

# Alterações no perfil de frações nitrogenadas em calos de cana-de-açúcar induzidas por déficit hídrico

Lucila Karla Felix Lima de Brito<sup>(1)</sup>, Joaquim Albenísio Gomes Silveira<sup>(2)</sup>, Luciana Lopes Ferreira de Lima<sup>(3)</sup>, Ana Rafaela de Souza Timóteo<sup>(3)</sup>, Roberta Magalhães Chagas<sup>(2)</sup> e Cristiane Elizabeth Costa de Macedo<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte, Caixa Postal 188, CEP 59062-500 Natal, RN. E-mail: lucilaemparn@rn.gov.br  
<sup>(2)</sup>Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Caixa Postal 6.020, CEP 60451-970 Fortaleza, CE. E-mail: silveira@ufc.br, roberta\_m@secrel.com.br  
<sup>(3)</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Avenida Senador Salgado Filho, s/nº, Lagoa Nova, CEP 59072-970 Natal, RN. E-mail: zenaida\_auriculata@yahoo.com.br, arstimoteo@yahoo.com.br, cristianemacedo@ufrnet.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de marcadores bioquímicos e fisiológicos, na caracterização do estresse hídrico em calos de cultivares de cana-de-açúcar (*Sacharum* sp.), RB 72 454 (sensível) e SP 813250 (resistente), contrastantes quanto à resistência à seca em campo. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 2x5 [cultivar x doses de polietilenoglicol (PEG)], com dez tratamentos e três repetições. Os calos foram submetidos a concentrações de PEG correspondentes aos potenciais osmóticos de 0, -0,3, -0,6, -0,9 e -1,2 MPa, por 120 horas. A variação no conteúdo relativo de água e na umidade não foi significativamente diferente entre as cultivares. Entretanto, foi observada a tendência de aumento no vazamento de eletrólitos, em consequência da diminuição do potencial osmótico na cultivar tolerante. Na cultivar sensível, observou-se tendência de aumento de prolina e, na resistente, diminuição, embora os níveis não tenham sido afetados pelo déficit hídrico. As concentrações de aminoácidos livres foram maiores na sensível. Houve queda nas concentrações de amônia, em ambas cultivares. Os níveis de proteínas não foram afetados pelo PEG. O perfil protéico por SDS-PAGE não mostrou aumento induzido por PEG, na intensidade das bandas correspondentes aos peptídeos entre 14 e 66 kDa. Os marcadores bioquímicos e fisiológicos não foram relacionados ao grau diferencial de resistência observado nas cultivares em condições de campo.

Termos para indexação: *Saccharum* sp., ajustamento osmótico, cultivo de calos, solutos orgânicos.

## Alterations on the profile of nitrogenous fractions in sugarcane calluses induced by water deficit

**Abstract** – The aim of this work was to evaluate the use of physiological and biochemical parameters, in the characterization of water stress in sugarcane (*Sacharum* sp.) calluses, cultivars RB 72454 (sensible) and SP 813250 (resistant), differing in drought resistance in the field. The experimental design was completely randomized with a factorial scheme 2x5 [cultivar x concentrations of polyethylene glycol (PEG)], with ten treatments and three replicates. Calluses were submitted to PEG concentrations corresponding to osmotic potentials of 0, -0.3, -0.6, -0.9 and -1.2 MPa, during 120 hours. The variation of relative water content and humidity showed no significant differences between the cultivars. However, it was observed a trend of increase in electrolyte leakage, in the resistant cultivar related to diminishig of the osmotic potential in resistant cultivar. In the sensible cultivar, it was observed a trend of increase in proline, while the resistant one showed decrease, though proline levels were not affected by the water deficit. The amino acid concentrations were bigger in the sensible cultivar. There was a decrease of ammonia in both cultivars. Protein levels were not affected by the PEG. The protein profile evaluated by SDS-PAGE showed no PEG-induced increase in the intensity of bands corresponding to peptides between 14 and 66 kDa. The physiological and biochemical parameters were not related to differential degree of resistance observed in cultivars under field conditions.

Index terms: *Saccharum* sp., osmotic adjustment, callus culture, compatible solutes.

### Introdução

O déficit hídrico é um estresse abiótico de grande importância, pois inibe o crescimento e a produtividade das culturas (Flexas et al., 2004). As plantas expostas a deficiência hídrica alteram seu metabolismo, por meio da ativação de diferentes mecanismos de resistência, a

fim de se adaptarem a esse tipo de estresse. Uma das estratégias de sobrevivência das plantas, em ambientes secos, é o ajustamento osmótico, via acúmulo ou compartimentalização de solutos (Ashraf & Foolad, 2007). O ajustamento osmótico é uma resposta ao estresse hídrico, que beneficia a condutância estomática, a assimilação de CO<sub>2</sub> e a expansão dos tecidos, além de

permitir a assimilação da água necessária ao metabolismo celular (Serraj & Sinclair, 2002). Esse mecanismo envolve, basicamente, dois processos: absorção de íons pelo sistema radicular, seguido pelo acúmulo dentro dos vacúolos, e síntese de solutos orgânicos que são armazenados no citosol. Entre os solutos, osmoticamente compatíveis e mais conhecidos, destacam-se: a prolina, glicina betaína, proteínas solúveis, açúcares e outros compostos nitrogenados (Koyoro, 2005). Situações de estresse hídrico podem estimular a síntese de diversas proteínas de proteção ao estresse, tais como as do grupo LEA (“late abundant embryogenesis”) e as chaperonas, relativas à manutenção da estrutura de outras proteínas (Zhu, 2001). Todos esses componentes podem também desempenhar a função de proteção dos tecidos vegetais contra danos celulares, como os causados pelo estresse oxidativo.

O papel da prolina na resposta ao estresse hídrico é amplamente questionado. Em plantas superiores, o acúmulo de prolina pode estar relacionado à síntese “de novo” e à diminuição de seu catabolismo. Porém, a baixa utilização de prolina durante o estresse, em consequência da redução na síntese proteica e do aumento na proteólise, também pode contribuir para seu acúmulo (Hare et al., 1998; Silveira et al., 2003). No entanto, Hien et al. (2003) enfatizaram que toda a controvérsia em torno do papel da prolina pode refletir a predominância de sua ação em outros mecanismos de tolerância, que não o ajustamento osmótico. Em relação ao papel das proteínas solúveis, além do ajustamento osmótico em si, Mansour (2000) relaciona o acúmulo de proteínas solúveis, durante o estresse hídrico, à manutenção de um estoque de nitrogênio para ser reutilizado ao término do estresse. Tais proteínas podem ser sintetizadas “de novo” ou ter a expressão aumentada, em resposta ao estresse. Em cultura de tecidos, vários trabalhos têm sido realizados para esclarecer o papel de ambas as classes de solutos compatíveis (Bajji et al., 1998; Lutts et al., 2001; Martinez et al., 2005). Uma vez que muitos dos métodos empregados no melhoramento de espécies de propagação vegetativa utilizam a cultura de tecidos, a caracterização da resposta *in vitro* ao estresse hídrico é uma etapa indispensável em programas de melhoramento de plantas. A partir dessa caracterização, podem-se desenvolver marcadores, bioquímicos ou moleculares, que auxiliarão na identificação de indivíduos superiores. Isso pode permitir o reconhecimento dos mecanismos que atuam na resposta ao estresse hídrico, na condição *in vitro*, e auxiliar na identificação de

indivíduos superiores, obtidos por meio de variação somaclonal, mutagênese induzida ou, ainda, transformação genética (Lutts et al., 2001). A cana-de-açúcar, em decorrência da posição de destaque que ocupa na economia mundial, está constantemente inserida em programas de melhoramento que visam à introdução de características de interesse agrônomico (Cidade et al., 2006). Métodos de transformação genética vêm contribuindo para obtenção de variedades de cana mais resistentes a herbicidas (Falco et al., 2000) e ao vírus do mosaico do tabaco (Ingelbrecht et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de marcadores bioquímicos e fisiológicos na identificação da resposta ao estresse hídrico, em calos embriogênicos de duas cultivares de cana-de-açúcar, contrastantes em relação à resistência ao estresse hídrico em condições de campo.

## Material e Métodos

Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) das cultivares SP 813250 e RB 72 454, entre 6 e 9 meses de cultivo em campo, foram cedidas pela Usina Estivas, no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. A região do ápice meristemático passou por assepsia preliminar, por meio do enxágüe em água e sabão e, em seguida, foi exposta a hipoclorito de sódio a 20% por 20 min. A desinfestação consistiu na exposição ao etanol a 70% durante 1 min, e a hipoclorito de cálcio a 10% durante 10 min. Após enxágüe triplo, em água destilada e esterilizada, foram removidas as folhas externas, tendo-se obtido um cilindro com cerca de 5x2 mm no qual se realizaram cortes transversais, tendo-se obtidos discos com, aproximadamente, 2x2 mm. Esses explantes foram colocados com a região apical em contato com o meio de cultura. Foi utilizado o meio básico, composto por macro e micronutrientes do MS (Murashige & Skoog, 1962), 0,09 mol L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,1 g L<sup>-1</sup> de inositol. O meio foi geleificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. A fim de se estimular a calogênese, o meio de cultura foi suplementado com 3 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. O pH foi ajustado para 5,7, e o meio foi esterilizado em autoclave, durante 20 min. Foram distribuídos 25 mL do meio de cultura em placas de Petri, e inoculados 10 explantes por placa de Petri. Quatro subcultivos foram realizados ao longo de 92 dias: o primeiro aos 30 dias e, os demais, a cada 21 dias. A cultura foi mantida em sala de crescimento, na ausência de luz e à temperatura ambiente (25°C).

Calos com 92 dias foram submetidos ao cultivo, na presença de polietilenoglicol (PEG 6000), para induzir o déficit hídrico. O sistema utilizado consistiu de um calo por frasco. O contato da solução se deu por meio de papel de filtro, suspenso entre o meio líquido e o calo. Utilizou-se um meio de cultura líquido, composto por macro e micronutrientes do MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com diferentes concentrações de PEG 6000. Os calos foram cultivados durante 120 horas em 5 concentrações distintas de PEG: 0, 151, 224, 279 e 326 g L<sup>-1</sup>. Os potenciais osmóticos dos tratamentos corresponderam a: 0, -0,3, -0,6, -0,9 e -1,2 MPa. Os calos foram mantidos sob agitação branda (em torno de 115 rpm), em condições de obscuridade e à temperatura ambiente. Foram expostas amostras de 300 mg de calos de cada tratamento, a 20 mL de água deionizada durante 4 horas. Em seguida, as amostras foram pesadas, a fim de se determinar a massa de matéria túrgida (MT). O material foi, então, armazenado em sacos de papel e levado à estufa a, aproximadamente, 80°C, durante 48 horas. Após esse período, a massa de matéria seca (MS) foi aferida em balança de precisão. O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado, de acordo com a seguinte fórmula:  $CRA = 100[(MF - MS)/(MT - MS)]$ , em que: MF é a massa de matéria fresca inicial (300 mg); MT é a massa de matéria túrgida; MS é a massa de matéria seca. A umidade (U) foi determinada segundo a fórmula:  $U = 100[(MF - MS)/MF]$ , em que: MF é a massa de matéria fresca inicial (300 mg); MS é a massa de matéria seca.

Para averiguar a ocorrência de danos de membrana (vazamento de eletrólitos), amostras de 300 mg de calos, de cada tratamento, foram expostas a 20 mL de água deionizada durante 4 horas. Decorrido o tempo estabelecido, a solução que estava em contato com os calos foi transferida para outro tubo de ensaio, a condutividade elétrica da solução foi determinada em condutivímetro e o resultado foi expresso em dS m<sup>-1</sup>.

A peroxidação de lipídios foi mensurada, a partir da quantidade de malonaldeído (MDA) formada a partir do extrato de calos, por meio de reação específica deste com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Conforme (Heath & Packer, 1968); os resultados foram expressos em nmol g<sup>-1</sup> MS.

Para as determinações das concentrações de solutos nitrogenados, 700 mg de calos, de cada tratamento, foram expostos à secagem a vácuo, em liofilizador, durante 48 horas. Foram macerados 20 mg da matéria seca resultante, que foi dissolvida em 2 mL de etanol a 80% e, em seguida, levada ao banho-maria a 90°C durante

30 min, e centrifugada durante 15 min. O sobrenadante foi utilizado para as determinações de aminoácidos livre totais (AALT) (Peoples et al., 1989), prolina (PRO) (Bates et al., 1973) e amônio livre (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Weatherburn, 1967). O precipitado foi dissolvido em 1 mL de Tris-HCl 25 mM pH 7,6 e centrifugado a 15.000 g durante 30 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de proteínas solúveis totais (Bradford, 1976).

Para a análise do perfil protéico por SDS-PAGE, 30 mg de matéria seca foi macerada em presença de SDS a 2% e β-2-mercaptoetanol a 5%, e dissolvida em 1 mL de Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8 e glicerol a 10%. O extrato resultante foi utilizado para a determinação do perfil protéico, por meio de eletroforese em SDS-PAGE, com o método de Laemmli (1970), adaptado para o uso de géis de separação em placas.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 2x5 (cultivar x doses de PEG), com dez tratamentos. Cada tratamento constou de três repetições. Realizou-se a análise da variância com o programa STATISTICA 7.0 (Statsoft, 2004), e as médias foram comparadas por meio do teste Tukey, a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

De acordo com a análise de variância, apenas no marcador CRA não houve diferenças significativas entre as cultivares em estudo. As concentrações empregadas afetaram significativamente todos os marcadores avaliados, exceto o CRA e a peroxidação de lipídios. Entretanto, foram observadas interações significativas entre as cultivares em estudo e concentrações de PEG, avaliadas apenas nos marcadores vazamento de eletrólitos e prolina (Tabela 1).

De acordo com o teste de Tukey, com exceção dos marcadores vazamento de eletrólitos e amônia livre, a cultivar RB 72 454 apresentou maiores médias, em todos os marcadores avaliados. Em ambas as cultivares, houve tendência à redução nas concentrações dos marcadores em consequência da diminuição do potencial osmótico, à exceção do marcador vazamento de eletrólitos, que apresentou médias maiores e iguais entre si, nos potenciais de -0,3, -0,6, -0,9, -1,2 MPa, e do marcador prolina, que na cultivar RB 72 454 tendeu a aumentar em razão do potencial osmótico. No marcador vazamento de eletrólitos, o teste de Tukey indicou que, de modo geral, as concentrações correspondentes a -0,6, -0,9, -1,2 MPa

apresentaram as maiores médias na cultivar SP 81 3250. No marcador prolina, as maiores médias foram observadas na cultivar RB 72 454, nos potenciais de -0,6 e -0,9 MPa (Figuras 1 e 2).

Embora tenha havido diferenças nas tendências e nos níveis endógenos entre as duas cultivares – especialmente em termos de vazamento de eletrólitos e de peroxidação de lipídios –, as concentrações de PEG não causaram danos intensos nos marcadores de estresse nos calos das duas cultivares. Ao se analisarem os resultados obtidos nos marcadores avaliados, em função das concentrações de PEG, observou-se que os

**Tabela 1.** Análise de variância dos marcadores: vazamento de eletrólitos (VE), conteúdo relativo de água (CRA), umidade, peroxidação de lipídeos (PL), proteínas livres totais (PLT), aminoácidos livres totais (AALT), prolina e amônia livre, em calos das cultivares SP 81 3250 e RB 72 454 de cana-de-açúcar, submetidos a diferentes concentrações de PEG 6000, por 120 horas (0, 151,402, 223,664, 279,297 e 326,261 g L<sup>-1</sup>, correspondentes aos potenciais osmóticos do controle, -0,3, -0,6, -0,9 e -1,2 MPa, respectivamente).

Marcador	Fonte de variação	GL	Quadrado médio	p
VE	Cultivar (Clt)	1	45,552	0,00
	Concentração de PEG (CP)	4	3,628	0,05
	Clt x CP	4	4,088	0,03
	Resíduo	20	1,241	-
CRA	Cultivar (Clt)	1	97,7	0,43
	Concentração de PEG (CP)	4	87,2	0,68
	Clt x CP	4	217,7	0,26
	Resíduo	20	151,1	-
PL	Cultivar (Clt)	1	862,98	0,00
	Concentração de PEG (CP)	4	6,30	0,55
	Clt x CP	4	14,01	0,18
	Resíduo	20	8,01	-
Umidade	Cultivar (Clt)	1	1,1	0,60
	Concentração de PEG (CP)	4	23,0	0,00
	Clt x CP	4	2,9	0,34
	Resíduo	20	2,4	-
PLT	Cultivar (Clt)	1	22,264	0,00
	Concentração de PEG (CP)	4	4,039	0,03
	Clt x CP	4	0,720	0,66
	Resíduo	20	1,177	-
AALT	Cultivar (Clt)	1	436,601	0,00
	Concentração de PEG (CP)	4	134,021	0,00
	Clt x CP	4	11,376	0,45
	Resíduo	20	11,939	-
Prolina	Cultivar (Clt)	1	31,4983	0,00
	Concentração de PEG (CP)	4	1,8324	0,02
	Clt x CP	4	2,2567	0,01
	Resíduo	20	0,4886	-
Amônia livre	Cultivar (Clt)	1	959,7	0,03
	Concentração de PEG (CP)	4	6.521,0	0,00
	Clt x CP	4	331,0	0,16
	Resíduo	20	180,7	-

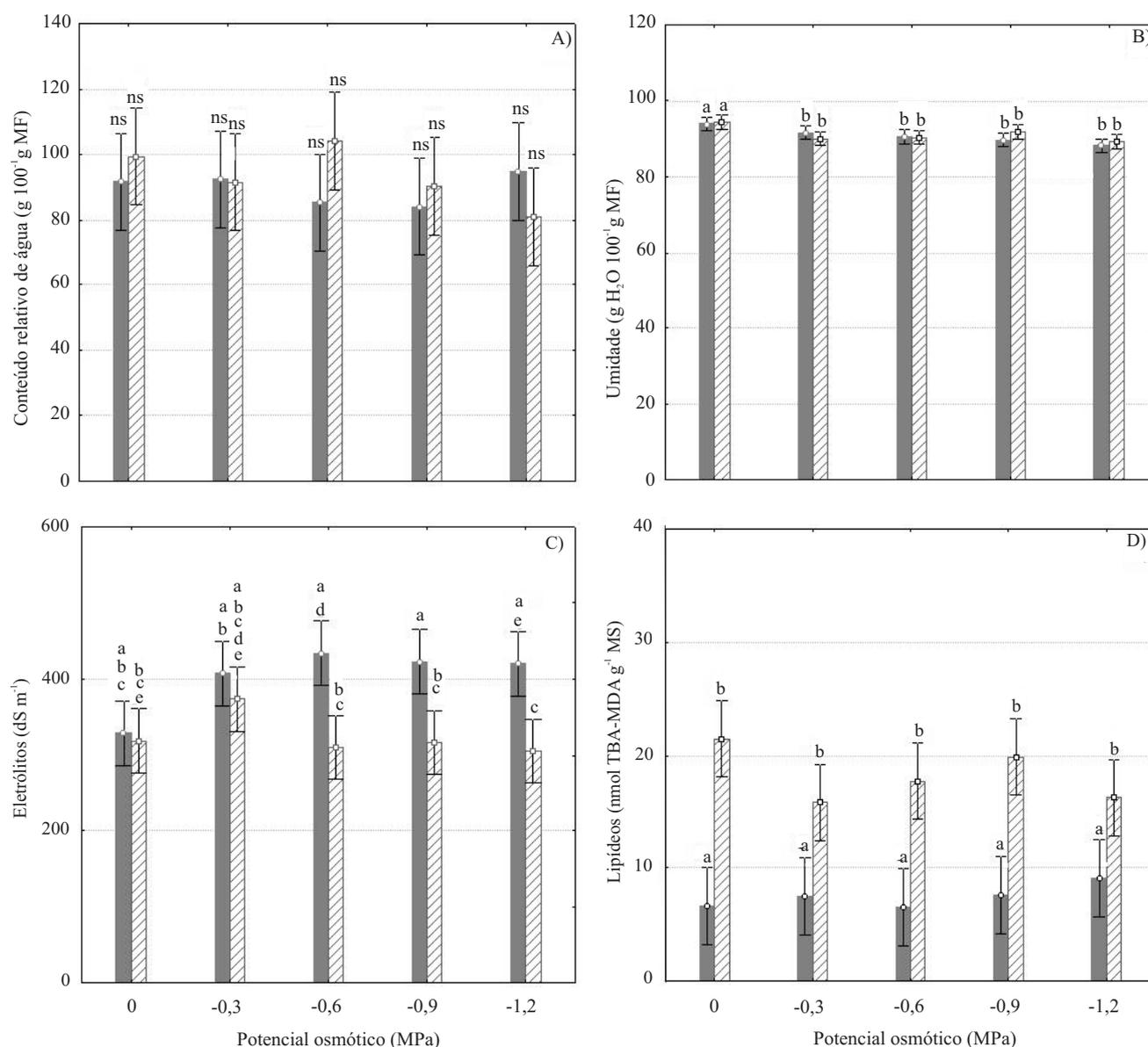
níveis de CRA, umidade, vazamento de eletrólitos e peroxidação de lipídios não sofreram alterações drásticas, mesmo nas doses mais elevadas do agente osmótico (Figura 1). A cultivar SP 813250 apresentou ligeiro aumento no vazamento de eletrólitos, enquanto a RB 72 454 mostrou valores praticamente inalterados, em consequência das doses de PEG (Figura 1 C). Essa última cultivar apresentou valores mais elevados de peroxidação de lipídios do que a SP 813250, a despeito do aumento da deficiência hídrica não ter causado aumento no nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, em ambas as cultivares. Esse indicador, juntamente com o vazamento de eletrólitos, é freqüentemente utilizado para se estimar a estabilidade das membranas.

Os calos de ambas as cultivares se mostraram resistentes às concentrações de PEG utilizadas, uma vez que não foi evidenciada restrição no estado hídrico, nem danos nas membranas celulares. Errabii et al. (2006), ao trabalhar com calos de duas cultivares de cana-de-açúcar, observaram redução do conteúdo de água, em função do aumento da concentração de manitol no meio de cultura. No presente estudo, não foi possível caracterizar maior resistência nos calos da cultivar SP 813250, quando comparados aos da RB 72 454, por meio dos marcadores fisiológicos utilizados. Essa diferença é observada em campo, em cultivos localizados na região do Agreste Potiguar, e tem reduzido a produtividade da RB 72 454. Essa observação indica que a resposta exibida por células isoladas ou por calos pode ser diferente daquela apresentada pela planta inteira. Alguns trabalhos têm demonstrado que uma resposta observada *in vitro* pode ter ou não relação com uma resposta da planta inteira (Bajji et al., 1998; Martinez et al., 2005). Essa diferença pode ser explicada pelo fato de a resistência ao estresse hídrico ser um caráter quantitativo, que envolve a expressão de diversos genes (Knight & Knight, 2001) e a ação de complexos mecanismos bioquímicos e fisiológicos, coordenados nos níveis de célula, tecido, órgão, planta inteira (Zhu, 2001).

Os tratamentos dos calos das duas cultivares com PEG alteraram o perfil das frações nitrogenadas: prolina, aminoácidos livres, amônia e proteínas solúveis (Figura 2). Entretanto, as duas cultivares apresentaram maiores contrastes no indicador prolina (Figura 2 C). A cultivar SP 813250 apresentou tendência de ligeira diminuição, enquanto a RB 72 454 apresentou forte elevação nos níveis de prolina, entre os potenciais mais elevados. As concentrações de aminoácidos livres decresceram de maneira gradual, enquanto as de amônia

diminuíram abruptamente (cerca de 10 vezes na cultivar SP 813250), em consequência das doses de PEG (Figura 2 B e D). As concentrações de proteínas solúveis decresceram discretamente, mas de forma mais acentuada na cultivar SP 813250. Hien et al. (2003), ao trabalhar com três cultivares de arroz, que diferem entre si quanto à resistência à seca e ao sal, observaram maior acúmulo de prolina nas radículas das cultivares tolerantes, expostas in vitro ao manitol e NaCl.

O estresse hídrico afeta intensamente o metabolismo do nitrogênio nas plantas, o que acarreta diminuição na síntese de proteínas e acumulação de aminoácidos, amônia e poliaminas livres (Rabe, 1993). No presente estudo, a deficiência hídrica ocasionou alterações no metabolismo do nitrogênio nos calos das cultivares. Existe grande controvérsia na literatura sobre se o aumento na concentração de prolina, induzido por estresse hídrico, está associado ao ajustamento osmótico e à proteção

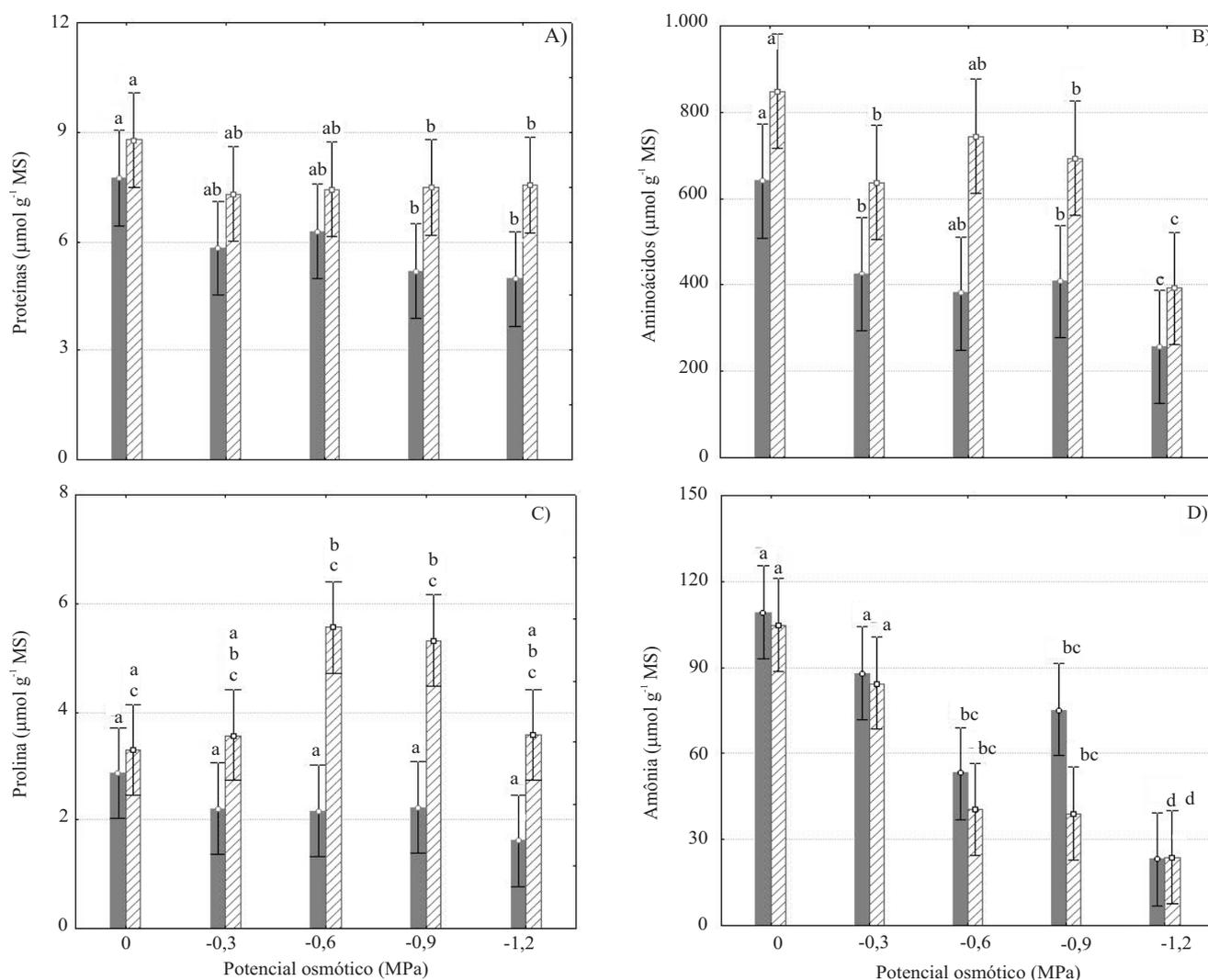


**Figura 1.** Conteúdo relativo de água (A), umidade (B), vazamento de eletrólitos (C) e peroxidação de lipídios (D), em calos de cana-de-açúcar das cultivares SP 81 3250 (■) e RB 72 454 (▨), submetidos a diferentes concentrações de PEG 6000, por 120 horas (0, 151,402, 223,664, 279,297 e 326,261 g L<sup>-1</sup>, correspondentes aos potenciais osmóticos do controle, -0,3, -0,6, -0,9 e -1,2 MPa, respectivamente). Letras distintas, acima das barras, indicam médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ); ns: diferenças não-significativas pela análise de variância ( $p > 0,05$ ).

celular ou se é meramente um sintoma de injúria (Silveira et al., 2003). De acordo com Errabi et al. (2006), o aumento induzido por estresse hídrico é fracamente envolvido com ajustamento osmótico na célula.

Desse modo, é possível que o aumento observado na cultivar RB 72 454 esteja relacionado à diminuição na síntese protéica e nas concentrações de aminoácidos livres totais e amônia (Figura 2 A, B e D). Lutts et al. (2004) observaram aumento da concentração de prolina em calos de trigo, tratados com NaCl, manitol ou PEG 6000. Porém, não atribuíram papel de destaque do aminoácido no ajustamento osmótico. Gangopadhyay

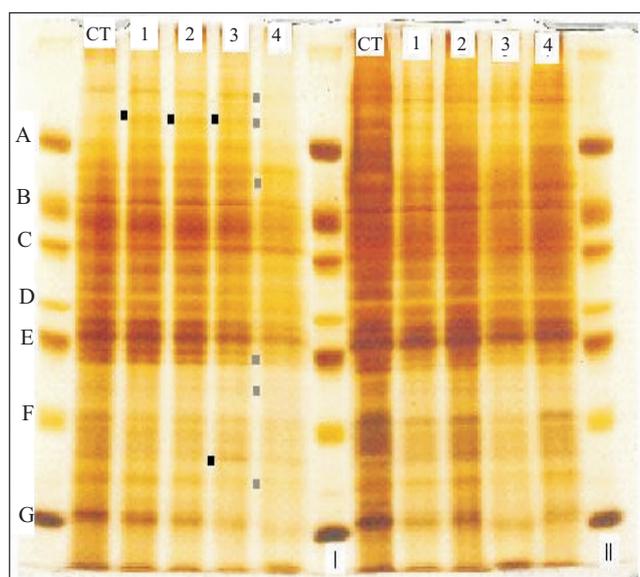
et al. (1997), ao avaliar a resposta de calos de tabaco, que diferiam quanto à adaptação ao cultivo *in vitro* na presença de NaCl e manitol, observaram que os calos adaptados apresentaram maior acúmulo de prolina, quando expostos ao NaCl e manitol. Assim, o ajustamento osmótico parece ser um caráter espécie/variedade-dependente. Além disso, a natureza físico-química do agente estressor, bem como o tempo de exposição e concentração, pode influenciar no acúmulo de prolina. A drástica redução nas concentrações de amônia livre, em ambas as cultivares, não parece estar relacionada às mudanças nos níveis de proteínas e aminoácidos



**Figura 2.** Quantidade de proteínas solúveis totais (A), concentração de aminoácidos livres totais (B), concentração de prolina (C) e concentração de amônia (D), em calos de cana-de-açúcar das cultivares SP 81 3250 (■) e RB 72 454 (▨), submetidos a diferentes concentrações de PEG 6000, por 120 horas (0, 151,402, 223,664, 279,297 e 326,261  $\text{g L}^{-1}$ , correspondentes aos potenciais osmóticos do controle -0,3, -0,6, -0,9 e -1,2 MPa, respectivamente). Letras distintas, acima das barras, indicam médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

livres. O meio de cultura empregado (MS) apresenta concentrações elevadas de nitrato e amônio, e isso pode ter acentuado o efeito do PEG nos níveis endógenos de amônia nos tecidos. A redução na quantidade de proteínas solúveis observada pode estar relacionada à ocorrência de degradação e queda na síntese protéica, em consequência da indução de déficit hídrico nas células (Yordanov et al., 2000). Assim, as concentrações de PEG 6000 empregadas podem ter interferido na síntese protéica, das células dos calos. Além disso, esses resultados levam a crer que as cultivares não apresentam nenhum mecanismo de síntese protéica induzida por estresse, pela acumulação de proteínas de proteção contra o estresse.

A alteração no padrão eletroforético (SDS-PAGE) corrobora os resultados obtidos na quantificação de proteínas solúveis totais (Figura 3). De modo geral, houve diminuição na intensidade das bandas protéicas, em consequência das doses de PEG, nas duas cultivares.



**Figura 3.** Perfil eletroforético de proteínas totais, em SDS-PAGE de calos das cultivares RB 72 454 (I) e SP 81 3250 (II), submetidos a diferentes concentrações de PEG 6000, por 120 horas. Os pontos escuros indicam as bandas intensificadas, e os claros, as que diminuiriam em consequência da adição de PEG 6000 ao meio de cultura. A, albumina bovina (66 kDa); B, albumina de ovo (45 kDa); C, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36 kDa); D, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (29 kDa); E, tripsinogênio de pâncreas bovino (24 kDa); F, inibidor da tripsina de soja (20 kDa); G, lactalbumina bovina (14,2 kDa). CT, 0; 1, 151,402; 2, 223,664; 3, 279,297; 4, 326,261 g L<sup>-1</sup> PEG 6000.

Barathi et al. (2001) observaram o acúmulo de polipeptídeos, com massa molecular de 78 e 92 kDa, em folhas de amora sob déficit hídrico. O sistema SDS-PAGE apresenta limitações para a detecção de proteínas induzidas por estresse, por analisar um número restrito de peptídeos.

Os resultados obtidos no presente estudo não evidenciaram a resistência diferenciada, observada em campo, nas cultivares em estudo.

## Conclusão

Os marcadores bioquímicos e fisiológicos, empregados para avaliar a resposta ao estresse hídrico de calos embriogênicos de duas cultivares de cana-de-açúcar, são insuficientes para se demonstrar a resistência diferenciada, observada em condições de campo.

## Referências

- ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v.59, p.206-216, 2007.
- BAJJI, M.; KINET, J.M.; LUTTS, S. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. **Plant Science**, v.137, p.131-142, 1998.
- BARATHI, P.; SUNDAR, D.; REDDY, R.A. Changes in mulberry leaf metabolism in response to water stress. **Biologia Plantarum**, v.44, p.83-87, 2001.
- BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v.39, p.205-207, 1973.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CIDADE, D.A.P.; GARCIA, R.O.; DUARTE, A.C.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.385-391, 2006.
- GANGOPADHYAY, G.; BAJU, S.; MUKHERJEE, B.B.; GUPTA, S. Effects of salt and osmotic shocks on unadapted and adapted callus lines of tobacco. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p.45-52, 1997.
- ERRABII, T.; GANDONOU, C.B.; ESSALMANI, H.; ABRINI, J.; IDAOMAR, M.; SKALI-SENHAJI, N. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p.1488-1493, 2006.
- FALCO, M.C.; TULMANN NETO, A.; ULIAN, E.C. Transformation and expression of a gene for herbicide-resistance in Brazilian sugarcane. **Plant Cell Reports**, v.19, p.1188-1194, 2000.

- FLEXAS, J.; BOTA, J.; LORETO, F.; CORNIC, G.; SHARKEY, T.D. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in  $C_3$  plants. **Plant Biology**, v.6, p.269-279, 2004.
- HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell and Environment**, v.21, p.535-553, 1998.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, v.125, p.189-198, 1968.
- HIEN, D.T.; JACOBS, M.; ANGENON, G.; HERMANS, C.; THU, T.T.; VAN SON, L.E.; ROOSENS, N.H. Proline accumulation and  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. **Plant Science**, v.165, p.1059-1068, 2003.
- INGELBRECHT, I.L.; IRVINE, J.E.; MIRKOV, T.E. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology**, v.119, p.1187-1198, 1999.
- KNIGHT, H.; KNIGHT, M.R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. **Trends in Plant Science**, v.6, p.262-267, 2001.
- KOYORO, H.W. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). **Environmental and Experimental Botany**, v.56, p.136-146, 2005.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LUTTS, S.; ALMANSOURI, M.; KINET, J.M. Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. **Plant Science**, v.167, p.9-18, 2004.
- LUTTS, S.; KINET, J.M.; BOUHARMONT, J. Somaclonal variation in rice after two successive cycles of mature embryo derived callus culture in the presence of NaCl. **Biologia Plantarum**, v.44, p.489-495, 2001.
- MANSOUR, M.M.F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v.43, p.491-500, 2000.
- MARTINEZ, J.P.; KINET, J.M.; BAJJI, M.; LUTTS, S. NaCl alleviates polyethylene glycol induced water stress in the halophyte species *Atriplex haostimus* L. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.2421-2431, 2005.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- PEOPLES, M.B.; FAIZAH, A.W.; REAKASEM, B.; HERRIDGE, D.F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra: Australian Center of Agricultural Research, 1989. 79p. (ACIAR. Monograph, 11).
- RABE, E. Altered nitrogen metabolism under environmental stress conditions. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop stress**. New York: CRC, 1993. p.349-364.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.333-341, 2002.
- SILVEIRA, J.A.G.; VIÉGAS, R.A.; ROCHA, I.M.A.; MOREIRA, A.C.O.M.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.115-123, 2003.
- STATSOFT. **Statistica**: data analysis software system. Tulsa: Statsoft, 2004. (Version 7).
- WEATHERBURN, M.W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v.39, p.971-974, 1967.
- YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought, acclimatation, and stress tolerance. **Photosynthetica**, v.38, p.171-186, 2000.
- ZHU, J.K. Cell signaling under salt, water and cold stresses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.401-406, 2001.

---

Recebido em 5 de dezembro de 2007 e aprovado em 19 de maio de 2008