térmico. Dessa forma, o aumento da GSSG, induzido

pelo calor, pode representar o consumo da GSH sintetizada *de novo*, sob condições de estresse, que contribuiu para a manutenção constante da GSH, e para o fornecimento de GSH para a proteção oxidativa celular.

Além de atuar diretamente na proteção oxidativa, a GSH é componente chave da via metabólica do ascorbato-glutationa, responsável pela remoção do H₂O₂ e regeneração do *pool* de ASA (Foyer e Noctor, 2000). Nessa via metabólica, que atua na remoção do H₂O₂ consumindo ASA, a GSH doa elétrons para redução do DHA, regenerando o ASA numa reação catalisada pela DHAR (Noctor e Foyer, 1998). A GSSG é reduzida para GSH pela GR, que utiliza NADPH como fonte de elétrons (Halliwell, 1987). No entanto, as plântulas de cajueiro expostas a 45 °C apresentaram aumento de GSSG e manutenção da GSH, sugerindo limitação de redução da GSSG para GSH sob condições de calor e indicando, principalmente, redução de atividade da GR, nessas condições. Por outro lado, o incremento da GSSG pode indicar consumo de GSH por outras peroxidases, como peroxidases de glutatona (GPX) e glutatona S-transeferases (GST), importantes vias removedoras de EROs da célula vegetal (Roxas et al., 1997; Tausz et al., 2004).

Em conclusão, os resultados mostram que os efeitos isolados e combinados da salinidade e temperatura elevada, afetam, diferentemente, variáveis fisiológicas relacionadas com a condutância estomática e com mecanismos de injúria e proteção oxidativa no cajueiro, indicando que as enzimas CAT e SOD são mais ativas frente à combinação dos estresses comparadas a APX. Indicam ainda, o papel do sistema ascorbato na proteção dos efeitos isolados e combinados dos estresses e da GSH frente ao estresse térmico isolado.

Bibliografia

ALI, M.B., HAHN, E.J. e PAEK, K.Y. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 213–223. 2005.

ALSCHER, R.G., ERTURK, N. e HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341. 2002.

BEAUCHAMP, C. e FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 44, p. 276–287. 1971.

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

- BUCHANAN, B.B. e BALMER, Y. Redox Regulation: A Broadening Horizon. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 56, p. 187–220. 2005.
- CATTIVELLI, L., RIZZA, F., BADECK, F.W., MAZZUCOTELLI, E., MASTRANGELO, A.M., FRANCIA, E., MARÉ, CATERINA., TONDELLI, A. e STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v. 105, p. 1–14. 2008.
- CHEESEMAN, J.M., Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 10, 2435-2444. 2006.
- CRAFTS-BRANDNER, S.J. e SALVUCCI, M.E. Sensitivity of Photosynthesis in a C₄ Plant, Maize, to Heat Stress. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1773-1780. 2002.
- DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVÁ, E., MONTAGU, M.V., INZÉ, D. e BREUSEGEM, F.V. Dual action of the active oxygen species during plant stress Responses. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 779–795. 2000.
- DEMIRAL, T. e TÜRKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 53, p. 247–257. 2005.
- DEUCE, R e NEUBURGER, M. Biochemical dissection of photorespiration. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 2, p. 214-222. 1999.
- FIDALGO, F., SANTOS, A., SANTOS, I. e SALEMA, R. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Ann. Appl. Biol.**, v. 145, p. 185-192. 2004.
- FOYER, C. e NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, cell and Environmental**, v. 28, p. 1056-1071. 2005.
- FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355–364. 2003
- FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Tansley Review No. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytol**, v. 146, p. 359-388. 2000.
- FOYER, C.H. Free radical processes in plants. **Biochem Soc Trans**, v. 24, p. 427–434. 1996.
- FOYER, C.H., SOURIAU, N., PERRET, S., LELANDAIS, M., KUNERT, K.J., PRUVOST, C. e JOUANIN, L. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. **Plant Physiol**, v. 109, p. 1047–1057. 1995.
- GIANNOPOLITIS, C.N. e RIES, S.K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314. 1977.
- GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem**, v. 106, p. 207-211. 1980.
- GUO, Y.P, ZHOU, H.F. e ZHANG, L.C. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 260–267. 2006.
- HALLIWELL, B. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. **Chem Phys Lipids**, v. 44, p. 327–340. 1987.
- HAVIR, E.A. e MCHALE, N.A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco-Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455. 1987.
- HEATH, R.L. e PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of

- fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n.1, p. 189-198. 1968.
- HERNÁNDEZ, J. A. e ALMANSAB, M.S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 251–257. 2002
- HOAGLAND, D.R. e ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, Berkeley 32p. (Circular 347). 1950.
- JIANG, Y. e HUANG, B. Effect of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool season grasses. **J. Exp. Bot.**, v. 52, p. 341-349. 2001.
- KAMPFENKEL, K., MONTAGU, M.V. e INZÉ, R. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical biochemistry**, v. 225, p. 165-167. 1995.
- KHANNA-CHOPRA, R. e SABARINATH, S. Heat-stable chloroplastic Cu/Zn-SOD in *Chenopodium murale*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 320, p. 1187–1192. 2004.
- KHANNA-CHOPRA, R. e SELOTE, D.S. Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 276–283. 2007.
- KREPS, J.A., WU, Y., CHANG, H.S., ZHU, T., WANG, X. e HARPER, J.F. Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. **Plant Physiology**, v. 130, p. 2129–2141. 2002.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680. 1970.
- LAW, M.Y., CHARLES, S.A. e HALLIWELL, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. **Biochem J.**, v. 210, p. 899–903. 1983.
- LEE, Y.P., KIM, S.H., BANG, J.W., LEE, H.S., KWAK, S.S. e KWON, S.Y. Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. **Plant Cell Rep**, v. 26, p. 591–598. 2007.
- LIU, X. e HUANG, B. Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bent grass. **Crop Sci.**, v. 40, p. 503–510. 2000.
- MARTINEZ, C.A., LOUREIRO, M.E., OLIVA, M.A. e MAESRRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilubum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Sci**, v. 160, p. 505-515. 2001.
- MELONI, D.A., OLIVA, M.A., MARTINEZ, C.A. e CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 69-76. 2003.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v.7, n. 9, p. 405-410. 2002.
- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **TRENDS in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15-19. 2006.
- MØLLER, I.M., JENSEN, P.E. e HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 58, p. 459–81. 2007.
- MUNNS, R. e TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 651-681. 2008.
- NAKANO, Y. e ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 1068-1072. 1981.
- NIJS, D. e KELLEY, P.M. Vitamins C and E donate single hydrogen atoms in vivo. **FEBS Lett**, v. 284, p. 147–51. 1991.

- NOCTOR, G. e FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annu. Rev. Plant Physiol.** Plant Mol. Biol, v. 49, p. 249–79. 1998.
- NYATHI, Y. e BAKER, A. Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1763, p. 1478–1495. 2006.
- RIZHSKY, L., LIANG, H. e MITTLER, R. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. **Plant Physiology**. v.130, p.1143–115. 2002.
- RIZHSKY, L., LIANG, H., SHUMAN, J., SHULAEV, V., DAVLETOVA, S. e MITTLER, R. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiology*. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1683–1696. 2004.
- ROXAS, V.P., SMITH, R.K., ALLEN, E.R. e ALLEN, R.D. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 968-991. 1997.
- SAGE, R.F. e SHARKEY, T.D. The effect of temperature on the occurrence of O₂ and CO₂ insensitive photosynthesis in field growth plant. **Plant Physiology**, v. 84, p. 658-664. 1987.
- SCANDALIOS J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol**, v. 101, p. 1-7. 1993.
- SHANAHAN, J.F., EDWARDS, I.B., QUICK, J.S. e FENWICK, J.R. Membrane thermostability and heat tolerance of spring wheat. **Crop Sci.**, v. 30, p. 247–251. 1990.
- SONG, X.S., HU, W.H., MAO, W.H., OGWENO, J.O., ZHOU, Y.H e YU, J.Q. Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1082–1088. 2005.
- SREENIVASULU, N., GRIMM, B., WOBUS, U. e WESCHKE, W. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). **Physiologia Plantarum**, v. 109, p. 435-442. 2000.
- TAUSZ, M., SIRCELJ, H. e GRILL, D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 404, p. 1955–1962. 2004.
- THORUP, O.A., STROLE, W.B. e LEAVELL., B.S. A method for the localization of catalase on starch gels. **J Lab Clin Med**, v. 58, p. 122–128. 1961.
- VAIDYANATHAN, H., SIVAKUMAR, P., CHAKRABARTY, R. e THOMAS, G. Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) - differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. **Plant Science**, v. 165, p. 1411–1418. 2003.
- WAHID, A., GELANI, S., ASHRAF, M. e FOOLAD, M.R. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 199–223. 2007.
- WANG, W., VINOCCUR, B. e ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1–14. 2003.
- WISE, R.R., OLSON, A.J., SCHRADER, S.M. e SHARKEY, T.D. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. **Plant Cell Environ.**, v. 27, p. 717–724. 2004.
- XU, S., LI, J., ZHANG, X., WEI, H. e CUI, L. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. **Environ. Exp. Bot.**, v. 56, p. 274–285. 2006.
- ZIMMERMAM, P., HEINLEIN, C., ORENDI, G. e ZENTGRA, U. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant, cell and Environment**, v. 29, p. 1049-1060. 2006.

CAPÍTULO - V

RESPOSTA OXIDATIVA EM FOLHAS DE PLÂNTULAS DE CAJUEIRO AOS ESTRESSES COMBINADOS DE SECA E DE TEMPERATURA ELEVADA

Introdução

Os estresses hídrico e de temperatura elevada são fatores ambientais que afetam severamente a produtividade agrícola (Munns, 2002). A combinação de seca com temperaturas extremas é um caso típico de interação ambiental onde um fator abiótico interage de forma antagônica sobre o outro (Mittler, 2006). Em plantas expostas a temperaturas altas ocorre aumento da condutância estomática, associada à dissipação de calor e redução da temperatura foliar (Wahid et al., 2007; Rizhsky et al., 2002). No entanto, sob condições de seca, a condutância é limitada pela restrição hídrica do solo e, nessas condições, os efeitos do estresse térmico sobre o metabolismo vegetal serão potencializados (Rizhsky et al., 2004).

A seca e/ou temperaturas elevadas são estresses abióticos comumente relacionados com a indução de estresse oxidativo em plantas (Wang et al., 2003; Guo et al., 2006). O estresse hídrico reduz a condutância estomática e limita a fixação de CO₂, promovendo um desbalanço entre as fases bioquímicas e fotoquímicas da fotossíntese (Wahid et al., 2007). Por outro lado, temperaturas elevadas afetam a fotossíntese por alterações bioquímicas diretas, pelo aumento da atividade oxigenase da rubisco e pela dissociação do complexo protéico de liberação de O₂ nos cloroplastos, alterando o fluxo de elétrons entre os PSII e PSI (Wahid et al., 2007). Nos dois casos pode ocorrer produção excessiva de espécies reativa de oxigênio (EROs), por fotorrespiração ou por redução direta do O₂ (Mittler, 2002).

As EROs geradas durante os estresses hídrico e térmico incluem o radical superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil ([•]OH), indicadores comuns de ocorrência de injúrias oxidativas (Mittler, 2002). O O₂⁻ e H₂O₂ são formados durante o fluxo de elétrons em diferentes sítios celulares e são menos reativos que o [•]OH, que é formado pela combinação de O₂⁻ com H₂O₂ na presença de Fe⁺³, na reação de Haber-Weiss (Dat et al., 2000). O excesso de EROs causa peroxidação auto catalítica de lipídios, induzindo perda de permeabilidade de membrana (Xu et al., 2006), oxidação da guanina, causando mutação do DNA, e peroxidação dos resíduos de cisteína, metionina, histidina, prolina, triptofano e lisina, levando a desnaturação e inativação de proteínas (Møller et al., 2007).

Para evitar danos oxidativos, a célula possui um complexo sistema protetor composto por componentes não enzimáticos, ascorbato/glutationa, e enzimáticos, constituído pelas enzimas SODs, APXs, CATs e redutases de dehidroascorbato

(DHAR), de monodehidroascorbato (MDHR) e de glutathione (GR) (Noctor e Foyer, 1998). As SODs são consideradas a primeira linha de defesa oxidativa da célula e catalisam a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ para H_2O_2 e O_2 (Alscher et al., 2002). As APXs são as principais peroxidases na remoção do H_2O_2 na célula (Foyer, 1996), que atuando em sincronia com as enzimas DHAR, MDHR e GR, realizam a remoção de H_2O_2 no ciclo do ascorbato-glutathione (Halliwell, 1987). As CATs possuem menor afinidade pelo H_2O_2 comparado as APXs, mas são essenciais na remoção de H_2O_2 oriundo da fotorrespiração (Foyer e Noctor, 2000).

A combinação de seca e calor induz alterações metabólicas distintas comparadas aos estresses isolados. Por exemplo, em plantas de *N. tabacum*, expostas aos efeitos combinados de seca e de temperatura alta, ocorreu maior inibição fotossintética e aumento da respiração e da temperatura foliar, comparado às plantas submetidas somente ao estresse térmico (Rizhsky et al., 2002). Em gramíneas, *Festuca arundinacea* e *Poa pratensis*, a combinação de seca e calor induziu maior restrição de atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GR (Jiang e Huang, 2001). Essa restrição levou a maior peroxidação de lipídios e redução do conteúdo de clorofilas, indicando que a combinação dos estresses foi mais prejudicial do que os estresses isolados.

No entanto, apesar dos estudos demonstrarem que a combinação dos estresses de seca e calor é mais prejudicial ao desempenho vegetal que os estresses isolados (Heyne e Brunson, 1940; Savin e Nicolas, 1996), esses estudos são ainda bastante escassos. No campo, as plantas estão expostas a uma combinação de diferentes estresses abióticos, como seca e temperaturas elevadas, que afetam severamente o desempenho vegetal (Mittler, 2006). Estudos recentes têm mostrado que as respostas metabólicas atribuídas aos efeitos combinados dos estresses de seca e de temperaturas extremas são únicas, não podendo ser obtidas com base nas respostas induzidas pelos efeitos isolados desses estresses (Kreps et al., 2002; Rizhsky et al., 2002; Rizhsky et al., 2004; Mittler, 2006).

Dessa forma, no presente estudo foram avaliadas as alterações induzidas pelos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e temperatura elevada, sobre variáveis fisiológicas relacionadas com a condutância estomática e *status* hídrico em plântulas de cajueiro, visando associar essas alterações com a produção de H_2O_2 e com os mecanismos de injúria e proteção oxidativa na espécie.

Material e métodos

Material vegetal e aplicação dos tratamentos

Sementes de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.), clone CCP 06, fornecidas pela EMBRAPA-CNPAT, foram esterilizadas em hipoclorito de sódio 5% (v/v) e semeadas em vasos de 2,0 L, contendo vermiculita, sob condições de casa de vegetação. Durante as fases de germinação e crescimento inicial das plântulas, a umidade do substrato foi mantida próxima da capacidade de campo, por irrigações freqüentes com água destilada. Após 35 dias plântulas homogêneas, com 8 folhas expandidas, foram utilizadas no experimento. Durante o ensaio as plântulas foram mantidas sob condições controle, irrigadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) diluída 1/4, ou submetidas à seca por suspensão da rega tempo suficiente para induzir restrição estomática superior a 80%, por no mínimo 10 dias. Com base nesse critério as plântulas permaneceram expostas à seca por 20 dias, momento em que foram expostas aos tratamentos de temperatura. Para aplicação dos tratamentos as plântulas, controle ou estressadas, foram transferidas para câmara B.O.D. (CIENITEC/modelo 708) e submetidas a 25 °C ou 45 °C em condições controladas de luminosidade ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e umidade relativa ($65 \pm 5\%$), por fotoperíodo de 12 h. Para aplicação dos tratamentos, as plântulas foram transferidas para a câmara no final da tarde (18:00 h), onde permaneceram por 12 h no escuro em temperatura ambiente, e no início do dia seguinte (06:00 h) foram submetidas aos respectivos tratamentos. Após 9 h do início do tratamento (15:00 h) foram realizadas medidas de transpiração e da resistência estomática, com auxílio de um porômetro, e ao final do fotoperíodo (18:00) foram coletados discos foliares para determinar o conteúdo relativo de água e o dano de membrana. Em seguida, as folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

Conteúdo relativo de água

O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado conforme Fidalgo et al. (2004). Ao final do experimento, foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro) e a massa fresca (MF) determinada imediatamente. Em seguida, os discos foram imersos em 30 ml de água deionizada por 8 h, em placas de petri, e após breve secagem dos discos em papel toalha, para remover o excesso de água, foi determinada a massa túrgida (MT). A massa seca (MS) foi determinada após secagem dos discos a 70°C, durante 48 h em estufa, e o CRA estimado pela seguinte relação: $[(MT - MS)/(MF - MS)] \times 100$.

Dano de membrana

O dano de membrana foi determinado conforme Shanahan et al. (1990). Ao final do ensaio foram coletados vinte discos foliares (10 mm de diâmetro), foram imersos em 10 ml de água deionizada em tubos fechados e incubados a 40 °C durante 30 min e determinada a condutividade elétrica da solução (C1). Em seguida, os tubos foram incubados a 100 °C por 1 h e após atingir a

temperatura ambiente foi determinada a condutividade elétrica da solução (C2). O dano de membrana (DM) foi estimado pela relação, $(C1/C2) \times 100$.

Conteúdo de peróxido de hidrogênio

O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi determinado conforme Cheeseman et al., (2006). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas na presença de N_2 líquido até obtenção de farinha, seguido da adição de 0,75 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,4, contendo KCN 5 mM e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a $13.000 \times g$ por 20 min a $4^\circ C$ e alíquotas de 0,1 mL do sobrenadante foram adicionadas a 0,9 ml de meio de reação contendo 100 μM de $FeSO_4$, 250 μM de $(NH_4)_2SO_4$, 25 mM de H_2SO_4 , 100 μM de alaranjado de xilenol e 99 mM de sorbitol. A mistura foi incubada a $25^\circ C$ por 30 min e em seguida realizadas leituras de absorbância a 560 nm. As concentrações de peróxido de hidrogênio foram obtidas a partir de curva padrão, utilizando H_2O_2 , e os dados expressos em $\mu mol g^{-1} MF$.

Peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios foi estimada pelo conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme Heath e Packer (1968). Amostras (0,1 g) de folhas frescas foram macerados em almofariz na presença de N_2 líquido, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a $12.000 \times g$, durante 15 min a $4^\circ C$, e 0,5 ml do sobrenadante foram adicionados a 2,0 ml do meio de reação contendo TCA 20% (p/v) e TBA 0,5% (p/v), em tubos hermeticamente fechados. A reação foi aquecida em banho maria a $95^\circ C$, durante 1 h, e em seguida foi interrompida em banho de gelo. Após 30 min a $25^\circ C$, foram realizadas leituras de absorbância a 532 e 660 nm, e depois de subtraídas as absorbâncias obtidas a 660 das obtidas a 532 nm, o conteúdo de TBARS foi estimado utilizando o coeficiente de extinção molar de $155 mM^{-1} cm^{-1}$ e expresso em $nmol g^{-1} MF$.

Conteúdos de glutatona total, reduzida e oxidada

Os conteúdos de glutatona total (GSH+GSSG) e das formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram determinados conforme Griffith (1980). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N_2 líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 5% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a $14.000 \times g$ por 15 min a $4^\circ C$ e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação. Para determinação da GSH alíquotas de 0,2 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 2,6 ml de tampão fosfato de sódio 150 mM (pH 7,4), 1 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) e 0,2 ml de 5,5'-ditio-bis 2-ácido-nitrobenzóico (DTNB) 30 mM, em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). O conteúdo de glutatona total (GSH + GSSG) foi determinado pela adição de 0,2 ml do sobrenadante seguido da adição de 1,6 ml de tampão fosfato 150 mM (pH 7,4), contendo 1 unidade de GR, 1,0 ml de NADPH 0,15 mM, 1,0 ml de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) e 0,2 ml de DTNB 30 mM, em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0). Em seguida a reação foi acondicionada em banho maria a $30^\circ C$, durante 10min. Ao final, foram

realizadas leituras de absorvância a 412 nm e os conteúdos de GSH e GSH + GSSG estimados com base em curva padrão, de GSH, e expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. O conteúdo da GSSG foi obtido pela subtração da glutatona reduzida da total.

Conteúdos de ascorbato total, reduzido e oxidado

Os conteúdos de ascorbato total (ASA+DHA), e das formas reduzida (ASA), e oxidada (DHA) foram determinados conforme Kampfenkel et al. (1995). Amostras de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N_2 líquido, até obtenção da farinha, seguido da adição de 1,0 ml de TCA 6% e maceração por mais 3 min. O extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 15 min a 4 °C e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação. Para o ascorbato reduzido alíquotas de 0,1 ml do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,3 ml de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,4), 0,1 ml de água destilada, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H_2PO_4 45%, 0,4 ml de biperidil 4% e 0,2 ml de FeCl_3 . O conteúdo de ascorbato total foi determinado pela adição de 0,1 ml do extrato ao meio de reação contendo 0,1 ml de DTT 10 mM (em tampão fosfato 200 mM), 0,2 ml e tampão fosfato de potássio 200mM (pH 7,4), 0,1 ml de N-etilmaleiamida 0,5%, 0,5 ml de TCA 10%, 0,4 ml de H_2PO_4 45%, 0,4 ml de biperidil 4% e 0,2 ml de FeCl_3 . A reação foi acondicionada em banho maria a 40°C, durante 30 min, e em seguida foram realizadas leituras de absorvância a 525 nm. Os conteúdos do ascorbato total (ASA+DHA) e reduzido (ASA) foram estimados com base em curva padrão, utilizando L – ascorbato, e expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. O conteúdo do DHA foi obtido pela subtração do ascorbato reduzido do total.

Extração de proteínas

A extração de proteína foi realizada conforme Zimmermam et al. (2006), com modificações. Amostra de folhas frescas (0,1 g) foram maceradas em almofariz na presença de N_2 líquido seguido da adição de tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), contendo 30 mM de DTT, 20% de glicerol e 3% de PEG-6000. Para determinação da atividade das enzimas peroxidase do ascorbato e dismutase do superóxido, o pH do tampão foi alterado para 7,0 e o DTT foi substituído por ascorbato 1 mM. Após a extração, o extrato foi centrifugado a 14.000 x g durante 30 min, a 4 °C. O conteúdo de proteínas solúveis foi determinado conforme Bradford (1976) e estimado com base em curva padrão, utilizando BSA.

Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (PAGE-SDS)

Para as PAGE-SDS alíquota de 20 μL de extrato protéico foram misturas a 20 μL do tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, glicerol, SDS 10% e azul de boromofenol) e 20 μL da mistura foi aplicado em cada poço. Os géis apresentavam a seguinte constituição: 12,5% (main gel) e 5% (stacking gel), e as eletroforeses foram realizadas a 125 V, 20 mA e 10 W, por cada gel, usando o tampão de corrida (Tris 25 mM/Glicina 192 mM, pH 8,3 e SDS 10%). Após a eletroforese, as

proteínas foram coradas com o *Comassie brilliant blue* R-250 0,025%, em ácido acético 10% e metanol 40%, durante 2 h. Em seguida os géis foram descorados em ácido acético 10% e metanol 40% (Laemmli, 1970).

Atividade enzimática

A atividade da peroxidase de ascorbato (APX; EC: 1.11.1.1) foi determinada conforme método descrito por Nakano e Asada (1981). Alíquotas de 0,1 ml de extrato protéico foram adicionadas ao meio de reação composto de 2,7 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0), contendo 0,5 mM de ácido ascórbico. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂ (30 mM) ao meio de reação e acompanhada pelo decaimento da absorbância a 290 nm em espectrofotômetro durante 300 seg, com leitura sucessivas em intervalos de 30 seg. A atividade da APX foi estimada utilizando o coeficiente e de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ para o ascorbato, em 290 nm, e expressa como μmol AsA g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da catalase (CAT; EC: 1.11.1.6) foi determinada conforme Haver e McHale (1987). Alíquotas de 0,05 ml de extrato protéico foram adicionadas a 2,95 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), contendo H₂O₂ (20 mM). A reação ocorreu a 30°C e foi acompanhado pelo decaimento da absorbância a 240 nm durante 300 seg, com leituras sucessivas a cada 30 seg. A atividade da enzima foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ para o H₂O₂, em 240 nm, e expressa em nmol H₂O₂ g⁻¹ MF min⁻¹.

A atividade da dismutase de superóxido (SOD; EC: 1.15.1.1) foi determinada conforme metodologia descrita por Gianopolitis e Ries (1977). Alíquotas de 0,1 ml do extrato protéico foram transferidas para meio de reação, em tubos protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), 0,1 mM de EDTA, 13 mM de L-metionina e 75 μM de NBT. A reação foi iniciada pela adição de 2 mM de riboflavina e rápida transferência dos tubos, sem a proteção da luz, para câmara iluminada por lâmpada de 30 wats (30 μmol de fótons m⁻² s⁻¹), durante 6 minutos. A reação foi interrompida pelo desligamento da luz, os tubos foram revestidos por filme escuro e realizadas leituras a 540nm. A atividade foi estimada com base na inibição da redução do NBT, definindo-se uma unidade de atividade como a quantidade da enzima necessária para inibir 50% da fotoredução (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade foi expressa em U.A. g⁻¹ MF min⁻¹.

Zimograma e identificação das isoenzimas da dismutase do superóxido (SOD)

Inicialmente, as proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida 10% sob condição nativa (PAGE nativa). Alíquotas (± 10 μl) de extrato protéico foram misturadas com tampão de aplicação (Tris 25 mM/glicina 190 mM, pH 8,3), na proporção 1/1 (v/v), e submetidas à eletroforese (125 V, 20 mA e 10 W por gel). Após a separação das proteínas, os géis foram revelados para atividade da SOD conforme Beauchamp e Fridovich (1971). Inicialmente foram incubados em 50 ml de NBT 2 mM por 15 min, rapidamente lavados com água destilada e novamente incubados, na ausência da luz, em 50 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), contendo TEMED 28 mM e riboflavina (0,1 mg/ml), por 15 min. Em seguida, os géis foram lavados com água destilada e

expostos à luz, em caixa boxe contendo lâmpada fluorescente de 30 wats ($30 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para indução da reação fotoquímica. Após revelação das bandas acromáticas a reação foi interrompida pelo desligamento da luz e sucessivas lavagens dos géis com água. A diferenciação das isoformas da SOD foi realizada pela prévia incubação dos géis por 15 min em tampão fosfato de potássio contendo H_2O_2 (5 mM) ou KCN (2 mM), conforme Martinez et al., (2001). As isoformas Cu/Zn-SOD e Fe-SOD são sensíveis ao H_2O_2 , a Fe-SOD é resistente ao cianeto, enquanto a Mn-SOD é resistente ao H_2O_2 e ao CN^- (Scandalios, 1993). Após a pré-incubação para inibição específica das isoformas os géis foram revelados conforme descrito acima.

Zimograma da catalase (CAT)

Após a separação das proteínas em gel de poliacrilamida a 7,5% os géis foram revelados para atividade de catalases conforme Thorup et al. (1961). Alíquotas (50 μl) de extrato protéico foram misturadas ao tampão de aplicação (Tris 25 mM/glicina 190 mM, pH 8,3), na proporção 1/1 (v/v) e 20 μl da mistura foi submetido à PAGE nativa (125 V, 20 mA e 10 W por gel). Após a eletroforese os géis foram pré-incubados em H_2O_2 0,3% (p/v) por 20 min, em agitação suave, seguido de rápida lavagem com água destilada e imersão em solução de FeCl_3 0,5% (p/v) e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ 0,5% (p/v). Após o surgimento das bandas acromáticas sobre o fundo verde dos géis a reação foi interrompida por lavagens com água destilada. As soluções de FeCl_3 e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN}_6)$ foram preparadas isoladamente, mantidas no escuro, e misturadas somente no momento da aplicação sobre os géis.

Delineamento estatístico e análise dos dados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com tratamentos em fatorial 2 x 2, dois níveis de umidade (irrigado e seca) e duas temperaturas (25°C e 45°C), resultando nas seguintes combinações de tratamentos: (Irrigado+25 °C / Seca+25 °C / Irrigado+45 °C / Seca+45 °C). Os dados foram submetidos ao teste F a 0,05 de probabilidade por análise de variância e as médias das variáveis submetidas ao teste de Tukey em mesmo nível de significância.

Resultados

Respostas fisiológicas de plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses hídrico e de temperatura elevada

Os efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de temperatura elevada afetaram diferentemente a transpiração e a resistência estomática das plântulas (Figura 20). A transpiração das plântulas submetidas a seca foi reduzida em 70% e nas plântulas expostas a 45 °C ocorreu aumento de três vezes, enquanto que naquelas submetidas a combinação de seca e temperatura elevada esse aumento foi de apenas duas vezes (Figura 20A). A resistência estomática das plântulas submetidas ao estresse hídrico foi aumentada em quatro vezes, nas plântulas expostas a 45 °C foi reduzida em 50%, e naquelas submetidas à combinação de seca e de temperatura elevada não foi alterada (Figura 20B). As plântulas submetidas aos diferentes tratamentos não apresentaram mudanças significativas nos danos de membrana, medida pelo vazamento de eletrólitos, e o CRA foi reduzido somente nas plântulas submetidas ao estresse hídrico (Figura 20D)

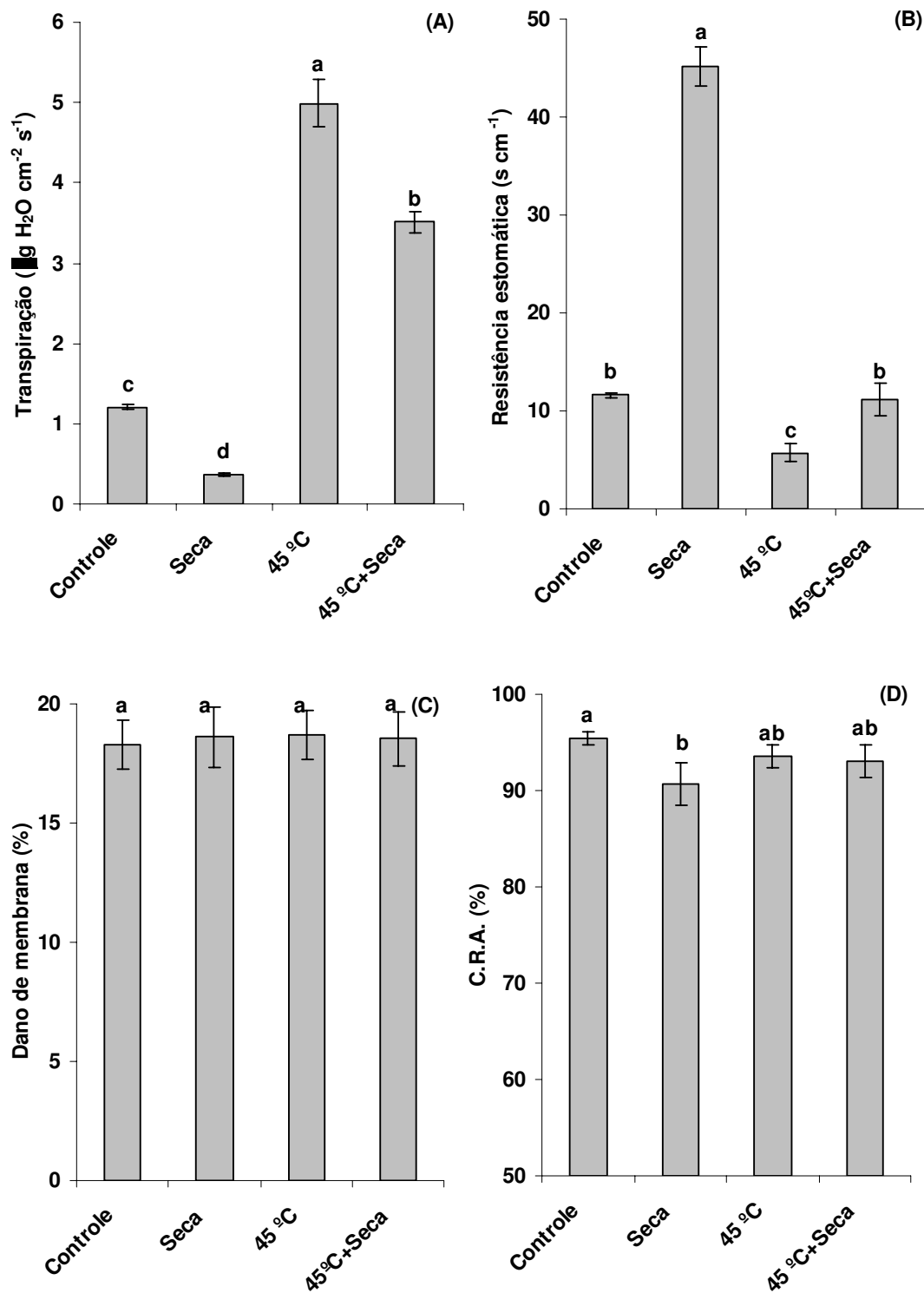


Figura 20 (A) Transpiração, (B) resistência estomática, (C) dano de membrana e (D) conteúdo relativo de água em plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de alta temperatura. (Controle); (Seca = suspensão da rega por 20 dias); (45 °C = 12 h em 45 °C); (Seca+ 45 °C = suspensão da rega por 12 dias + 12 h em 45 °C).

Alterações oxidativas em plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses hídrico e temperatura elevada

Os efeitos isolados e combinados dos estresses hídrico e de temperatura elevada alteraram os conteúdos de H₂O₂ e de TBARS foliar das plântulas de cajueiro (Figura 21). O conteúdo de H₂O₂ foliar das plântulas submetidas aos efeitos isolados dos estresse hídrico e de temperatura elevada ou a combinação desses estresses foi 20% maior, comparado ao controle (Figura 21A). Nas plântulas submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses hídrico e de temperatura elevada o conteúdo de TBARS foi 25% maior, comparado ao controle (Figura 21B).

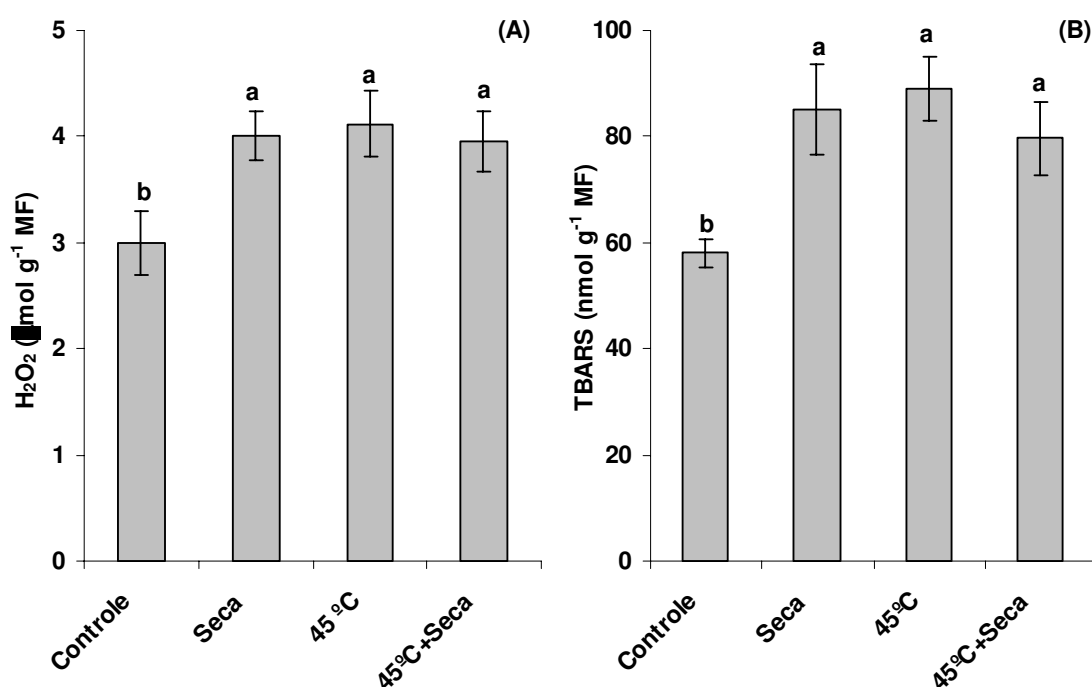


Figura 21 (A) Conteúdos de peróxido de hidrogênio e (B) TBARS em folhas de plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de alta temperatura. (Controle); (Seca = suspensão da rega por 20 dias); (45 °C = 12 h em 45 °C); (Seca+45 °C = suspensão da rega por 12 dias + 12 h em 45 °C).

Proteína solúvel e atividade de enzimas antioxidativas em plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses hídrico e temperatura elevada

O conteúdo de proteína solúvel e as atividades das enzimas SOD, APX e CAT nas plântulas foram diferentemente afetados pelos efeitos isolados e combinados dos estresses hídrico e térmico (Figura 22). Nas plântulas submetidas ao estresse hídrico ou combinação dos estresses, o conteúdo de proteína solúvel foi reduzido em 30%, enquanto que nas plântulas expostas a 45 °C o conteúdo de proteína foi 28% maior (Figura 22A). A análise por SDS-PAGE foi compatível ao observado para o teor de proteína solúvel foliar, indução significativa de todos os polipeptídios com massa molecular entre 14 e 220 kDa, particularmente daqueles com massa molecular próxima de 50 kDa (Figura 23A).

A atividade total da SOD foi aumentada em 20% nas plântulas submetidas aos estresses de seca ou a combinação de seca e temperatura elevada, enquanto que nas plântulas expostas a 45 °C esse incremento foi de 40% (Figura 22B). A identificação das isoformas da SOD revelou a existência de quatro isoformas Cu/Zn-SOD, nas plântulas controle, expostas à seca e à combinação dos estresses, indicando aumento de atividade dessas isoformas em resposta a seca, temperatura elevada e na combinação dos estresses (Figura 22B). Além das quatro isoformas Cu/Zn-SOD, todas com atividade aumentada, ocorreu a indução de uma Fe-SOD nas plântulas expostas a 45 °C (Figura 23B).

A atividade da CAT nas plântulas expostas a 45 °C por 9 h foi 60% maior, enquanto que naquelas submetidas à seca ou à combinação dos estresses a atividade da CAT apresentou redução superior a 50%, comparado ao controle (Figura 22C). A atividade em gel da CAT apresentou padrão similar, redução de atividade em respostas ao estresse hídrico ou combinação dos estresses, e indução significativa nas plântulas expostas a 45 °C (Figura 22C). A atividade da APX não foi afetada pelos estresses hídrico ou pela combinação dos estresses. No entanto, apresentou acréscimo de 40% nas plântulas submetidas ao estresse térmico (Figura 22D).

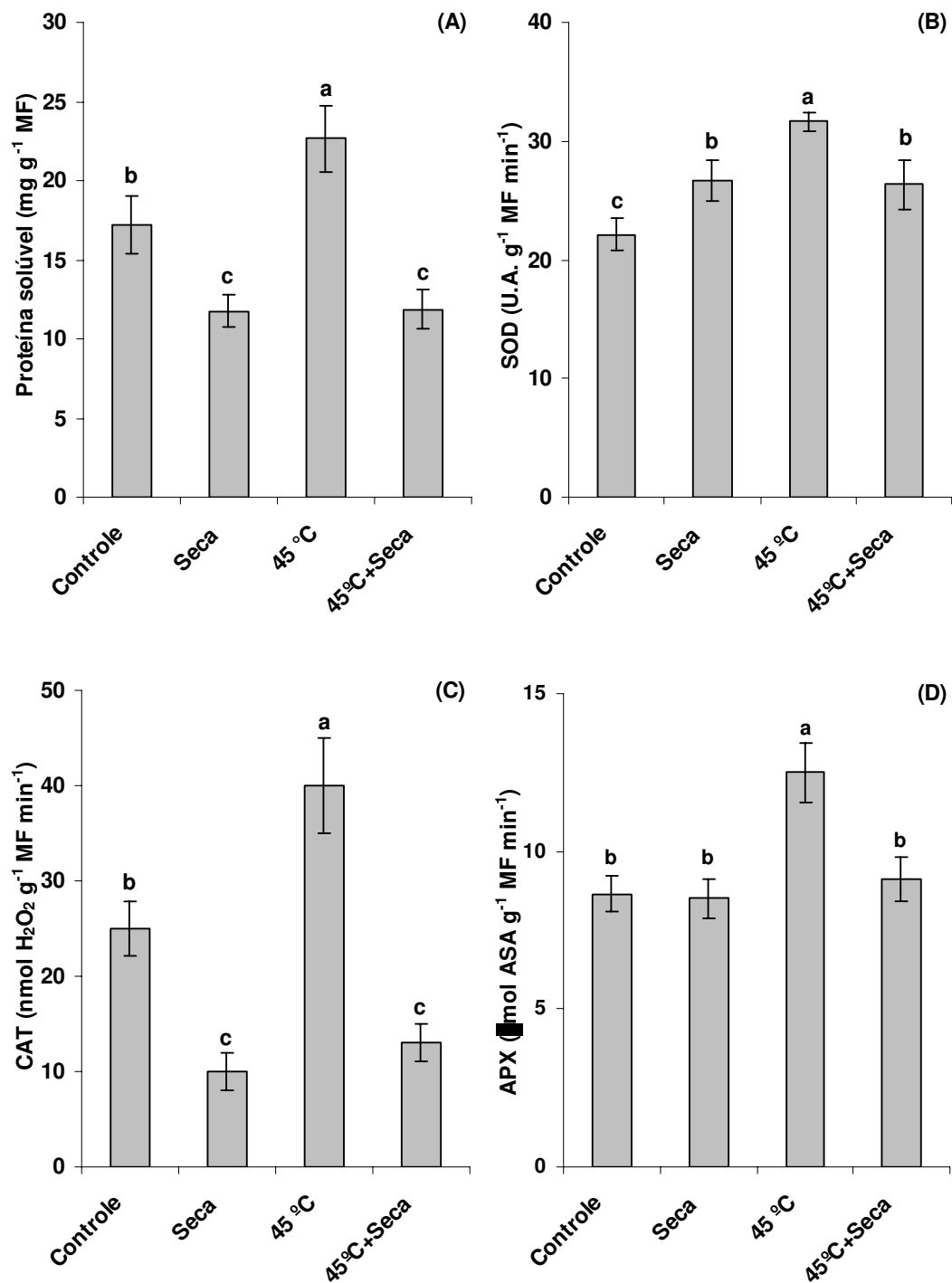


Figura 22 (A) Conteúdo de proteína solúvel e atividade das enzimas (B) dismutase de superóxido (C) catalase e (D) peroxidase de ascorbato em folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e alta temperatura. (Controle); (Seca = suspensão da rega por 20 dias); (45 °C = 12 h em 45 °C); (Seca+45 °C = suspensão da rega por 12 dias + 12 h em 45 °C).

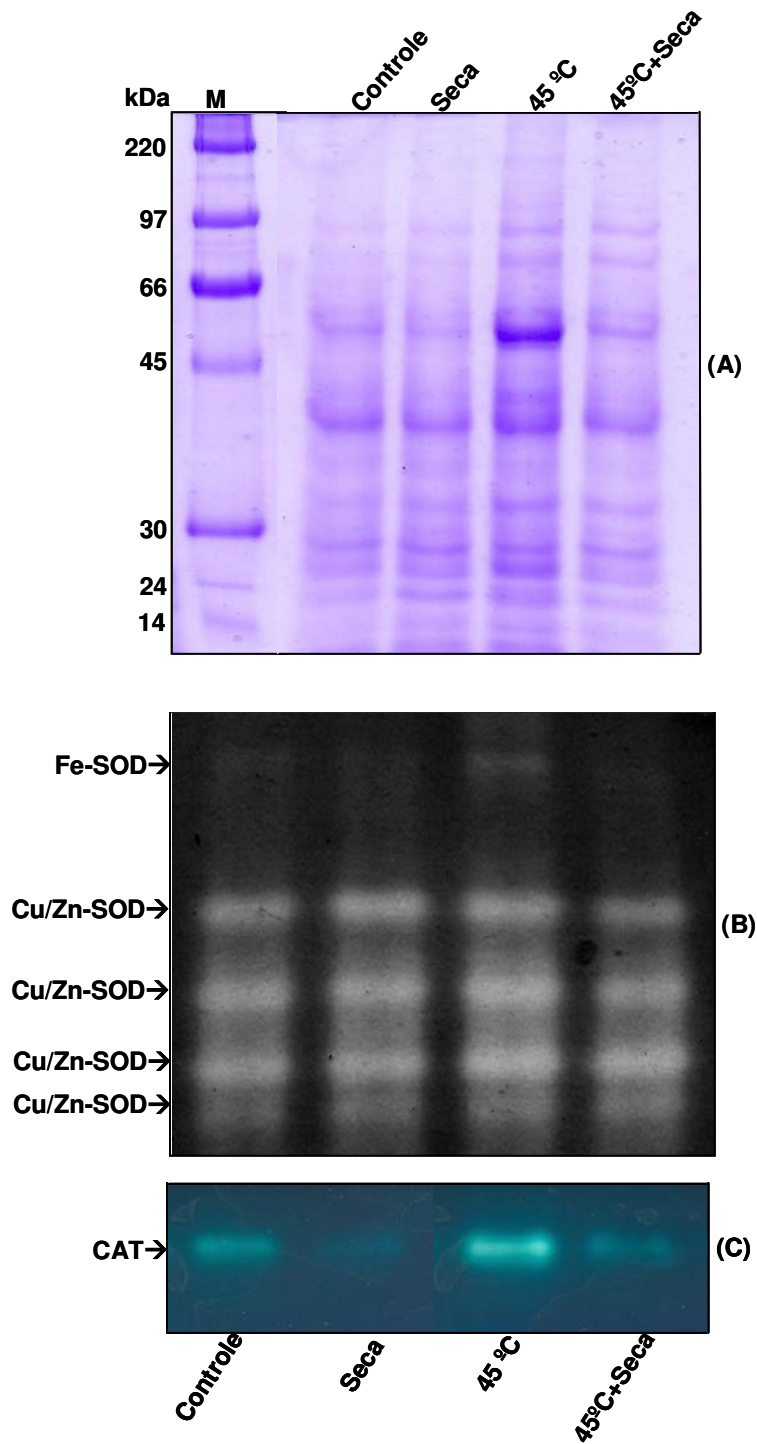


Figura 23 (A) SDS-PAGE e zimograma para (B) dismutase de superóxido e (C) catalase de proteínas de folhas de plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de alta temperatura. M – marcador de peso molecular; (Controle); (Seca = suspensão da rega por 20 dias); (45°C = 12 h em 45°C); (Seca+45°C = suspensão da rega por 12 dias + 12 h em 45°C). Em todas as eletroforeses foram aplicados 20µl de extrato protéico em cada poço, ± 40 µg de proteína.

Mudanças nos conteúdos de ascorbato e de glutaciona em plântulas de cajueiro submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses hídrico e temperatura elevada

O conteúdo do ascorbato total nas plântulas expostas ao estresse hídrico e a combinação dos estresses de seca e temperatura elevada foi igualmente reduzido em 20% (Tabela 10). O conteúdo do ASA nas plântulas submetidas a seca, a 45 °C e a combinação dos estresses foi reduzido em 15, 50 e 22%, respectivamente. O teor do DHA nas plântulas expostas à seca ou combinação dos estresses foi reduzido em cerca de 40%, enquanto naquelas expostas a 45 °C ocorreu aumento de 130%. A relação ASA/DHA foi 80% menor nas plântulas submetidas a 45 °C, e 62% maior nas plântulas submetidas a combinação dos estresses (Tabela 10).

O conteúdo de glutaciona total foi cerca de 35% maior nas plântulas submetidas à seca, temperatura elevada ou combinação dos estresses (Tabela 11). Os estresses de seca, temperatura elevada e a combinação de seca e temperatura elevada não afetaram o conteúdo da glutaciona reduzida. No entanto, o teor da glutaciona oxidada nas plântulas submetidas aos estresses de seca e temperatura elevada foi aumentado em 100 e 180%, respectivamente, enquanto que nas plântulas expostas a combinação dos estresses de seca e temperatura alta não foi alterada (Tabela 11). A relação GSH/GSSG foi reduzida em mais de 40% nas plântulas submetidas aos estresses hídrico e térmico, porém não foi alterado pela combinação dos estresses.

Tabela 10 Conteúdos de ascorbato total (ASA+DHA), reduzido (ASA), oxidado (DHA) e balanço redox (ASA/DHA) em plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de alta temperatura

Tratamento	ASA+DHA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	ASA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	DHA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	ASA/DHA (%)
Controle	11,82a	9,50a	2,28b	4.17b
Seca	9,16b	8,16b	1,41c	5.12b
45 °C	10,92a	4,70c	5,44a	0.90c
Seca + 45 °C	8,92b	7,72b	1,14c	6.78a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey. (Controle); (Seca = suspensão da rega por 20 dias); (45 °C = 12 h em 45 °C); (45 °C+Seca = suspensão da rega por 12 dias + 12 h em 45 °C).

Tabela 11 Conteúdos de glutathiona total (GSH+GSSG), reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e balanço redox (GSH/GSSG) em folhas de plântulas de cajueiro expostas aos efeitos isolados e combinados dos estresses salino e alta temperatura

Tratamento	GSH+GSSG ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	GSH ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	GSSG ($\mu\text{mol g}^{-1}$ MF)	GSH/GSSG (%)
Controle	3,07b	1,97a	1,25c	1,57a
Seca	4,78a	2,45a	2,56b	0,95c
45 °C	4,92a	1,83a	3,54a	0,51c
Seca + 45 °C	4,43a	2,87a	1,47c	1,90a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem a 0,05 de probabilidade pelo teste de Tukey. (Controle); (Seca = suspensão da rega por 20 dias); (45 °C = 12 h em 45 °C); (45 °C+Seca = suspensão da rega por 12 dias + 12 h em 45 °C).

Discussão

No presente estudo, plântulas de cajueiro foram submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses hídrico e temperatura elevada. Nas plântulas submetidas à seca, ocorreu redução significativa da transpiração. Naquelas expostas a 45 °C, ocorreu aumento de três vezes da transpiração enquanto nas plântulas submetidas à combinação dos estresses esse aumento foi de duas vezes, indicando que temperaturas elevadas modulam intensamente o fluxo transpiratório na espécie. O incremento da condutância estomática em plantas submetidas a temperaturas elevadas representa um importante mecanismo fisiológico de dissipação de calor (Rizhsky et al., 2002). Dessa forma, o intenso aumento da transpiração, observado nas plântulas expostas ao estresse térmico ou a combinação dos estresses, pode está associado à manutenção da temperatura foliar na espécie.

No entanto, nas plântulas submetidas à combinação dos estresses, ocorreu menor incremento da transpiração, comparado àquelas expostas a 45 °C. Esse resultado indica que a seca pode limitar a dissipação de calor foliar, via fluxo transpiratório. Em plantas expostas simultaneamente aos estresses hídrico e temperaturas elevadas, a menor transpiração pode resultar no aumento da temperatura foliar e dano celular. Plantas de *N. tabacum* submetidas aos efeitos combinados de seca e de temperatura elevada apresentaram maior temperatura foliar comparado àquelas expostas somente ao estresse térmico (Rizhsky et al., 2002). O aumento da temperatura foliar em plantas de fumo e *Arabidopsis*, submetidas à combinação de seca e de temperatura alta, ocorreu associado a forte inibição da fotossíntese e intenso aumento da respiração foliar (Rizhsky et al., 2002; Rizhsky et al., 2004).

A restrição hídrica causa alterações do *status* hídrico foliar, como indicado pelo potencial hídrico ou pelo conteúdo relativo de água (Cattivelli et al., 2008). As plântulas de cajueiro submetidas ao estresse hídrico apresentaram significativa redução do conteúdo relativo de água foliar. No entanto, nas plântulas expostas ao estresse térmico ou à combinação dos estresses o CRA foliar não foi alterado. Esses resultados demonstram que a seca reduziu a hidratação foliar e indicam que o aumento do fluxo transpiratório, induzido por temperaturas elevadas, levou ao restabelecimento do *status* hídrico foliar. Dessa forma, o incremento da transpiração

nas plântulas submetidas à combinação de seca e calor pode ter auxiliado na aclimação das plântulas sob condições de seca e calor, contribuindo para dissipação térmica e manutenção do *status* hídrico foliar.

A restrição estomática induzida pelo estresse hídrico limita a fotossíntese pela restrição da fixação de CO₂ resultando no desbalanço entre a produção e remoção de espécies reativas de oxigênio na célula (Foyer e Noctor, 2003). Por outro lado, temperaturas elevadas podem alterar as propriedades cinéticas da rubisco, reduzindo sua afinidade pelo CO₂ e aumentando a atividade de oxigenase, levando ao aumento do processo fotorrespiratório e resultando na produção excessiva de EROs, nos cloroplastos e nos peroxissomos (Foyer e Noctor, 2000). Isoladamente, esses dois estresses são responsáveis pela alteração do estado redox celular em diferentes espécies vegetais, que geralmente resulta em dano oxidativo, pela oxidação de lipídios, proteínas e DNA (Foyer e Noctor, 2003; Møller et al., 2007).

No presente estudo, plântulas de cajueiro apresentaram incremento no conteúdo de H₂O₂ foliar quando submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e de temperatura elevada. O incremento no conteúdo de H₂O₂ ocorreu associado à peroxidação de lipídios, como indicado pelo aumento no conteúdo de TBARS, nas plântulas submetidas à seca, ao estresse térmico ou a combinação desses estresses. O incremento nos conteúdos de H₂O₂ e TBARS são sintomas típicos de estresse oxidativo induzido por seca e temperaturas elevadas. Em plantas de trigo submetidas ao estresse hídrico de longa duração foi observado intenso acúmulo de H₂O₂ associado ao incremento do conteúdo do TBARS (Selote e Khanna-Chopra, 2006). Resultados similares foram observados quando dois cultivares de *Citrus* foram submetidos a temperaturas elevadas durante 15 dias (Guo et al., 2006).

No entanto, apesar do grande número de relatos na literatura acerca dos danos oxidativos causados pelos estresses hídrico e de temperaturas elevadas, são praticamente inexistentes estudos sobre os efeitos combinados de dois ou mais estresses no metabolismo vegetal (Mittler, 2006). Estudos recentes têm demonstrado que as respostas metabólicas associadas à combinação de seca e temperatura alta são únicas, e não podem ser obtidas com base nas alterações induzidas por esses estresses isoladamente (Rizhsky et al., 2002; Rizhsky et al., 2004). O presente estudo, foi observado que as alterações da transpiração nas plântulas expostas a combinação de seca e temperatura alta são distintas daquelas

induzidas pelos estresses isoladamente, demonstrando que a aclimação das plântulas à combinação desses estresses requer alterações estomáticas.

Os efeitos isolados e combinados dos estresses hídrico e térmico induziram estresse oxidativo no cajueiro, como indicado pelo acúmulo de H_2O_2 e de TBARS. Para evitar danos oxidativos as plantas possuem um complexo sistema de proteção constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, incluindo o ASA, a GSH e as enzimas SOD, CAT e APX, que atuam de forma coordenada na proteção celular. Em gramíneas, *Festuca arundinacea* e *Poa pratensis*, plantas resistentes à seca e expostas à combinação de seca e de temperatura elevada, foi observada maior restrição das atividades das enzimas SOD, CAT, APX e GR, comparada aos efeitos isolados dos estresses (Jiang e Huang, 2001). Essa restrição levou à maior peroxidação de lipídios, indicando que a combinação de seca e calor pode ser mais prejudicial ao metabolismo vegetal comparado aos estresses isolados.

No presente estudo, ocorreu aumento de 18% na atividade da SOD nas plântulas expostas à seca ou à combinação de seca e estresse térmico. No entanto, nas plântulas submetidas somente ao estresse térmico, ocorreu aumento de 35% na atividade da SOD. A análise das isoformas dessa enzima demonstrou que o aumento de atividade total da SOD, nas plântulas submetidas à seca ou a combinação dos estresses, está associada à atividade de quatro isoformas Cu/Zn-SOD. No entanto, o aumento de atividade total da SOD nas plântulas submetidas ao estresse térmico ocorreu pelo aumento de atividade dessas quatro isoformas associado a indução de uma nova isoforma Fe-SOD, indicando que a restrição de atividade da SOD induzida pela seca está relacionada a inibição de expressão da Fe-SOD (Figura 21B).

As SODs possuem papel central da manutenção do estado redox celular, sob condições fisiológicas ou de estresses, e suas isoformas Cu/Zn-SOD podem estar localizadas nos cloroplastos e no citosol, enquanto as isoformas Fe-SOD são exclusivas dos cloroplastos (Alscher et al., 2002). Dessa forma, o aumento da atividade das Cu/Zn-SOD nas plântulas expostas à seca ou à combinação dos estresses pode representar um importante mecanismo de proteção oxidativa no cajueiro nessas condições. Estudo recente demonstrou que a combinação de seca e choque térmico resultou na indução predominante de transcritos da Cu/Zn-SOD em plantas de *N. tabacum*, em relação aos transcritos da APX ou CAT (Rizhsky et al., 2002). A indução da Fe-SOD nas plântulas expostas ao estresse térmico indicam

seu papel na proteção a danos oxidativos nos cloroplastos, proteção ausente nas plântulas submetidas à combinação dos estresses. Em plantas de *Chenopodium murale* a Cu/Zn-SOD do estroma dos cloroplastos apresentou maior estabilidade ao calor comparada a isoforma Cu/Zn-SOD do tilacóide, e foi mais importante na remoção do $\cdot\text{O}_2^-$ durante o estresse térmico (Khanna-Chopra e Sabarinath, 2004).

A atividade da CAT foi reduzida em 60% nas plântulas expostas ao estresse hídrico ou a combinação dos estresses. No entanto, nas plântulas submetidas ao estresse térmico ocorreu aumento de 40% da atividade da CAT (Figuras 22C e 23C). Esse resultado indica que a CAT possui importante papel na proteção oxidativa do cajueiro durante o estresse térmico, e que o estresse hídrico pode limitar a ação da CAT durante a exposição a temperaturas elevadas. A CAT é a principal removedora de H_2O_2 durante a fotorrespiração (Mittler, 2002). Dessa forma, o aumento de atividade da CAT nas plântulas expostas ao estresse térmico pode indicar a ocorrência de fotorrespiração. No entanto, os resultados mostram que o aumento de atividade da CAT não impediu o acúmulo de H_2O_2 , resultando no acúmulo de TBARS e indicando a ocorrência de danos oxidativos nessas condições, embora não tenha sido observado dano de membrana, com base no vazamento de eletrólitos.

A atividade da APX foi 45% maior nas plântulas submetidas ao estresse térmico. No entanto, nas plântulas expostas ao estresse hídrico ou combinação de seca e estresse térmico não foi observado aumento de atividade dessa enzima, indicando que o estresse hídrico limitou o papel dessa enzima na proteção oxidativa quando as plântulas foram expostas ao calor. A APX está presente em diferentes organelas celulares e é responsável pela remoção do excesso de H_2O_2 , sob condições fisiológicas ou de estresse (Foyer e Noctor, 2003). As APXs possuem alta afinidade pelo H_2O_2 e atuam na sua eliminação em concentrações de μM , podendo modular indiretamente eventos de sinalização controlados por flutuações suaves da concentração do H_2O_2 (Mittler, 2002; Buchanan e Balmer, 2005).

As APXs catalisam a redução do H_2O_2 utilizando ascorbato reduzido (ASA) como doador específico de elétrons, produzindo ascorbato oxidado (DHA) e alterando o estado redox (ASA/DHA) do sistema ascorbato (Noctor e Foyer, 1998). No presente estudo, o aumento de atividade da APX nas plântulas expostas ao estresse térmico ocorreu associado à redução de 50% do conteúdo do ASA e aumento de 130% do DHA. Essa alteração levou a redução de 80% do balanço redox do ascorbato (ASA/DHA), indicando o papel do ascorbato na remoção do H_2O_2

via atividade da APX, em plântulas de cajueiro submetidas ao estresse térmico. No entanto, nas plântulas expostas a seca ou a combinação dos estresses, com baixa atividade de APX, não ocorreu aumento do DHA, indicando que o estresse hídrico limitou a remoção do H_2O_2 via APX. A redução do conteúdo de ascorbato em plantas de *Cucumis sativus* submetidas à temperatura elevada ocorreu associada ao aumento de atividade das APXs mitocondrial, citosólica e, principalmente, daquela do estroma dos cloroplastos (Song et al., 2005).

A GSH e o ASA são os principais antioxidantes não enzimáticos da célula vegetal (Noctor e Foyer, 1998). A GSH é a principal forma de grupos SH não protéico, e atua como uma barreira entre os grupos SH de proteínas e as EROs, sob condições fisiológicas ou de estresses (Foyer e Noctor, 2005). Esse sistema de tamponamento redox é essencial para impedir a oxidação e a desnaturação de proteínas, além modular a atividade de enzimas ativadas pela alteração do seu estado redox, como as localizadas no estroma dos cloroplastos (Buchanan e Balmer, 2005). O conteúdo da glutathiona total nas plântulas submetidas aos efeitos isolados e combinados dos estresses foi 35% maior. Esse aumento do conteúdo da glutathiona total ocorreu associado à manutenção da glutathiona reduzida e aumento da glutathiona oxidada nas plântulas expostas ao estresse hídrico ou térmico.

Os estudos demonstram que o aumento da GSSG ocorre associado à redução da GSH, afetando o estado redox GSH/GSSG (Law et al., 1983; Song et al., 2005). Nas plântulas expostas aos estresses hídrico e térmico ocorreu aumento da GSSG, reduzindo o estado redox da glutathiona e indicando consumo de GSH. A análise desse balanço sugere a ocorrência de um equilíbrio dinâmico do sistema glutathiona frente aos estresses hídrico e térmico, onde a síntese da glutathiona total ocorreu para repor o conteúdo da GSH. Dessa forma, o aumento da GSSG pode representar o consumo da GSH sintetizada *de novo*. Essa produção de GSH pode ter contribuído para manutenção da GSH e fornecendo mais antioxidante para proteção oxidativa.

Em conclusão, os resultados demonstram que os efeitos isolados e combinados dos estresses de seca e temperatura elevada afetam diferentemente os mecanismos de aclimatação a estresses no cajueiro relacionados à condutância estomática, ao *status* hídrico e a proteção oxidativa na espécie. Indicam ainda, que o estresse hídrico pode comprometer o papel das enzimas antioxidativas SOD, CAT e APX e dos antioxidantes ASA e GSH durante a exposição a temperaturas elevadas.

Bibliografia

ALSCHER, R.G., ERTURK, N. e HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341. 2002.

BEAUCHAMP, C. e FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 44, p. 276-287. 1971.

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

BUCHANAN, B.B. e BALMER, Y. Redox Regulation: A Broadening Horizon. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 56, p. 187-220. 2005.

CATTIVELLI, L., RIZZA, F., BADECK, F.W., MAZZUCOTELLI, E., MASTRANGELO, A.M., ENRICO FRANCA, E., MARÉ, C., TONDELLI, A. e STANCA, A.M. Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, v. 105, p. 1-14. 2008.

CHEESEMAN, J.M., Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 10, 2435-2444. 2006.

DAT, J., VANDENABEELE, S., VRANOVÁ, E., MONTAGU, M.V., INZÉ, D. e BREUSEGEM, F.V. Dual action of the active oxygen species during plant stress Responses. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.**, v. 57, p. 779-795. 2000.

FIDALGO, F., SANTOS, A., SANTOS, I. e SALEMA, R. Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants. **Ann. Appl. Biol.**, v. 145, p. 185-192. 2004.

FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355-364. 2003

FOYER, C.H. e NOCTOR, G. Tansley Review No. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytol**, v. 146, p. 359-388. 2000.

FOYER, C.H. Free radical processes in plants. **Biochem Soc Trans**, v. 24, p. 427-434. 1996.

GIANNOPOLOTIS, C.N. e RIES, S.K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314. 1977.

GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem**, v. 106, p. 207-211. 1980.

GUO, Y.P., ZHOU, H.F. e ZHANG, L.C. Photosynthetic characteristics and protective mechanisms against photooxidation during high temperature stress in two citrus species. **Scientia Horticulturae**, v. 108, p. 260-267. 2006.

HALLIWELL, B. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. **Chem Phys Lipids**, v. 44, p. 327-340. 1987.

HAVIR, E.A. e MCHALE, N.A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in Tobacco-Leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455. 1987.

HEATH, R.L. e PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n.1, p. 189-198. 1968.

HEYNE, E.G. e BRUNSON, A.M. Genetic studies of heat and drought tolerance in maize. **J. Am. Soc. Agro.**, v. 32, p. 803-814. 1940.

- HOAGLAND, D.R. e ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil.: **Califórnia Agricultural Experiment Station**, Berkeley 32p. (Circular 347). 1950.
- JIANG, Y. e HUANG, B. Drought and heat stress injury to two cool season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. **Crop Sci.**, v. 41, p. 436-442. 2001.
- KAMPFENKEL, K., MONTAGU, M.V. e INZÉ, R. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. **Analytical biochemistry**, v. 225, p. 165-167. 1995.
- KHANNA-CHOPRA, R. e SABARINATH, S. Heat-stable chloroplastic Cu/Zn-SOD in *Chenopodium murale*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 320, p. 1187–1192. 2004.
- KREPS, J.A., WU, Y., CHANG, H.S., ZHU, T., WANG, X. e HARPER, J.F. Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. **Plant Physiology**, v. 130, p. 2129–2141. 2002.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680. 1970.
- LAW, M.Y., CHARLES, S.A. e HALLIWELL, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. **Biochem J.**, v. 210, p. 899–903. 1983.
- MARTINEZ, C.A., LOUREIRO, M.E., OLIVA, M.A. e MAESRRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilubum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Sci**, v. 160, p. 505-515. 2001.
- MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **TRENDS in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15-19. 2006.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v.7, n. 9, p. 405-410. 2002.
- MØLLER, I.M., JENSEN, P.E. e HANSSON, A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 58, p. 459–81. 2007.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant Cell Environ.**, v. 25, p. 239-50. 2002.
- NAKANO, Y. e ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 1068-1072. 1981.
- NOCTOR, G. e FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. **Annu. Rev. Plant Physiol.** *Plant Mol. Biol.*, v. 49, p. 249–79. 1998.
- RIZHSKY, L., LIANG, H. e MITTLER, R. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1143-1151. 2002.
- RIZHSKY, L., LIANG, H., SHUMAN, J., SHULAEV, V., DAVLETOVA, S. e MITTLER, R. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1683-1696. 2004.
- SAVIN, R. e NICOLAS, M.E. Effects of short periods of drought and high temperature on grain growth and starch accumulation of two malting barley cultivars. **J. Plant Physiol.**, v. 23, p. 201-210. 1996.
- SCANDALIOS J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol**, v. 101, p. 1-7. 1993.
- SELOTE, D.S. e KHANNA-CHOPRA, R. Drought acclimation confers oxidative stress tolerance by inducing co-ordinated antioxidant defense at cellular and subcellular level in leaves of wheat seedlings. **Physiologia Plantarum**, v. 127, p. 494–506. 2006

SHANAHAN, J.F., EDWARDS, I.B., QUICK, J.S. e FENWICK, J.R. Membrane thermostability and heat tolerance of spring wheat. **Crop Sci.** 30, 247–251. 1990.

SONG, X.S., HU, W.H., MAO, W.H., OGWENO, J.O., ZHOU, Y.H e YU, J.Q. Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1082–1088. 2005.

THORUP, O.A., STROLE, W.B. e LEAVELL., B.S. A method for the localization of catalase on starch gels. **J Lab Clin Med**, v. 58, p. 122–128. 1961.

WAHID, A., GELANI, S., ASHRAF, M. e FOOLAD, M.R. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 199-223. 2007.

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

XU, S., LI, J., ZHANG, X., WEI, H. e CUI, L. Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turfgrass species under heat stress. **Environ. Exp. Bot.**, v. 56, p. 274–285. 2006.

ZIMMERMAM, P., HEINLEIN, C., ORENDI, G. e ZENTGRA, U. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant, cell and Environ**

6. Síntese e Considerações Finais

Os resultados indicam que a ocorrência de estresse oxidativo no cajueiro pode estar relacionada com um desequilíbrio entre as fases bioquímicas e fotoquímicas da fotossíntese, bem como um aumento da fotorrespiração. No entanto, algumas variáveis apresentaram resultados controversos, dependendo da condição experimental. Por exemplo, os estresses salino e hídrico, quando estudados isoladamente, Capítulos I e II, em condições de casa de vegetação, não induziram dano oxidativo. No entanto, quando foram realizados estudos dos efeitos combinados desses estresses com temperaturas elevadas, sob condições controladas, Capítulos IV e V, foram observados acúmulo de H_2O_2 e TBARS, indicando estresse oxidativo, induzido por salinidade e seca.

Esse desencontro pode estar associado às condições experimentais de cada estudo, atribuídos às condições naturais da casa de vegetação, particularmente ao fator luminosidade. A câmara, onde foram realizados os experimentos sob condições controladas, apresenta intensidade luminosa próxima de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, muito baixa, comparada à intensidade de luz natural da casa de vegetação, que pode atingir $800\text{-}900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O cajueiro é uma espécie nativa e bem adaptada ao semi-árido, portanto, deve possuir diferentes mecanismos bioquímicos e fisiológicos responsáveis por esta adaptação. Dessa forma, a diferença ambiental na qual foram conduzidos os experimentos pode explicar, pelo menos em parte, essa aparente inversão de resultados.

No entanto, sob condições naturais, típicas do ambiente semi-árido, as plântulas de cajueiro apresentaram alta capacidade de proteção oxidativa frente aos estresses salino e hídrico. Essa proteção ocorreu associada à restrição estomática, manutenção do *status* hídrico e eficiente interação dos sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, impedindo o acúmulo de H_2O_2 e a peroxidação de lipídios. Durante o estresse salino as enzimas SOD e CAT e os antioxidantes ASA e GSH foram os principais responsáveis pela proteção oxidativa, enquanto sob condições de seca ocorreu predominância das enzimas SOD e APX, associadas aos sistemas ASA e GSH.

Temperaturas acima de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ induzem estresse oxidativo na espécie, atribuído ao acúmulo de H_2O_2 e a peroxidação de lipídios, provavelmente associada à indução de fotorrespiração. O estresse térmico apresentou intensa modulação dos

sistemas de proteção oxidativa enzimático (SOD-CAT-APX) e não enzimático (ASA e GSH), indicando o papel desses antioxidantes na proteção oxidativa durante temperaturas elevadas. As plântulas submetidas à combinação de salinidade e temperatura elevada apresentaram maior restrição estomática, comparadas àquelas expostas a combinação de seca e temperatura alta. Esse resultado indica que o estresse salino pode levar a maior limitação da dissipação de calor, via fluxo transpiratório, que o estresse hídrico durante a exposição de plantas a temperaturas elevadas.

A salinidade limitou a atividade da APX nas plântulas submetidas ao estresse térmico, sugerindo que o estresse salino pode afetar o papel da APX na proteção oxidativa durante temperaturas elevadas. Durante a exposição das plântulas a temperaturas elevadas o estresse hídrico limitou mais a atividade dos sistemas antioxidantes SOD-CAT-APX e ASA e GSH, comparado ao estresse salino. Essa restrição ocorreu associada ao maior nível de injúrias oxidativas nas plântulas expostas à combinação de seca e calor. Os resultados demonstram que temperaturas elevadas é o principal estresse abiótico que causa dano oxidativo na espécie e que à combinação dos estresses hídrico e temperatura elevada está mais associada a dano oxidativo do que a combinação de salinidade e temperatura alta.

No geral, os resultados demonstram que as alterações do metabolismo oxidativo atribuídas à combinação de seca e calor ou salinidade e calor, são distintas daquelas associadas aos estresses isolados. Indicam ainda, que as mudanças induzidas pela combinação de seca e calor ou salinidade e calor não podem ser estimadas com base nos efeitos isolados dos respectivos estresses.