

Maria Filipa Monteiro Alves de Queirós

**Seleccção *in vitro*
de linhas celulares de batateira
(*Solanum tuberosum* L.) tolerantes a NaCl**

**Estudo de parâmetros bioquímicos
associados à tolerância à salinidade**

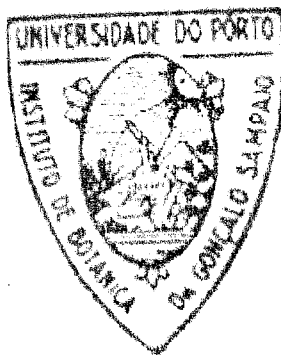
Departamento de Botânica — Faculdade de Ciências

**Universidade do Porto
Porto, 2001**

Maria Filipa Monteiro Alves de Queirós

**Seleccção *in vitro* de linhas celulares de batateira
(*Solanum tuberosum* L.) tolerantes a NaCl**

Estudo de parâmetros bioquímicos associados à tolerância à salinidade



Departamento de Botânica — Faculdade de Ciências

Universidade do Porto

Porto, 2001

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto para
obtenção do grau de Mestre em Biologia do
Desenvolvimento e Reprodução Vegetal.*

Orientador — Professora Doutora Fernanda Fidalgo,
Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

Para a elaboração desta dissertação, foram utilizados dados apresentados nas seguintes comunicações:

Teixeira, J.; F. Queirós; F. Fidalgo; S. Pereira & R. Salema, 2001. Effect of salinity on glutamine synthetase (GS) polypeptide accumulation and on proline and protein levels in potato callus tissue. *6TH International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation*. Reims Champagne – França.

Queirós, F.; F. Fidalgo; I. Santos & R. Salema, 2001. Biochemical aspects of a NaCl-tolerant potato cell line selected *in vitro*. *VII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal – XIV Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal*. Badajoz – Espanha.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi o corolário de um conjunto de esforços, não só pessoais, mas também de diversas pessoas que no meu caminho de cruzaram, e que de uma forma amiga e aberta me deram o seu precioso e desinteressado contributo ajudando à sua realização.

A todos pretendo expressar o meu agradecimento, no entanto, gostaria de dirigir as primeiras palavras ao Senhor Professor Roberto Salema e à Senhora Professora Isabel Santos; como responsáveis pelo curso de Mestrado a que me propôs, saliento a eficácia e a constante disponibilidade manifestadas ao longo do curso, bem como as condições de trabalho que me proporcionaram para a realização da componente experimental. À Professora Isabel Santos quero manifestar, ainda, o meu profundo reconhecimento pelos valiosos ensinamentos que me transmitiu, para além das suas palavras de encorajamento que, em alguns momentos, tão importantes foram.

Desejo igualmente expressar a mais profunda gratidão à Professora Dra. Fernanda Fidalgo, não apenas por ter aceite a responsabilidade de me orientar no trabalho exposto na presente dissertação, mas também pelo empenho e incentivo demonstrados ao longo da realização deste trabalho, qualidades que considero terem sido fundamentais para a sua concretização. Gostaria ainda de agradecer a pronta disponibilidade e paciência reveladas durante a execução do trabalho laboratorial, bem como as críticas e sugestões sempre oportunas, nomeadamente durante a revisão do manuscrito.

Ao Dr. José Manuel de Almeida e à Professora Dra. Arlete Santos quero aqui deixar uma palavra de agradecimento, pelas sugestões e disponibilidade demonstradas sempre que foram solicitados. Não posso deixar de manifestar a minha gratidão ao Dr. Jorge Teixeira, pela sua ajuda e amizade presentes ao longo da minha passagem pela Unidade de Stress em Plantas, no Instituto de Biologia Celular e Molecular. A todos os que trabalham na Unidade de Stress em Plantas, gostaria de agradecer em particular à Sra. D. Andréa Costa pela disponibilidade e paciência prestadas na realização das fotografias e, à Sra. D. Isabel Guimarães, pelos ensinamentos tão necessários à utilização das culturas *in vitro*; a ambas quero também exprimir o meu reconhecimento pela amizade que me têm demonstrado.

Aos Professores e Colegas do curso de Mestrado quero aqui expressar o meu apreço por todos eles e ressaltar o companheirismo vivido ao longo desta etapa de aprendizagem, que foi importante para a realização deste trabalho.

Finalmente, gostaria de expressar o meu reconhecimento à minha família, pelo estímulo e confiança que sempre me proporcionaram. Ao Rui, quero dirigir um agradecimento muito especial, pelo apoio permanente, sacrifício e incentivo nos momentos mais difíceis e, também pela paciência que sempre demonstrou para comigo.

A todos o meu eterno reconhecimento.

RESUMO

A salinidade constitui um dos problema mais graves para a agricultura nalgumas partes do mundo, pois afecta consideravelmente a produtividade das culturas, especialmente as mais sensíveis ao sal. O efeito negativo que a salinidade tem sobre o crescimento e produção das culturas deve-se, pelo menos, à combinação de três factores, que incluem o défice hídrico resultante do efeito osmótico desenvolvido pela presença de NaCl no meio, a toxicidade provocada pela absorção e acumulação excessiva dos iões Na^+ e Cl^- e o desequilíbrio nutricional resultante da predominância de certos nutrientes minerais e da menor absorção de outros, que poderão ocasionar deficiências nutricionais. Todavia, estes factores são acompanhados pela acumulação na célula de espécies activas de oxigénio, resultando na ocorrência de stress oxidativo, o que faz com que este fenómeno seja considerado um efeito secundário da salinidade.

A batateira é uma cultura de elevado interesse económico, que ocupa um grande área de produção nas regiões agrícolas do litoral, onde se começam a registar quebras na produção provocadas pelo excesso de sais acumulados no solo. A batateira é considerada ser uma cultura moderadamente tolerante à salinidade e a utilização das culturas *in vitro* tem sido referida como a estratégia a seguir para a obtenção de plantas mais resistentes ao sal, através da selecção de linhas celulares tolerantes ao sal e posterior regeneração de plantas a partir destas. A selecção *in vitro* de linhas celulares adaptadas a NaCl tem vindo a desempenhar um papel determinante no estudo de mecanismos de tolerância à salinidade, dado que a utilização dessas linhas como modelo experimental permite determinar as alterações que ocorrem ao nível celular e que contribuem para a tolerância salina, independentemente dos ajustes ao nível dos tecidos/órgãos que podem ocorrer na planta intacta. Nesta perspectiva, o estudo efectuado durante este trabalho teve por objectivo, numa primeira fase, seleccionar linhas tolerantes a diferentes concentrações de NaCl utilizando para o efeito uma cultura estabelecida de tecido caloso de batateira cv. Désirée. O tecido caloso foi induzido a partir de explantes foliares, de broto e de tubérculo cultivados em dois meios de indução, tendo-se verificado que a indução e proliferação de tecido caloso foi melhor conseguida no meio nutritivo contendo picloram como regulador de crescimento. As linhas celulares tolerantes a NaCl foram seleccionadas através da exposição directa (selecção directa) ou gradual (selecção gradual) de fragmentos de tecido caloso a concentrações crescentes de NaCl (0, 50, 100, 150 e 200mM de NaCl), de modo a que, no final o tecido caloso das linhas celulares seleccionadas estava a crescer em meio contendo NaCl nas concentrações 50, 100, 150 e 200mM.

Numa segunda fase, a resposta do tecido caloso das linhas tolerantes a 50mM e a 100mM de NaCl foi avaliada através da quantificação de crescimento e do conteúdo hídrico do tecido caloso, bem como através da determinação de alguns parâmetros bioquímicos, sendo depois comparada com a resposta do tecido crescido na ausência de NaCl (controlo). Verificou-se que o crescimento do tecido caloso crescido na presença de NaCl foi diminuído quando comparado com o do tecido controlo, sendo a diminuição mais acentuada na linha celular tolerante a 100mM. A concentração salina mais elevada também teve efeito negativo na quantidade de água acumulada no tecido caloso, levando o teor de água a baixar significativamente em relação ao valor que foi observado no tecido controlo, enquanto que na situação salina moderada tal facto não se verificou.

A salinidade provocou a formação de espécies activas de oxigénio e, consequentemente, danos estruturais nas membranas celulares, que se manifestaram pela acumulação significativa de malondialdeído, um produto resultante da peroxidação lipídica, no tecido caloso mantido em condições salinas; no entanto, os níveis de malondialdeído no tecido exposto a 100mM de NaCl foram significativamente superiores aos do tecido que estava a 50mM, o que indica que a peroxidação lipídica foi maior na linha celular tolerante a 100mM do que na tolerante a 50mM de NaCl. O conteúdo clorofilino foi também diminuído pela manutenção do tecido caloso em condições salinas, embora esse teor não se tenha alterado entre as linhas celulares tolerantes a 50mM e a 100mM de NaCl. Já a quantidade de carotenóides foi afectada negativamente apenas no nível de NaCl moderado, dado que o teor quantificado na maior concentração salina usada não diferiu do valor que foi registado na situação controlo.

A exposição do tecido caloso a NaCl elevou os níveis de ácido ascórbico e de prolina, verificando-se que o aumento desses compostos foi mais acentuado na linha tolerante a 100mM. A síntese de alguns polipeptídeos foi também estimulada pela presença do NaCl, bem como o aparecimento *de novo* de determinados polipeptídeos, o que se traduziu no aumento da quantidade de proteínas solúveis e insolúveis; de referir, que todas estas alterações surgiram com maior intensidade no padrão electroforético do tecido caloso sujeito a 100mM do que no correspondente ao tecido mantido a 50mM de NaCl.

Os resultados obtidos mostraram que, perante o aumento da peroxidação lipídica e o decréscimo do teor de pigmentos verificados ocorrer nas linhas celulares tolerantes a 50mM e 100mM de NaCl, os níveis de ácido ascórbico e de prolina aumentaram significativamente com o aumento da concentração de NaCl no meio, o que nos leva a concluir que esses compostos com acção antioxidante estiveram provavelmente envolvidos na aquisição da

tolerância à salinidade por parte das linhas celulares utilizadas neste estudo. Contudo, considerámos ser necessário na continuação deste trabalho aprofundar o estudo do sistema de defesa antioxidante, nomeadamente obter conhecimento sobre o comportamento das enzimas antioxidantes, para avaliar a relação entre as alterações na actividade destas enzimas e a tolerância a NaCl. Será também importante averiguar se as proteínas que surgiram aumentadas e *de novo* nas linhas celulares tolerantes a NaCl estão envolvidas no processo de adaptação ao NaCl, no sentido de aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos que estão envolvidos na tolerância à salinidade no tecido caloso de batateira.

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ABA	Ácido abscísico
APS	Persulfato de amónio
APX	Peroxidase do ascorbato
BA	Benzilaminopurina
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
EAOs	Espécies activas de oxigénio
GA	Ácido giberélico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
IAA	Ácido 3-indolacético
KIN	Cinetina
MDA	Malondialdeído
NAA	Ácido naftaleno-acético
NaCl	Cloreto de sódio
NADP ⁺	Nicotiamina adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotiamina adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)
¹ O ₂	Singleto de oxigénio
O ₂ ⁻	Superóxido
·OH	Radical hidroxilo
PEG	Polietilenoglicol
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
PVP	Polivinilpirrolidona
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletlenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
ZEA	Zeatina

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Importância da cultura de batateira em Portugal	1
1.2 – Culturas <i>in vitro</i> de <i>Solanum tuberosum</i> L.	3
1.3 – A salinidade como factor de stresse	13
1.3.1 – A salinidade do solo	13
1.3.2 – Efeitos da salinidade nas plantas	15
1.3.3 – A salinidade como factor de stresse oxidativo	20
1.3.4 – Mecanismos de tolerância à salinidade nas plantas	28
1.3.5 – Tolerância da batateira à salinidade	40
1.3.6 – Os sistemas <i>in vitro</i> como modelo para os estudos de salinidade	42
1.4 – Objectivos	46
2 – MATERIAL e MÉTODOS	48
2.1 – Indução e estabelecimento da cultura de tecido caloso de <i>Solanum tuberosum</i> L...	48
2.1.1 – Material vegetal	48
2.1.2 – Preparação e cultura do material vegetal	48
2.2 – Selecção <i>in vitro</i> de linhas celulares de <i>Solanum tuberosum</i> L. tolerantes a NaCl ..	51
2.2.1 – Material vegetal	51
2.2.2 – Preparação dos meios de cultura suplementados com NaCl	51
2.2.3 – Selecção de tecido caloso tolerante a NaCl	51
2.3 – Estudos em tecido caloso de <i>Solanum tuberosum</i> L. tolerante a diferentes níveis de salinidade	52
2.3.1 – Crescimento de tecido caloso	52
2.3.2 – Conteúdo hídrico no tecido caloso	53

2.3.3 – Determinações bioquímicas	53
Clorofilas e Carotenóides	53
Peroxidação lipídica	54
Prolina	54
Ácido ascórbico	55
Proteínas	55
Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	57
2.4 – Análise estatística	58
3 – RESULTADOS e DISCUSSÃO	59
3.1 – Indução e estabelecimento da cultura de tecido caloso de <i>Solanum tuberosum</i> L....	59
3.2 – Selecção <i>in vitro</i> de linhas celulares de <i>Solanum tuberosum</i> L. tolerantes a NaCl ..	75
3.3 – Estudos em tecido caloso de <i>Solanum tuberosum</i> L. tolerante a diferentes níveis de salinidade	89
3.3.1 – Crescimento de tecido caloso	89
3.3.2 – Conteúdo hídrico no tecido caloso	90
3.3.3 – Determinações bioquímicas	94
Clorofilas	95
Carotenóides	96
Peroxidação lipídica	98
Prolina	100
Ácido ascórbico	101
Proteínas	102
4 – CONCLUSÕES	119
5 – BIBLIOGRAFIA	122

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Importância da cultura de batateira em Portugal

A planta *Solanum tuberosum* L. é uma das cerca de duzentas espécies do género *Solanum* que se destaca, entre as sete espécies cultivadas, por ser aquela que domina a produção em todo o mundo (Simmonds, 1995; Mackay, 1996). A batateira pertence à família Solanaceae, que inclui outras espécies que também se revestem de particular interesse económico tais como o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.), o pimenteiro (*Capsicum* L.) e a planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Ducieux *et al.*, 1986). Algumas espécies do género *Nicotiana* têm sido frequentemente utilizadas como modelo em estudos nas diversas áreas da biologia vegetal, devido à facilidade com que podem ser manipuladas (Binzel *et al.*, 1985, 1988; Savouré *et al.*, 1999); no entanto, a batateira tem assumido especial destaque como modelo para diversos estudos moleculares e fisiológicos, por um lado, pelo facto de se adequar às culturas *in vitro* e técnicas moleculares, bem como pelos interessantes aspectos fisiológicos que estão envolvidos no seu ciclo de vida (Mackay, 1996; Struik *et al.*, 1997), por outro lado, pelo importante papel que esta planta desempenha na alimentação humana e, consequentemente, na economia agrícola.

A batateira é cultivada para a obtenção de tubérculos, que representam a parte comestível da planta. Estas estruturas são caules subterrâneos que funcionam como órgãos de reserva para a planta e através dos quais se reproduz vegetativamente (Ducieux *et al.*, 1986). Apesar da *S. tuberosum* ser uma planta anual, pode considerar-se perene, devido à sua capacidade de reprodução vegetativa através de tubérculos subterrâneos (Fidalgo, 1995).

A batateira começou a assumir um papel preponderante em termos económicos e alimentares a partir do século XVII, desde então o uso desta cultura começou a ser uma realidade e, actualmente, é cultivada em mais de 70% dos países, constituindo uma das principais culturas mundiais (Fidalgo, 1995). Nos últimos anos o sector tem experimentado um forte crescimento (estimado em cerca de 4,5%/ano), devido ao desenvolvimento do comércio com países sem tradição de consumo de batata, como a China e a Índia, estimando-se que a produção mundial de batata é de cerca de 300 milhões de toneladas (Anónimo, 2000). O consumo *per capita* nos países desenvolvidos tende a permanecer estável, onde ronda entre os 60 e 80 quilos por pessoa, embora a tendência seja para aumentar nos países em desenvolvimento face às compensações que a batata apresenta, nomeadamente a elevada qualidade de proteínas e as quantidades substanciais de vitaminas e minerais, aspectos que são fundamentais na dieta alimentar (Simmonds, 1995; Anónimo, 2000).

No que se refere a Portugal, a batata é um produto que representa um papel significativo na alimentação portuguesa, podendo-se classificar como a base da dieta alimentar; segundo dados da balança alimentar portuguesa (1990-1997), o cidadão português consome em média 320 gramas por dia de batata, ou seja, cerca de 117 quilos por ano; é assim, o produto mais consumido com capitações superiores aos cereais (Belchior, 2000). A cultura da batata como produto cultivado é muito importante não só do ponto de vista económico, mas também do ponto de vista social, sendo produzida por todo o país basicamente com dois objectivos; de um lado, os agricultores que a cultivam para vender a produção, por outro lado, os 'pequenos' agricultores que fazem a cultura para autoconsumo. Se não considerarmos o olival e os cereais, a batata é a terceira cultura mais importante em termos de área ocupada precedendo a vinha e as pomóideas. Assim, a cultura no nosso País ocupa uma área de 82 mil hectares, tendo uma produção total de um milhão e cinquenta mil toneladas, obtendo-se um rendimento médio de aproximadamente treze toneladas por hectare (Belchior, 2000).

De acordo com informações da Direcção Regional de Agricultura da Beira Litoral, a cultura assume uma grande importância económica nas zonas litorais, nomeadamente nas regiões agrícolas da Beira Litoral e Entre-Douro e Minho onde a batata é feita como cultura principal, sendo em termos de área ocupada a terceira cultura mais importante. Só na região da Beira Litoral, a área de batata, relativamente à área do País, é de 30 por cento, ocupando 24 365 hectares. A sua produção representa cerca de 38 por cento da produção nacional, num total de 400 335 toneladas. Nesta região, Belchior (2000) referiu que as áreas mais adequadas para a produção de batata são as zonas do litoral e as zonas do Baixo Vouga e Baixo Mondego, onde existem condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da cultura, no entanto, para se conseguir uma produção de qualidade e regular são necessárias boas condições de solo, verificando-se que nestas zonas de cultivo começam a ocorrer perdas de produção provocadas pelo excesso de sais acumulados no solo.

O grande valor económico da batateira, associado ao facto de ser considerada uma planta modelo para ser usada nas culturas *in vitro* (Wang & Hu, 1985; Espinoza *et al.*, 1986), justificam o interesse por esta planta. Além disso, dado que as regiões de maior produção estão fortemente implementadas nas áreas costeiras, sendo por isso mais vulneráveis a problemas de salinidade, e que a produção eficiente e com qualidade depende de uma boa condição do solo, é de grande interesse conhecer as respostas da planta a este tipo de situação adversa provocada pela acumulação excessiva de sais no solo, bem como o estudo dos mecanismos envolvidos na tolerância salina dessa planta, aspectos que são particularmente relevantes quer para a investigação, quer para melhorar a produtividade agrícola.

1.2 – Culturas *in vitro* de *Solanum tuberosum* L.

A importância das técnicas de culturas de tecidos foi durante muito tempo reconhecida pela sua aplicação na propagação de muitas plantas com valor agronómico e não só (Jaiswal & Narayan, 1985). Segundo Hussey (1980), os métodos das culturas de tecidos aumentaram a possibilidade de propagar um maior número de espécies do que aquele que era possível com os métodos convencionais. No entanto, foi durante os últimos anos que as técnicas *in vitro* atingiram elevada expansão, não só no âmbito da agricultura, mas sobretudo em diferentes sectores da indústria, como por exemplo na indústria farmacêutica onde são utilizadas na produção de compostos secundários (DiCosmo & Misawa, 1995). Uma área que beneficiou consideravelmente da utilização das culturas de tecidos foi o sector da biologia, já que a tecnologia *in vitro* permitiu a realização de certos estudos outrora não realizáveis, e a sua aplicação no campo da biologia vegetal contribuiu para a aquisição de novos conhecimentos em áreas como a morfologia, bioquímica, patologia e genética (Fidalgo, 1995; Fidalgo *et al.*, 1997). Recentemente, a utilização destas técnicas foi alargada à área da biotecnologia, onde as culturas *in vitro* são usadas em diferentes campos de trabalho com destaque para o melhoramento (Bajaj, 1987).

A tecnologia *in vitro* tem sido especialmente usada com sucesso na planta *Solanum tuberosum*, considerada a espécie modelo nos estudos feitos em culturas de tecidos (Espinoza & Dodds, 1985; Wang & Hu, 1985; Espinoza *et al.*, 1986; Jacobsen, 1987), daí que a batateira seja referida como a primeira planta com valor agronómico em que a biotecnologia foi aplicada com êxito (Bajaj, 1987). As técnicas de culturas *in vitro* têm sido aplicadas em aspectos relacionados com a produção, melhoramento e conservação de germoplasma da batateira (Wang & Hu, 1985), mas é no âmbito do melhoramento da cultura que elas são mais usadas (Jacobsen, 1987; Bajaj, 1987). Para melhorar a produção desta planta quer em termos quantitativos, quer qualitativos, as culturas *in vitro* foram utilizadas na produção de plantas isentas de agentes patogénicos, na micropropagação e na microtuberização para a produção de tubérculos-semente (Espinoza *et al.*, 1986; Bajaj, 1987). Atendendo a que a batateira é susceptível a diversos agentes patogénicos, a produção de plantas isentas de agentes patogénicos é fundamental para alcançar produções elevadas (Hussey & Stacey, 1981). Nesta perspectiva, a cultura *in vitro* de meristemas foi a técnica utilizada para a obtenção de plantas isentas de vírus, dado que a região meristemática do ápice caulinar ou radicular está isenta de vírus (Wang & Hu, 1985; Mellor & Smith, 1987); as plantas regeneradas a partir dos meristemas em cultura são posteriormente multiplicadas *in vitro*, de modo a obter uma elevada quantidade de material vegetal para a produção de tubérculos-semente certificados

(Espinoza *et al.*, 1986). Assim, a técnica das culturas de tecidos proporciona a produção mais rápida de um maior número de plantas do que através do método de propagação convencional por tubérculos, acrescida da vantagem dessas plantas estarem isentas de qualquer agente patogénico (Wang & Huang, 1975; Hussey, 1980; Hussey & Stacey, 1981; Teixeira *et al.*, 1989).

A regeneração *in vitro* das plantas de batateira pode ser realizada a partir da cultura de explantes provenientes de diferentes órgãos e tecidos da planta, incluindo porções de tubérculo, fragmentos foliares, segmentos caulinares e radiculares, e de culturas de tecido caloso, células em suspensão ou de protoplastos isolados (Wang & Huang, 1975; Jarret *et al.*, 1980; Hussey & Stacey, 1981; Espinoza & Dodds, 1985; Jaiswal & Narayan, 1985; Rietveld *et al.*, 1986; Esna-Ashari & Villiers, 1998); embora seja possível propagar elevada quantidade de material vegetal através da regeneração de plantas a partir das culturas de tecido caloso ou de células em suspensão, estes métodos não são normalmente usados, dado que podem afectar a estabilidade genética do material regenerado (Hussey & Stacey, 1981; Wang & Lu, 1985; Espinoza *et al.*, 1986). De acordo com Bajaj (1987), a tecnologia *in vitro* vulgarmente utilizada para a multiplicação da batateira consiste na cultura em meio sólido de estacas caulinares com um gomo axilar, retiradas de plantas regeneradas e mantidas em condições *in vitro*; esta metodologia de propagação é também usada no International Potato Center (CIP – Peru), juntamente com um outro método caracterizado pela cultura de estacas caulinares com vários gomos axilares, que são mergulhadas em meio líquido com agitação, de modo a que os gomos ao longo da estaca se desenvolvam para formar várias plântulas. As estacas caulinares são induzidas a enraizar e as plântulas obtidas, após a aclimatização, podem ser multiplicadas ou transferidas para o campo, onde vão ser usadas para a produção de tubérculos-semente certificados (Espinoza *et al.*, 1986).

A produção de microtubérculos é um processo alternativo para a propagação da batateira e que pode ser realizado em condições *in vitro* (Bajaj, 1987). Os tubérculos produzidos através das técnicas *in vitro* estão isentos de organismos patogénicos e têm pequenas dimensões e baixo peso, o que constitui uma vantagem em relação às plantas micropropagadas, já que são facilmente armazenados e transportados, para além de que a aclimatização das plântulas micropropagadas para o ambiente externo é um processo muito delicado e trabalhoso, normalmente acompanhado por uma elevada percentagem de perdas; por outro lado, os microtubérculos podem ser produzidos em grande quantidade, independentemente da época do ano, e semeados pelo método convencional usado para a batateira (Wang & Hu, 1985; Teixeira *et al.*, 1989). Estes factores justificam o crescente interesse na produção *in vitro* de

microtubérculos como um método alternativo para a micropropagação da batata, além de proporcionarem um bom sistema para os estudos relacionados com a tuberização (Teixeira *et al.*, 1989). Uma diversidade de material vegetal pode ser usado para a microtuberização, sendo geralmente utilizadas as estacas caulinares ou as próprias plântulas mantidas em condições *in vitro* (Wang & Hu, 1985); no CIP o material vegetal normalmente utilizado são as plântulas regeneradas *in vitro* em meio líquido, que após serem sujeitas ao meio indutor de tuberização, produzem tubérculos fisiologicamente aptos para serem colhidos ao fim de cerca de cinco semanas (Espinoza *et al.*, 1986). As condições de fotoperíodo e de temperatura são factores importantes para a tuberização *in vitro*, tendo Hussey & Stacey (1981) verificado que os microtubérculos formavam-se com um fotoperíodo longo, de 16 e 24 horas, associado a elevada intensidade luminosa e temperaturas de 20-24°C; no entanto, a influência destes factores na microtuberização depende da composição hormonal no meio de cultura (Wang & Hu, 1985). Os tubérculos produzidos *in vitro* apresentam características idênticas aos produzidos no campo, e as plantas deles derivadas mostram um comportamento no campo semelhante ao das plantas obtidas pelo processo convencional, assim estes tubérculos são utilizados para a distribuição internacional de germoplasma e para a propagação da batateira, onde são usados no programa de produção de tubérculos-semente (Espinoza *et al.*, 1986).

Para a manutenção dos clones de batateira, o germoplasma é tradicionalmente conservado através de tubérculos, que têm que ser multiplicados todos os anos; este método, para além de ser trabalhoso, moroso, exigir muito espaço e ser dispendioso, expõe o material vegetal às condições ambientais ficando assim sujeito a perdas ocasionadas por pragas e/ou doenças ou por causas climáticas (Bajaj, 1987). As técnicas das culturas de tecidos podem ser aplicadas para a conservação de germoplasma, e os clones são preservados em condições *in vitro* como plântulas e microtubérculos (Wang & Hu, 1985). Estes métodos permitem a conservação de germoplasma durante períodos de tempo não muito longos, dado que é necessário proceder à transferência do material vegetal para meio de cultura fresco com uma certa periodicidade. Nesta perspectiva, a criopreservação em azoto líquido é um processo alternativo para a conservação de germoplasma de batateira durante um longo período de tempo e que requer o mínimo de cuidados, além de assegurar a estabilidade genética dos clones (Bajaj, 1987); segundo Bajaj (1987) é possível criopreservar meristemas, ápices radiculares, células em suspensão e tecido caloso, e até mesmo pólen. Durante muito tempo a colecção de germoplasma de batateira que existe no CIP foi mantida como uma colecção de campo, posteriormente, essa colecção foi transferida para as condições *in vitro*, onde os clones são

conservados a baixa temperatura (8°C) de modo a que o crescimento dos mesmos seja o mais reduzido possível (Espinoza *et al.*, 1986).

A batateira é uma planta que mostra uma elevada capacidade regenerativa em cultura, de tal modo, que pode produzir rebentos directamente nos explantes de diversos órgãos da planta e a partir de tecido caloso, ou seja, ela pode ser regenerada a partir de um conjunto desorganizado de células em proliferação activa induzido numa diversidade de explantes em condições apropriadas (Wang & Huang, 1975; Hussey, 1980; Hussey & Stacey, 1981; Carputo *et al.*, 1995). Quando a regeneração das plantas é precedida pela formação de tecido caloso ocorrem frequentemente alterações genéticas, que resultam na formação de algumas plantas que não são geneticamente idênticas ao material vegetal a partir do qual foi retirado o explante, sendo esse fenómeno designado por variação somaclonal (Larkin & Scowcroft, 1981; Espinoza *et al.*, 1986; Jacobsen, 1987; Hartmann *et al.*, 1990). Ahloowalia (1982) verificou que a maioria das plantas de batateira regeneradas a partir do tecido caloso tiveram um crescimento normal e assemelharam-se às cultivares progenitoras, contudo, algumas das plantas regeneradas foram variantes. Nesse sentido, vários autores referiram a conveniência em usar técnicas de culturas *in vitro* que permitam a regeneração directa de rebentos a partir da superfície dos explantes, evitando assim a produção de tecido caloso e a ocorrência de variação somaclonal (Hussey & Stacey, 1981; Esna-Ashari & Villiers, 1998); para Espinoza & Dodds (1985) a forma de assegurar a máxima uniformidade genética das plântulas de batateira produzidas pelas culturas de tecidos assenta na não formação de tecido caloso durante o processo de regeneração, pois caso contrário, a fidelidade genética do material vegetal é posta em causa, no entanto, Rietveld *et al.* (1987) referiram que a variação somaclonal não está limitada apenas às plantas regeneradas a partir do tecido caloso.

Uma vez que as culturas de tecido caloso e de células em suspensão tendem a ser geneticamente instáveis e perdem geralmente o seu potencial morfogénico quando estabelecidas há já muito tempo, a sua utilização para a multiplicação clonal de batateira deve ser considerada apenas como um último recurso, contudo, a variação genética induzida pelas culturas de tecido caloso e de células pode ser útil como um método para melhorar os clones de batateira existentes (Hussey, 1980; Jarret *et al.*, 1980; Ahloowalia, 1982; Espinoza *et al.*, 1986). De facto, a ocorrência de variabilidade genética é fundamental para qualquer programa de melhoramento, e as culturas de tecido caloso e de células constituem uma boa opção para aumentar a variabilidade genética de uma forma relativamente rápida e sem envolver tecnologia sofisticada (Larkin & Scowcroft, 1981; Quraishi, 1985). A batateira parece ser muito propensa à ocorrência de variação somaclonal, sendo frequentemente detectada

variação fenotípica nas plantas regeneradas a partir das culturas de protoplastos, células em suspensão, tecido caloso e fragmentos de tubérculos (Larkin & Scowcroft, 1981 e referências; Quraishi, 1985; Jacobsen, 1987; Bajaj, 1987 e referências); entre os variantes que surgem durante a regeneração, alguns podem apresentar características que interessam seleccionar e preservar, sendo então esse material clonado através das técnicas de micropropagação (Espinoza *et al.*, 1986). Para Rietveld *et al.* (1987), a batateira é a cultura mais indicada para ser melhorada recorrendo à variação somaclonal, devido à dificuldade que existe no seu melhoramento através dos métodos convencionais.

Nas culturas de tecido caloso e de células em suspensão de batateira é frequentemente observado o aparecimento de variações espontâneas, que são detectadas com facilidade através das diferenças na morfologia e no ritmo de crescimento das células em cultura (Larkin & Scowcroft, 1981). Essas variações podem ocorrer com maior frequência se as culturas forem expostas a factores adversos, assim, a ocorrência deste fenómeno natural tem sido aproveitado para a selecção *in vitro* de linhas mutantes (Gonzales & Widholm, 1985; Bajaj, 1987; Jacobsen, 1987; Widholm, 1987; Ancora & Sonnino, 1987; Carputo *et al.*, 1995). Em vários estudos, as culturas de tecido caloso e de células em suspensão de batateira foram expostas a factores adversos, nomeadamente a diferentes condições de stresse, que resultou na ocorrência de linhas celulares variantes que mostravam ser tolerantes aos factores em causa, o que levou a que fossem seleccionadas e, nalguns casos, após a regeneração verificou-se que o fenótipo variante persistiu nas plantas regeneradas (van Swaaij *et al.*, 1986; Bajaj, 1987 e referências; Sabbah & Tal, 1990; Leone *et al.*, 1994a; Ochatt *et al.*, 1999); de acordo com Santos (1997), este facto oferece enormes potencialidades para a obtenção de novos génotipos tolerantes.

A tolerância à salinidade tem sido uma das características mais referidas para a selecção *in vitro* de linhas celulares (Ben-Hayyim & Kochba, 1983; Watad *et al.*, 1983; Binzel *et al.*, 1985; Singh *et al.*, 1985; Rains *et al.*, 1986; Ochatt *et al.*, 1999), e parece ser também adequada para a selecção de material vegetal através das culturas de tecidos e de células (Rains *et al.*, 1986; Ancora & Sonnino, 1987; Santos, 1997). A opinião de vários autores é unânime que a selecção das linhas variantes em cultura é mais eficiente e rápida do que a selecção dos variantes somaclonais após a regeneração das plantas a partir das culturas de células em suspensão ou de tecido caloso, com a vantagem adicional que as características pelas quais essas linhas celulares são seleccionadas podem ser expressas ao nível celular bem como ao nível da planta, permitindo assim investigar a base genética desse fenótipo (Larkin & Scowcroft, 1981; Gonzales & Widholm, 1985; Jacobsen, 1987; Widholm, 1987). A

indução de variabilidade genética através das culturas de células e de tecido caloso e a selecção dos variantes somaclonais, bem como a selecção *in vitro* de linhas celulares variantes permitem aumentar a diversidade de germoplasma disponível para os programas de melhoramento da batateira e facilitar a obtenção de novas cultivares (Rains *et al.*, 1986; Bajaj, 1987; Carputo *et al.*, 1995).

A hibridização somática é uma técnica conhecida por permitir a obtenção de híbridos entre duas espécies sexualmente incompatíveis (Larkin & Scowcroft, 1981), como se verificou com os híbridos somáticos conseguidos entre a batateira e o tomateiro através da fusão de protoplastos (Melchers *et al.*, 1978), mas a hibridização interespecífica e a produção dos híbridos somáticos entre a espécie cultivada e a do tipo selvagem de batateira também contribui para aumentar a variabilidade genética nesta planta (Bajaj, 1987; Carputo *et al.*, 1995). A fusão de protoplastos juntamente com as culturas de tecido caloso e de células em suspensão são as técnicas que têm sido utilizadas pela biotecnologia em batateira para a indução *in vitro* da resistência a doenças causadas por fungos, e também por certos vírus, bem como da tolerância a determinadas condições ambientais adversas como salinidade e frio e aplicações de herbicidas (Bajaj, 1987).

Nos últimos tempos, a engenharia genética tem merecido especial destaque no melhoramento da batateira, pela possibilidade que oferece para produzir plantas transgénicas que expressam várias características de interesse agronómico, como por exemplo a resistência a pragas e doenças. Apesar de haver elevada disponibilidade de germoplasma para os programas de melhoramento, os factores biológicos inerentes à planta e os interesses agronómicos têm dificultado o desenvolvimento de cultivares com melhores características em relação às já existentes. No entanto, a batateira apresenta diversas vantagens que permitem o seu melhoramento através da transformação genética, ou seja, é uma planta susceptível à infecção por *Agrobacterium tumefaciens*, logo pode ser transformada com esta bactéria, e as plântulas transformadas são facilmente regeneradas e propagadas por via assexuada; devido a estes factores, a batateira foi uma das primeiras culturas com importância agrícola a ser transformada geneticamente (Espinoza *et al.*, 1986; Vayda & Belknap, 1992). Através da engenharia genética foram já conseguidas plantas transgénicas de batateira resistentes a vários agentes patogénicos (vírus, bactérias e fungos) e a insectos, nomeadamente ao escaravelho da batateira, mas para a biotecnologia o objectivo mais importante na obtenção de batateiras transgénicas é modificar certas características qualitativas dos tubérculos, no sentido de melhorar o valor nutricional desta cultura. A tecnologia *in vitro* tem sido fundamental para a

multiplicação dos clones transgênicos de batateira e para a produção dos tubérculos-semente a serem usados nos testes de campo e na comercialização.

As culturas *in vitro* são referidas como sendo o modelo experimental mais adequado para a realização de estudos fisiológicos e bioquímicos (Wang *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 1994; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Hawkins & Lips, 1997). As culturas de tecidos representam um sistema experimental homogêneo, que pode ser manipulado e é facilmente controlável, e que proporciona o material vegetal em elevada quantidade e independentemente da época do ano (Leone *et al.*, 1994b; Fidalgo, 1995; Santos, 1997). Estas condições são difíceis de conseguir quando as plantas intactas são usadas como modelo experimental, daí que a tecnologia *in vitro* seja utilizada, nomeadamente para os estudos ao nível celular e molecular de fenómenos fisiológicos e bioquímicos das plantas superiores (Fukuda *et al.*, 1994; Raviv *et al.*, 1998). Por exemplo, Fukuda *et al.* (1994) recorreram às culturas *in vitro* para estudar o processo de diferenciação dos elementos traqueais, e para estes autores o fenómeno *in vitro* de embriogénese somática constitui o sistema experimental mais adequado para investigar todo o processo de diferenciação das plantas, atendendo às vantagens que este sistema tem em relação à utilização dos embriões zigóticos; também na literatura são encontradas diversas referências a trabalhos nos quais as culturas de tecido caloso e de células em suspensão foram utilizadas para estudos sobre os efeitos de diversas situações adversas (Ericson & Alfinito, 1984; Wang *et al.*, 1993; Leone *et al.*, 1994a,b; Bueno *et al.*, 1998; Lutts *et al.*, 1999; Rus *et al.*, 1999).

A utilidade das culturas de tecidos para a investigação na área da biologia vegetal não é recente; já em 1955 foi reconhecido por Chapman a importância da utilização das culturas *in vitro* como modelo experimental para o estudo dos efeitos da nutrição mineral e de outras condições ambientais na batateira, bem como para os estudos de tuberização. Posteriormente, em 1973, Anstis & Northcote referiram o interesse em usar as culturas de tecido caloso e de células em suspensão de batateira para analisar o metabolismo dos compostos fenólicos. Também Shaw *et al.* (1976) consideraram que a cultura de tecido caloso proveniente de tubérculos de batateira poderia ser utilizada como modelo experimental para estudar diversos aspectos bioquímicos ligados ao desenvolvimento dos tubérculos, mas para tal seria necessário que os parâmetros analisados fossem observados de modo semelhante nos dois níveis de organização; assim, para validar essa possibilidade os autores compararam o tecido caloso com os tubérculos em relação ao conteúdo de aminoácidos e de amido, ao comportamento da enzima sacarose sintetase, e concluíram que o tecido caloso derivado de tubérculos pode ser usado, de facto, para analisar o metabolismo dos hidratos de carbono

nestes órgãos de reserva. Apesar de existirem algumas diferenças quantitativas e qualitativas entre o tubérculo e as culturas de tecido caloso, Muneta *et al.* (1990) e Hagen *et al.* (1991) verificaram que em condições análogas, nomeadamente de temperatura, as alterações no conteúdo de açúcares e amido observadas no tecido caloso foram semelhantes às registadas nos tubérculos. Nesta perspectiva, Hagen & Muneta (1993) utilizaram o tecido caloso derivado de tubérculo para determinar as funções das enzimas ADP-glucose pirofosforilase e fosfofrutocinase no metabolismo dos hidratos de carbono. Com os estudos realizados em tecido caloso derivado de tubérculo foi reforçada a importância das culturas de tecido caloso como modelo experimental para investigar o metabolismo dos hidratos de carbono nos tubérculos de batateira (Muneta *et al.*, 1990; Hagen *et al.*, 1991; Hagen & Muneta, 1993), no entanto, para Hagen *et al.* (1993) a utilidade do tecido caloso proveniente de tubérculo como modelo de estudo será maior se o conteúdo de amido estiver mais próximo ao que existe nos tubérculos, daí que estes autores tenham procurado aumentar o teor de amido no tecido caloso. As culturas de tecido caloso parecem também constituir uma alternativa atractiva ao uso das plantas intactas para estudos sobre os efeitos de agroquímicos usados correntemente na cultura da batateira (Fidalgo *et al.*, 1997); nesse sentido, Fidalgo (1995) observou um elevado grau de correlação existente entre a resposta das plantas aos tratamentos com os agroquímicos e a do tecido caloso relativamente a alguns dos parâmetros analisados a nível bioquímico e a nível ultraestrutural, como por exemplo a actividade da nitrato redutase e da nitrito redutase e a ultraestrutura dos cloroplastos, o que o levou a considerar ser plausível a utilização das culturas *in vitro* como modelo experimental para avaliar alguns efeitos dos agroquímicos estudados.

A possibilidade para a selecção *in vitro* de linhas celulares resistentes a diferentes factores adversos através das culturas de células em suspensão e de tecido caloso, permitiu a obtenção de linhas celulares tolerantes a várias condições de stresse abiótico em *Solanum tuberosum*, e também em *Nicotiana tabacum*, as quais representam o instrumento mais válido para estudar os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que conferem essa tolerância (Gonzales & Widholm, 1985; Singh *et al.*, 1985; Leone *et al.*, 1994a; Ochatt *et al.*, 1999); por exemplo, as linhas celulares de batateira obtidas por van Swaaij *et al.* (1986) tolerantes ao NaCl têm um elevado teor de prolina, logo elas representam o sistema experimental adequado para analisar a importância deste soluto na protecção das células dos efeitos da salinidade.

A indução e produção de tecido caloso é possível ser conseguida a partir de uma diversidade de explantes provenientes de diferentes regiões da planta *Solanum tuberosum*, desde discos de tubérculo (Shaw *et al.*, 1976; LaRosa *et al.*, 1984; van der Plas & Wagner, 1984), segmentos

caulinares e radiculares (Carvalho & Guimarães, 1976), fragmentos foliares, até às culturas de protoplastos, anteras e grãos de pólen (Quraishi *et al.*, 1987). No entanto, a indução e posterior estabelecimento do tecido caloso depende muito do estado fisiológico do tecido ou do órgão no momento em que o explante é isolado, o que está em parte relacionado com a época do ano, bem como com os níveis das hormonas endógenas presentes no tecido a partir do qual o explante é isolado; geralmente, verifica-se que as culturas de tecido caloso apresentam um crescimento mais rápido se o explante for retirado das partes jovens e fisiologicamente mais activas da planta (Dixon, 1985). Com efeito, Quraishi *et al.* (1987) demonstraram que os brotos têm uma boa aptidão para a calogénese, podendo ser utilizados os nós e entre-nós para a indução de tecido caloso (Fig. 1), bem como os segmentos caulinares e as folhas provenientes das plântulas derivadas da cultura *in vitro* do broto inteiro; contudo, os autores verificaram que a formação de tecido caloso a partir de explantes obtidos do tubérculo, quer através do broto, quer a partir de discos de tubérculo (Fig. 1), está dependente da idade do tubérculo e também das suas condições de conservação, nomeadamente da temperatura. Para além destes factores, o tamanho e a forma do explante são também importantes para a indução e proliferação do tecido caloso (Dixon, 1985).

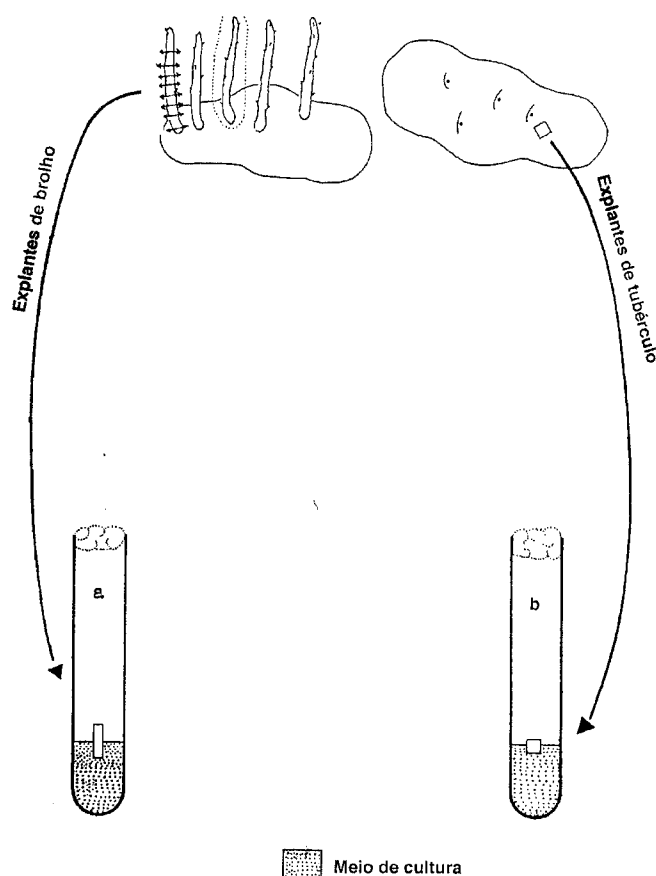


Fig. 1 – Tipos de explante provenientes de *Solanum tuberosum* que podem ser usados para a indução de tecido caloso: (a) fragmentos de broto (nós e entre-nós); (b) fragmentos de tubérculo. Adaptado de Quraishi *et al.* (1987).

As condições utilizadas na cultura dos explantes de batateira são também essenciais na indução da formação de tecido caloso, merecendo especial atenção a composição do meio nutritivo; apesar de existir uma diversidade de meios nutritivos disponíveis, a base de todos eles consiste numa mistura de sais minerais, que combina os macro e micronutrientes essenciais, juntamente com uma fonte de carbono, que é vulgarmente a sacarose. Esta composição não é geralmente suficiente para estabelecer os tecidos em cultura, daí que é necessário adicionar ao meio de cultura diferentes vitaminas, aminoácidos e, eventualmente, outros componentes, como o leite de côco e o hidrolisado de caseína (Anstis & Northcote, 1973; Dixon, 1985; Wang & Hu, 1985). O meio de cultura fica completo com a incorporação dos reguladores de crescimento, embora o tipo e as concentrações destes elementos são geralmente os factores mais críticos para a indução e crescimento do tecido caloso com sucesso (Dixon, 1985). A auxina é considerada o principal regulador de crescimento necessário para a indução do tecido caloso, logo deverá ser incluída no meio nutritivo (Hussey, 1980); em diversos trabalhos a auxina mais utilizada para a indução do tecido caloso da planta de batateira é o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que aparece por vezes combinada com o ácido 3-indolacético (IAA) e com a citocinina conhecida por cinetina (Wang & Haung, 1975; Carvalho & Guimarães, 1976; Ahloowalia, 1982; Wang & Hu, 1985), embora Anstis & Northcote (1973) tenham verificado que o 2,4-D foi mais eficaz na indução do tecido quando foi o único regulador de crescimento presente no meio de cultura. Um aspecto importante a considerar é que um meio nutritivo adequado para a indução de tecido caloso poderá não ser o mais conveniente para a manutenção da cultura, e este facto prende-se sobretudo com a combinação dos reguladores de crescimento a usar no meio nutritivo; nos estudos de Ahloowalia (1982), a composição do meio de cultura usado para a indução de tecido caloso foi diferente do meio utilizado para a manutenção das culturas de tecido caloso, dado que os reguladores de crescimento que estiveram envolvidos na indução foram incapazes de assegurar o crescimento do tecido caloso. Mais recentemente, Hagen *et al.* (1990) verificaram que a indução do tecido caloso a partir de tubérculo foi melhor conseguida com a utilização da auxina sintética picloram do que com o 2,4-D, para além do picloram ser o regulador de crescimento mais adequado para o crescimento do tecido caloso, e daí poder estar presente no meio de manutenção da cultura. Apesar da presença do picloram no meio nutritivo estimular o rápido crescimento do tecido caloso, esta auxina não promove a formação de amido, uma vez que o teor de amido encontrado no tecido caloso que cresceu no meio com picloram foi consideravelmente inferior (40-50%) ao observado no tecido cultivado com o 2,4-D (Hagen *et al.*, 1991); nesse sentido, Hagen *et al.* (1993) desenvolveram uma

metodologia para aumentar o conteúdo de amido no tecido caloso desenvolvido quando o picloram esteve presente como o regulador de crescimento.

O desenvolvimento de tecido caloso a partir do explante envolve uma fase inicial de indução, designada por fase de latência ou *lag*, durante a qual as células preparam-se para a divisão, o metabolismo é activado e o tamanho celular permanece constante (Hartmann *et al.*, 1990; Dracup, 1991); a duração desta fase varia com o estado fisiológico das células do explante e com as condições de cultura, sobretudo com a combinação de reguladores de crescimento presente no meio nutritivo, e segundo Anstis & Northcote (1973) esta fase pode durar uma semana. Segue-se uma fase de síntese activa e de divisões celulares, que estão restritas às células das camadas periféricas do explante, enquanto que as células da zona central não sofrem divisão, e em consequência dessas divisões verifica-se a diminuição do tamanho médio celular (Yeo & Aitchison, 1973; Hartmann *et al.*, 1990); esta fase no crescimento do tecido caloso é conhecida por fase exponencial (Dracup, 1991). Durante a etapa de divisão celular, certas células do explante retornam a um estado meristemático, ou seja, assiste-se à dediferenciação dessas células que se dividem com uma certa frequência para formar o tecido caloso. A fase seguinte, designada por estacionária, é caracterizada pela paragem da divisão e progressiva diferenciação celular, que está associada com o início da organização estrutural das células (Wang & Hu, 1985).

1.3 – A salinidade como factor de stresse

1.3.1 – A salinidade do solo

A salinidade do solo pode ser entendida como a acumulação de sais solúveis a níveis prejudiciais às plantas. A presença, em excesso, desses sais retarda, ou pode mesmo impedir o crescimento e desenvolvimento das plantas, o que resulta num factor limitante para a produção agrícola (Levy *et al.*, 1993; Zhang & Donnelly, 1997; Frommer *et al.*, 1999; White, 1999). Os sais solúveis do solo consistem, principalmente, em proporções várias dos cations Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} e dos anions Cl^- e SO_4^{2-} , ocorrendo em quantidades menores os iões K^+ , HCO_3^- e NO_3^- . O cálcio e o magnésio são os cations que se encontram em maior abundância no complexo de troca dos solos normais (Santos, 1991); quando há acumulação de sais solúveis no solo, o sódio passa a ser o elemento dominante na solução do solo, devido à precipitação de compostos de cálcio e magnésio como sulfatos e carbonatos de baixa

solubilidade. A partir de determinada concentração de sódio na solução, este catião torna-se dominante no complexo de troca e estamos perante um solo salino (Santos, 1991; Marschner, 1995).

A salinidade ocorre sobretudo nas áreas costeiras e nos estuários, podendo ter também uma origem geológica associada à génese do solo (Oliveira, 1990; Taiz & Zeiger, 1998). Há a ideia generalizada que a salinidade é um problema menor nas zonas com climas húmidos, dado que nestes locais os sais são removidos por lixiviação, enquanto que nas zonas áridas e semi-áridas não há precipitação suficiente para remover naturalmente o excesso de sais e o problema agrava-se (Epstein *et al.*, 1980; Marschner, 1995; Lin *et al.*, 1997; Shannon & Grieve, 1999; Kerepesi & Galiba, 2000). As fertilizações intensivas têm contribuído adicionalmente para os excessos localizados de sais, assim como a rega com águas salinas, factores responsáveis pela diminuição da produtividade em muitos locais do mundo (Awad *et al.*, 1990; Shannon *et al.*, 1998; Delfine *et al.*, 2000; Katerji *et al.*, 2000; Qian *et al.*, 2000). A salinidade do solo é um problema que está vulgarizado a todo o mundo e com tendência para aumentar (Winicov, 1998; Marcum, 1999). Já em 1977, Flowers *et al.* consideraram que uma parte substancial da superfície cultivada apresentava elevados teores em sais, nomeadamente do cloreto de sódio e mais recentemente, Zhu (2001) considera que 20% do espaço cultivado tem problemas com a salinidade.

A presença de solutos na água do solo afecta as suas propriedades termodinâmicas e reduz o seu potencial (Taiz & Zeiger, 1998; Bray *et al.* 2000); as elevadas concentrações de sais solúveis na solução do solo, em particular dos sais de sódio, geram um aumento da pressão osmótica, que se traduz num abaixamento do potencial osmótico e consequente diminuição do potencial da água do solo (Markhart & Smit, 1990; Lovelli *et al.* 2000). Os efeitos da salinidade do solo sobre as plantas são sobretudo devidos ao potencial osmótico da solução do solo que, por sua vez, está relacionado com a concentração salina (Oliveira, 1990); assim, a presença de elevadas concentrações de sais na solução do solo reduz a disponibilidade de água para as plantas (Epstein *et al.*, 1980; Bray *et al.* 2000; Lovelli *et al.*, 2000). De acordo com Markhart & Smit (1990), o aumento do teor de cloreto de sódio na água do solo origina uma rápida diminuição no fluxo hídrico através da raiz. Para Taiz & Zeiger (1998), o efeito da presença de solutos na solução do solo é idêntico ao efeito da situação de secura no solo, dado que à medida que um solo seca a sua resistência ao fluxo de água aumenta. Também para Bray *et al.* (2000), os solos salinos dificultam a extracção de água pela planta, daí terem considerado que a planta pode mostrar sintomas de secura em ambientes onde a água não é o factor limitante; Plaut & Federman (1991) já tinham afirmado que as condições de secura e de

salinidade no ambiente que envolve a raiz conferem efeitos semelhantes nas plantas. No entanto, o clima modifica a resposta das plantas à salinidade e em geral os efeitos são mais acentuados sob condições quentes e secas do que sob condições frias e húmidas (Peñuelas *et al.*, 1997; Shannon & Grieve, 1999; Katerji *et al.*, 2000); nesta perspectiva, o déficit hídrico associado à salinidade dos solos é o maior factor limitante ao desenvolvimento das culturas na região mediterrânica (Kerepesi & Galiba, 2000).

O inconveniente para as plantas da existência de sais solúveis na solução do solo está associado não só à dificuldade destas em absorverem água, mas também com a tendência para absorverem preferencialmente alguns nutrientes em detrimento de outros ficando, por isso, sujeitas a carências nutricionais, ou mesmo intoxicações (Marschner, 1995), situação que resulta do facto de alguns elementos como o sódio, o cloreto ou o nitrato, mesmo para baixos potenciais osmóticos do solo, poderem ser absorvidos devido à ocorrência do fenómeno de ajustamento osmótico (Santos, 1991). No entanto, o inconveniente pode ser ainda maior quando, entre os sais presentes, haja predomínio de elementos desfloculantes, nomeadamente o sódio, uma vez que, neste caso, os solos terão tendência para adquirir condições físicas desfavoráveis à circulação da água, do ar e, conseqüentemente, do próprio crescimento das raízes (Taiz & Zeiger, 1998).

1.3.2 – Efeitos da salinidade nas plantas

As plantas diferem bastante na resposta à salinidade, e com base nessa resposta elas podem ser classificadas em halófitas, plantas que vivem e reproduzem-se em ambientes salinos, normalmente dominados pelo cloreto de sódio, mas que podem conter uma diversidade de outros sais (Flowers *et al.*, 1977; Epstein *et al.*, 1980), e que Greenway & Munns (1980) reconheceram como a “flora nativa de solos salinos”; e nas glicófitas ou não-halófitas, que não são capazes de tolerar os sais da mesma forma como as halófitas (Taiz & Zeiger, 1998), logo são apontadas como espécies sensíveis à presença do sal. A resposta à salinidade é geralmente avaliada através da referência ao crescimento da planta (Yang *et al.*, 1990a; Rodriguez *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1999). Segundo vários autores, o efeito geral da salinidade reside na redução do crescimento (Robinson *et al.*, 1983; Subbarao *et al.*, 1990; Hernández *et al.*, 1993; Katsuhara & Kawasaki, 1996; Shannon *et al.*, 1998; Rashid *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2000), que é mais acentuada nas espécies glicófitas (Neumann *et al.*, 1988; Hernández *et al.*, 1995; Kwon *et al.*, 2000). Outros autores preferem avaliar o comportamento das plantas fazendo referência às suas produções ou às suas produtividades; perante uma

situação de stresse salino as plantas respondem com menores produções (Boursier & Läuchli, 1990; Delfine *et al.*, 2000; Lingle *et al.*, 2000) ou com menores produtividades (Ziska *et al.*, 1990; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Holmberg & Bülow, 1998; Hernández *et al.*, 2000).

A resposta das plantas à salinidade é complexa e envolve mudanças no seu metabolismo que culminam com a diminuição, ou mesmo inibição do crescimento (Hilal *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 1999); os mecanismos pelos quais a salinidade inibe o crescimento da planta estão ainda mal definidos (Termaat *et al.*, 1985; Cheeseman, 1988; Rodriguez *et al.*, 1997), no entanto, são apontados três factores inibitórios, ou a combinação destes, como os responsáveis pelo efeito da salinidade na inibição do crescimento vegetal: o défice hídrico na planta que decorre do efeito osmótico desenvolvido pela presença do sal no substrato, também designado por stresse osmótico (Gueta-Dahan *et al.* 1997; Apse *et al.*, 1999; Frommer *et al.*, 1999; Zhu, 2001); a toxicidade por certos elementos, provocada pela absorção e acumulação excessiva dos iões Na^+ e Cl^- ; e o desequilíbrio nutricional resultante da predominância de certos elementos e da menor absorção de outros nutrientes minerais, que poderão ocasionar deficiências nutricionais, como por exemplo do cálcio ou do potássio (Greenway & Munns, 1980; Boursier & Läuchli, 1990; Shannon *et al.*, 1998; Frommer *et al.*, 1999; Shannon & Grieve, 1999; Chartzoulakis & Klapaki, 2000). De acordo com Marschner (1995), não é possível determinar a contribuição relativa destes factores na inibição do crescimento, uma vez que certos elementos condicionam a sua importância, como sejam, o tipo de planta e a fase de desenvolvimento em que se encontra, a fertilidade do substrato e o sal dominante, o tempo de exposição a esse sal, e também as condições climáticas em que a planta se desenvolve.

Nos substratos salinos, em termos gerais o desenvolvimento caulinar é mais afectado do que o crescimento da raiz (Munns & Termaat, 1986; Cheeseman, 1988) e, segundo Shannon & Grieve (1999), o efeito osmótico da salinidade é responsável pelo desenvolvimento da menor razão caule/raiz.

Para além do crescimento ser menor, as diferenças morfológicas evidentes nas plantas que crescem em contacto com cloreto de sódio são a menor área foliar e a maior espessura da folha, por vezes acompanhadas pela menor densidade foliar (Robinson *et al.*, 1983; Naik & Widholm, 1993; Lazcano-Ferrat & Lovatt, 1997; Delgado & Sánchez-Raya, 1999; Delfine *et al.*, 2000). Munns & Termaat (1986) salientaram que a diminuição no crescimento foliar é a primeira resposta das glicófitas em stresse salino, e Chartzoulakis & Klapaki (2000) verificaram que o efeito da salinidade na redução da área foliar em *Capsicum annum* foi mais significativo do que na redução dos outros parâmetros vegetativos. Segundo Lovelli *et al.*

(2000), a salinidade reduz a área foliar não só através do menor crescimento, mas também através da mais rápida senescência foliar; a senescência prematura é uma forma da planta reduzir as perdas de água por transpiração e de remover os iões Na^+ e Cl^- acumulados na folha (Kwon *et al.*, 2000).

Os mecanismos pelos quais o sal reduz a expansão foliar não foram ainda devidamente esclarecidos (Neumann *et al.*, 1988; Rodriguez *et al.*, 1997); a redução no crescimento foliar em resposta à salinidade é frequentemente atribuída a variações no estado hídrico da folha, uma vez que aumentando o potencial hídrico na zona da raiz, através da remoção do sal, o crescimento foliar regressa ao estado normal (Termaat *et al.*, 1985; Marschner, 1995). É geralmente aceite que o crescimento foliar reduzido em resultado da exposição das plantas ao sal tem como causa mais provável a inadequada turgescência nas células da folha. De facto, Neumann *et al.* (1988) comprovaram em feijoeiro que a turgescência diminuiu nas células da folha em resposta ao NaCl, e este foi o factor responsável pela redução do crescimento foliar; contudo, nos estudos realizados por Termaat *et al.* (1985), a diminuição na turgescência provocada pelo NaCl não foi a causa da redução do crescimento foliar, tendo os autores sugerido que a exposição ao sal terá induzido na raiz um sinal que foi transmitido para a folha e aí regulou o seu crescimento; posteriormente, Davies & Zhang (1991) identificaram esse sinal como sendo o ácido abscísico, que produzido nas raízes sujeitas ao stresse osmótico desloca-se para as folhas via xilema.

A resposta das plantas à salinidade é complexa e envolve modificações para além da morfologia, ao nível da anatomia. Neste sentido, Hilal *et al.* (1998) observaram um atraso na diferenciação do xilema primário aliado à rápida diferenciação do xilema secundário durante o desenvolvimento da raiz em situação salina. Também Wang *et al.* (1997) verificaram que o desenvolvimento do tecido vascular nas plantas em stresse salino foi afectado, ocorreu diminuição na lenhificação, contribuindo para a redução do crescimento; este fenómeno pode explicar o facto das plantas em stresse salino permanecerem durante mais tempo na fase juvenil (Shannon & Grieve, 1999).

A redução do crescimento pela salinidade é frequentemente acompanhada pela diminuição na fotossíntese (Robinson *et al.* 1983; Seemann & Sharkey, 1986; Cheeseman, 1988; Plaut & Federman, 1991; Wang *et al.*, 1997; Khavari-Nejad & Mostofi, 1998; Allakhverdiev *et al.*, 2000), sendo a menor capacidade fotossintética apontada como o factor da diminuição da produtividade observada em muitas espécies expostas ao sal (Ziska *et al.*, 1990; Bethke & Drew, 1992; Delfine *et al.*, 2000). As causas para a diminuição da capacidade fotossintética nas plantas em condições salinas não foram devidamente esclarecidas (Plaut & Federman,

1991; Allakhverdiev *et al.*, 2000; Lovelli *et al.*, 2000), tendo Bethke & Drew (1992) referido que o conhecimento dos factores responsáveis pela sua redução é importante para a apresentação de estratégias com o fim de manipular a tolerância das plantas ao sal.

Vários estudos concluíram que a diminuição na fotossíntese em resposta à salinidade resultou principalmente da menor conductância estomática e, conseqüentemente, menor disponibilidade de CO₂ para a reacção de carboxilação (Robinson *et al.*, 1983; Downton *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 1997; Delfine *et al.*, 2000; Lovelli *et al.*, 2000). Downton *et al.* (1985) e Khavari-Nejad & Mostofi (1998) referiram que para além da menor conductância estomática outros factores contribuíram para a diminuição da fotossíntese; assim, segundo estes autores a reduzida dimensão foliar levou à menor fixação de CO₂, e o menor conteúdo de clorofilas observado nas plantas sujeitas ao tratamento salino poderá ser responsável pela redução da fotossíntese nessas plantas.

Outros autores defenderam que a redução na fotossíntese está ligada apenas a elementos não estomáticos, isto é, a salinidade reduz a fotossíntese por outros factores que não o fecho dos estomas (Seemann & Sharkey, 1986; Ziska *et al.*, 1990; Bethke & Drew, 1992). Para Bethke & Drew (1992) é inevitável a absorção e acumulação dos iões Na⁺ e Cl⁻ nas folhas, e a conseqüente inibição da fotossíntese, possivelmente por danos causados ao nível do cloroplasto, quando a planta cresce em contacto com NaCl.

Apesar de não ser possível limitar apenas a uma causa a diminuição da fotossíntese nas plantas em condições salinas, os trabalhos de Ziska *et al.* (1990) e de Bethke & Drew (1992) mostraram que o ião cloreto esteve mais ligado à inibição do processo do que o catião sódio, e segundo Marschner (1995), o cloreto é mais prejudicial à fotossíntese do que o sódio.

O decréscimo na fotossíntese perturba a disponibilidade de hidratos de carbono na folha, que diminuem com o aumento da salinidade (Ziska *et al.*, 1990). Perante o menor conteúdo em hidratos de carbono, a sua utilização subsequente vai ficar comprometida e poderá assim explicar as reduções na produção e no crescimento de frutos (Chartzoulakis & Klapaki, 2000; Delfine *et al.*, 2000), bem como por exemplo na qualidade do sumo da cana-de-açúcar (Lingle *et al.*, 2000). Um factor adicional que poderá contribuir para a menor disponibilidade de hidratos de carbono para o crescimento é a maior actividade respiratória observada nas raízes em condições salinas (Wang *et al.*, 1997).

Nos substratos salinos, o sódio e o cloreto são os elementos geralmente dominantes; apesar de ambos serem essenciais para todas as plantas superiores como micronutrientes, e do sódio em particular ser muito importante para as halófitas exigentes neste elemento para o ajustamento osmótico, também nas plantas CAM e algumas espécies C₄, o sódio parece ser vital para

manter a eficiência fotossintética. No entanto, quando a disponibilidade de ambos os elementos nos substratos salinos excede as necessidades e são absorvidos em quantidades superiores ao necessário para o funcionamento normal, pode ocorrer uma situação de toxicidade nas plantas não tolerantes ao sal, embora possam obviamente beneficiar as halófitas (Marschner, 1995; Taiz & Zeiger, 1998).

Muitos dos desequilíbrios nutricionais induzidos em solos salinos estão associados a desequilíbrios na disponibilidade e absorção dos nutrientes minerais (Santos, 1997), o que vai reflectir-se na proporção destes elementos na planta e na relação entre eles, e consequentemente no desenvolvimento da planta. Diversas espécies registaram uma acumulação significativa de Na^+ e de Cl^- nos órgãos aéreos quando cresceram em condições salinas, enquanto que as concentrações sobretudo do K^+ e do Ca^{2+} diminuíram (Robinson *et al.*, 1983; Boursier & Läuchli, 1990; Jolivet *et al.*, 1990; Subbarao *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1999; Rashid *et al.*, 1999; Chartzoulakis & Klapaki, 2000; Qian *et al.*, 2000). Kwon *et al.* (2000) concluíram que durante o tratamento salino o crescimento das plantas é afectado pelos efeitos iónicos irreversíveis nas folhas, sobretudo nas adultas, e pelo défice hídrico reversível, e que segundo Greenway & Munns (1980), é uma tendência geral nas glicófitas.

A baixa disponibilidade de cálcio nos meios salinos foi apontada por diversos autores como uma das principais causas para os efeitos adversos do excesso de Na^+ (Ben-Hayyim & Kochba, 1983; Bethke & Drew, 1992; Katsuhara & Kawasaki, 1996; Hawkins & Lips, 1997; Bressan *et al.*, 1998; Kinraide, 1999). Nas plantas que crescem em substratos salinos com baixa concentração de Ca^{2+} , o Na^+ reduz a actividade do cálcio na solução, e inibe a sua absorção e transporte, podendo assim induzir a deficiência neste elemento (Cramer *et al.*, 1985; Marschner, 1995).

Os inconvenientes da salinidade não estão exclusivamente ligados com a toxicidade pelo Na^+ , mas também com a dificuldade na aquisição de nutrientes (Flowers *et al.*, 1977; Greenway & Munns, 1980). O último aspecto está particularmente relacionado com a aquisição do K^+ , sobretudo se este estiver em minoria relativamente ao Na^+ (Ben-Hayyim *et al.*, 1985; Watad *et al.*, 1991; Alhagdow *et al.*, 1999; Delgado & Sánchez-Raya, 1999). O K^+ é necessário para a regulação do potencial osmótico das células e manutenção da turgescência celular e, portanto, à expansão celular, importante também como cofactor de enzimas e na activação de muitas envolvidas na respiração e fotossíntese (Maathuis & Amtmann, 1999; Schachtman & Liu, 1999).

O azoto é geralmente o nutriente que as plantas necessitam em maior quantidade, sendo considerado o mais limitante para a fotossíntese e crescimento da planta. O azoto torna-se reduzido para a planta em situação salina, dado que um dos primeiros processos fisiológicos a ser restringido pelo sal é a sua absorção sob a forma de nitrato (Marschner, 1995; Hawkins & Lips, 1997); assim, a redução na produtividade observada em condições salinas é em parte devida à restrição desse elemento para os processos de fotossíntese e crescimento (Seemann & Sharkey, 1986). Nas culturas de células em suspensão postas em contacto com o NaCl, Hawkins & Lips (1997) registaram um menor influxo de NO_3^- em relação às culturas de células em meio sem sal, determinado pela redução na actividade da H^+ -ATPase da membrana plasmática. A fixação simbiótica do azoto atmosférico é também comprometida pela salinidade, conforme Abd-Alla *et al.* (1998) observaram na simbiose soja-*Rhizobium*.

1.3.3 – A salinidade como factor de stresse oxidativo

Em condições fisiológicas normais verifica-se um equilíbrio dinâmico entre a produção das espécies activas de oxigénio (EAOs), que podem oxidar e danificar os componentes celulares, e a sua remoção através do sistema antioxidante (Gossett *et al.*, 1994a); uma alteração neste equilíbrio em favor das reacções oxidantes é designada por stresse oxidativo (Bartosz, 1997). Diversos factores podem perturbar esse equilíbrio e promover o aumento na formação das EAOs nas células vegetais, entre esses encontram-se os factores ambientais como as variações extremas de temperatura, as radiações ultravioletas e a elevada intensidade luminosa, os poluentes atmosféricos, a secura e a salinidade (Bowler *et al.*, 1992, 1994; Hernández *et al.*, 1993, 1995; Scandalios, 1993; Gossett *et al.*, 1996; Meneguzzo *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 1999; Yu & Rengel, 1999; Bray *et al.*, 2000; Lin & Kao, 2000). A salinidade afecta o desenvolvimento da planta através dos seus efeitos osmótico e iónico (Lutts *et al.*, 1999), no entanto, estes efeitos são acompanhados pela acumulação das EAOs, que resulta no stresse oxidativo, considerado por alguns autores um efeito secundário da salinidade (Hernández *et al.*, 1999, 2000; Gossett *et al.*, 1994a; Bajji *et al.*, 1998; Holmberg & Bülow, 1998; Zhu, 2001). Com o objectivo de definir a relação entre a salinidade e o stresse oxidativo, Bueno *et al.* (1998) realizaram um estudo em culturas de células em suspensão de *Nicotiana tabacum* submetidas ao stresse salino, e verificaram que a exposição ao NaCl causou alterações na actividade das enzimas do sistema antioxidante e no nível de transcritos dessas enzimas, para além de ter induzido a peroxidação lipídica; para Iturbe-Ormaetxe *et al.* (1998) os resultados

obtidos por Bueno *et al.* (1998) são característicos da ocorrência de stresse oxidativo nas células, o que significa que o NaCl é um factor de stresse oxidativo.

A menor disponibilidade de água provocada pela salinidade leva ao fecho dos estomas e, consequentemente, reduz a assimilação de dióxido de carbono na folha que se traduz na diminuição da fotossíntese (Savouré *et al.*, 1999). Perante a menor concentração de CO₂ nos cloroplastos, estes ficam expostos a um excesso de energia luminosa e verifica-se a menor disponibilidade de NADP⁺ para aceitar os electrões provenientes da cadeia de transporte do fotossistema I; assim, os electrões dirigem-se para a molécula de oxigénio, que resulta na redução do oxigénio e formação do superóxido (O₂⁻) (Bowler *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 1995; Alscher *et al.*, 1997; Casano *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2000; Foyer & Noctor, 2000). O superóxido não atravessa as membranas celulares, logo é rapidamente convertido no peróxido de hidrogénio (H₂O₂) através da superóxido dismutase (SOD), ou por intermédio de algumas oxidases, ou até mesmo via dismutação espontânea no local da sua formação (Smirnoff, 1995; Bartosz, 1997). O H₂O₂ pode formar-se não só como produto da dismutação do superóxido, mas também por via da fotorespiração, dado que a menor disponibilidade de CO₂ nos cloroplastos induz a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase a funcionar como oxigenase e leva à produção de H₂O₂ nos peroxissomas (Neill *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2000). A posterior redução do peróxido de hidrogénio na presença dos iões metálicos como o ferro e o cobre forma a espécie de oxigénio que é considerada mais reactiva, o radical hidroxilo (·OH) (Imlay & Linn, 1988; Scandalios, 1993; Smirnoff, 1995; Fourcroy, 1999). O superóxido pode actuar como oxidante, e também como agente redutor, mas segundo alguns autores, a sua toxicidade reside na formação do peróxido de hidrogénio e, sobretudo, na produção do radical hidroxilo (Scandalios, 1993; Bowler *et al.*, 1994; Imlay & Linn, 1988; Smirnoff, 1995; Noctor & Foyer, 1998); por sua vez, o peróxido de hidrogénio pode facilmente atravessar as membranas celulares e actuar em locais distantes do local de formação. Apesar de ser um oxidante mais estável do que o superóxido, o peróxido de hidrogénio pode desencadear o stresse oxidativo em locais da célula onde não há formação das EAOs (Imlay & Linn, 1988; Bartosz, 1997; Scandalios, 1997; Scandalios *et al.*, 1997; Dat *et al.*, 2000). O radical hidroxilo (·OH) é extremamente reactivo e reage com a maioria das moléculas orgânicas, como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos e clorofilas, promovendo a desnaturação de proteínas, a inactivação de enzimas e a peroxidação lipídica nas membranas celulares (Scandalios, 1993, 1997; Smirnoff, 1995; Jiménez *et al.*, 1997; Savouré *et al.*, 1999; Bartosz, 1997; Dat *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2000); a intervenção deste radical passa também por provocar mutações e quebras na cadeia de DNA, conduzindo à morte celular (Imlay &

Linn, 1988; Alscher *et al.*, 1997). A presença de peróxidos lipídicos é um indicador de stresse oxidativo (Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999), e a exposição ao NaCl estimulou a acumulação dos produtos da peroxidação lipídica nas folhas de *Nicotiana plumbaginifolia* (Savouré *et al.*, 1999).

O excesso de energia luminosa aumenta a probabilidade de formar nas células vegetais uma outra espécie reactiva de oxigénio, o singlete de oxigénio ($^1\text{O}_2$), produzido nas membranas dos tilacóides através da transferência de um electrão da molécula de clorofila no estado excitado para o O_2 molecular; este radical reage com diversos aminoácidos e é considerado o maior responsável pela peroxidação lipídica nas membranas dos tilacóides (Scandalios, 1993, 1997; Bowler *et al.*, 1994; Hernández *et al.*, 1995; Smirnoff, 1995; Foyer & Noctor, 2000).

Numa situação de stresse salino, os cloroplastos são apontados como o principal local de produção das espécies activas de oxigénio nas plantas, onde os níveis de O_2 são elevados durante a fotossíntese e a presença de pigmentos é também significativa (Gossett *et al.*, 1994a; Hernández *et al.*, 1995; Alscher *et al.*, 1997; Holmberg & Bülow, 1998; Gómez *et al.*, 1999; Zhu, 2001), no entanto, a produção de EAOs, especialmente de H_2O_2 , é também significativa na mitocôndria e nos peroxissomas (Hernández *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 1997; Bartosz, 1997; Gómez *et al.*, 1999; Savouré *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Por outro lado, os cloroplastos são também os organelos mais afectados pelos efeitos das EAOs, devido não só à abundância destas espécies de oxigénio, mas sobretudo ao elevado conteúdo de ácidos gordos polinsaturados presente nos lípidos das membranas, que os tornam num alvo para a peroxidação (Smirnoff, 1995; Grillo *et al.*, 1996), e que segundo Gómez *et al.* (1999), justifica os elevados níveis de peroxidação lipídica detectados nos cloroplastos em consequência do tratamento salino.

As plantas desenvolveram um eficiente sistema de defesa antioxidante para se protegerem dos efeitos das EAOs produzidas durante os processos fisiológicos normal e de stresse (Alscher *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 1997; Scandalios, 1997; Scandalios *et al.*, 1997); neste sistema antioxidante incluem-se os mecanismos não-enzimático e enzimático, que têm a função de manter um nível baixo de EAOs nas células vegetais (Fig. 2) (Scandalios, 1993; Bowler *et al.*, 1994; Fourcroy, 1999; Bray *et al.*, 2000). No mecanismo não-enzimático incluem-se a glutatona e o ácido ascórbico, moléculas de baixo peso molecular solúveis em água, bem como o α -tocoferol e os carotenóides, compostos que são capazes de reagir directamente com as EAOs, apesar do ácido ascórbico e da glutatona funcionarem também como substratos nas reacções de desintoxicação catalizadas pelas enzimas antioxidantes (Alscher *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Davey *et al.*, 2000;

Hernández *et al.*, 2000). O mecanismo enzimático inclui as enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX) e a glutathione redutase (GR), localizadas em diferentes compartimentos da célula (Scandalios, 1990; Tsang *et al.*, 1991; Bowler *et al.*, 1994; Saruyama & Tanida, 1995; Foyer *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1999); a compartimentação celular dos mecanismos antioxidantes é essencial para a remoção eficiente das EAOs nos seus locais de produção na célula (Tsang *et al.*, 1991; Alscher *et al.*, 1997; Scandalios, 1993, 1997; Fourcroy, 1999; Iannelli *et al.*, 1999; Bray *et al.*, 2000). Os níveis dos antioxidantes, como a glutathione e o ácido ascórbico, juntamente com a actividade das enzimas antioxidantes aumentam geralmente nas plantas em condições de stresse oxidativo e esse aumento pode conferir tolerância ao factor que motivou o stresse oxidativo (Foyer *et al.*, 1997; Casano *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2000); de acordo com Iannelli *et al.* (1999), a tolerância ao stresse oxidativo depende do aumento numa forma integrada do sistema antioxidante.

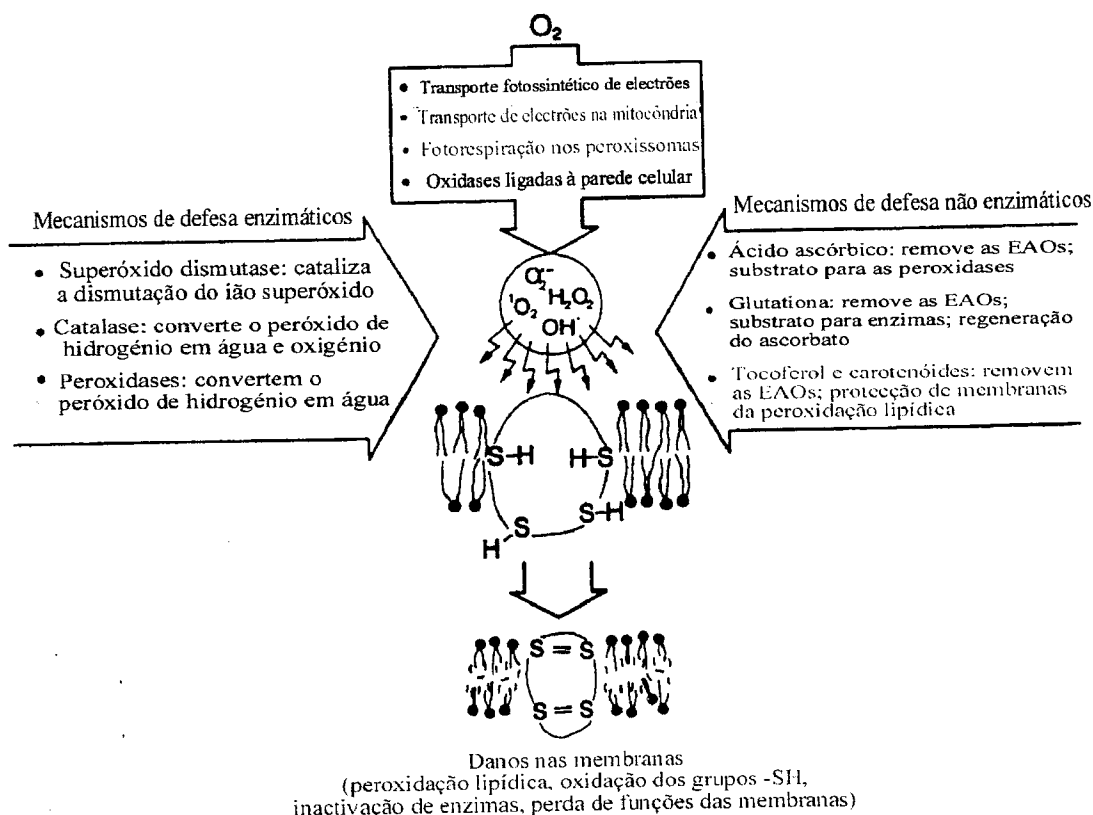


Fig. 2 → Modelo que representa a produção das espécies activas de oxigénio ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, 1O_2) a partir de diversos processos metabólicos onde o oxigénio está envolvido, como por exemplo a fotossíntese e a respiração, e em consequência dessa produção, as espécies activas de oxigénio vão provocar a peroxidação dos ácidos gordos das membranas e a oxidação dos grupos tiol ($-SH$) das enzimas, resultando na perda da integridade e funcionamento das membranas. As plantas possuem um sistema de defesa antioxidante responsável pela eliminação das espécies activas de oxigénio nas células, que dele fazem parte os mecanismos enzimático e não-enzimático; o mecanismo enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase ($O_2^{\cdot -} \rightarrow H_2O_2$), a catalase e as

peroxidases ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$), e no mecanismo não-enzimático incluem-se o ácido ascórbico, a glutatona, o α -tocoferol e os carotenóides. Adaptado de Marschner (1995).

A glutatona é o maior composto tiol nas plantas, conhecido por desempenhar nas plantas uma acção antioxidante que envolve não só a reacção com as diversas EAOs, mas também a regeneração do ácido ascórbico no ciclo ascorbato-glutatona (Wise & Naylor, 1987; Foyer *et al.*, 1997; Noctor & Foyer, 1998). A glutatona não tem uma distribuição uniforme na célula, tal como os restantes compostos e enzimas antioxidantes, sendo a maior proporção detectada nos cloroplastos e no citoplasma e os níveis mais baixos observados na mitocôndria e vacúolo (Smirnoff, 1995; Noctor & Foyer, 1998). A glutatona tende a permanecer na forma reduzida em condições óptimas, e para funcionar como antioxidante é necessário que assim se mantenha, contudo, em situações de stresse oxidativo é frequente ocorrer a sua oxidação; a glutatona redutase é a enzima responsável por manter a glutatona no estado reduzido e, portanto, a sua actividade é determinante na disponibilidade da glutatona como antioxidante (Foyer *et al.*, 1997).

O ácido ascórbico destaca-se por ser o principal antioxidante que está directamente envolvido na eliminação das EAOs (Wise & Naylor, 1987; Conklin, 1998; Bray *et al.*, 2000); segundo Noctor & Foyer (1998) em organelos como os cloroplastos, que contêm elevadas concentrações de EAOs, a redução directa do superóxido pelo ácido ascórbico é rápida. Uma das características mais importantes na actividade antioxidante do ácido ascórbico é o seu envolvimento na regeneração do α -tocoferol, para além de representar o substrato das peroxidases que participam na remoção do peróxido de hidrogénio formado nos cloroplastos (Alscher *et al.*, 1997; Conklin, 1998; Noctor & Foyer, 1998). A importância do ácido ascórbico nas células ultrapassa a função antioxidante, ele actua também como co-factor de diversas enzimas, na fotossíntese é receptor na cadeia de transporte de electrões e é o substrato da enzima responsável pela síntese do pigmento zeaxantina (Conklin, 1998; Noctor & Foyer, 1998; Davey *et al.*, 2000); este pigmento, tal como o β -caroteno, em condições que limitam a fixação de CO_2 , como acontece com a salinidade, contribuem para dissipar o excesso de energia de excitação protegendo a actividade do fotossistema II, deste modo, o ácido ascórbico é referido estar também envolvido na fotoprotecção (Smirnoff, 1995; Foyer & Noctor, 2000). Ao nível celular, o conteúdo de ácido ascórbico é elevado nos cloroplastos e no citoplasma, e é menor na mitocôndria, no apoplasto e no vacúolo da célula; as maiores concentrações de ácido ascórbico, e também de glutatona, que ocorrem nos cloroplastos são justificadas pela abundância das EAOs como produtos da fotossíntese, daí que a presença daqueles compostos como antioxidantes seja tão importante nos cloroplastos; já no apoplasto,

o ácido ascórbico está envolvido na protecção das membranas celulares contra o stresse oxidativo provocado pela acção do ozono e de outros poluentes atmosféricos, ou por situações de lesão (Wise & Naylor, 1987; Noctor & Foyer, 1998; Davey *et al.*, 2000). Atendendo às funções do ácido ascórbico como antioxidante, os seus níveis aumentam em condições que desencadeiam o stresse oxidativo, e porque a salinidade é um factor de stresse oxidativo será de esperar que a concentração deste composto aumente em situações salinas (Dat *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2000); no entanto, quando ocorrer o decréscimo na quantidade deste antioxidante poderá ser um indício da exposição das células ao stress oxidativo extremo (Smirnoff, 1995).

O α -tocoferol é uma molécula lipofílica que ocorre em elevadas concentrações nas membranas dos cloroplastos, está associada em particular às membranas dos tilacóides, e a sua acção consiste na estabilização biofísica das membranas, impedindo a peroxidação lipídica, na protecção dos pigmentos fotossintéticos, e está directamente envolvida na eliminação das EAOs e dos produtos da peroxidação lipídica nas membranas; estas características fazem do α -tocoferol um importante antioxidante, sobretudo nos sistemas fotossintéticos (Wise & Naylor, 1987; Spychalla *et al.*, 1990; Smirnoff, 1995; Foyer & Noctor, 2000). Associado ao α -tocoferol na protecção das membranas da peroxidação lipídica estão os carotenóides, localizados nas membranas dos tilacóides, que participam na remoção directa do superóxido, do oxigénio singlete e do hidroxilo, logo, assumem uma actividade antioxidante (Wise & Naylor, 1987; Scandalios, 1993 e 1997; Smirnoff, 1995; Davey *et al.*, 2000; Foyer & Noctor, 2000). De acordo com Bartosz (1997), as enzimas antioxidantes são eficazes na eliminação das EAOs menos agressivas (O_2^- e H_2O_2), mas não na remoção do radical $\cdot OH$ ou do 1O_2 , considerados mais tóxicos para o metabolismo celular, enquanto que os antioxidantes não-enzimáticos são mais eficientes na eliminação destes radicais activos.

As enzimas mais importantes para a remoção das EAOs nas células das plantas superiores são a enzima superóxido dismutase (SOD), uma família de metaloenzimas que catalizam e aceleram a dismutação do O_2^- em H_2O_2 , a catalase que converte o produto da reacção anterior, o H_2O_2 , em oxigénio e água, e a peroxidase do ascorbato, que reduz o H_2O_2 em água através da oxidação do ascorbato (Bartosz, 1997; Scandalios, 1997; Iannelli *et al.*, 1999; Foyer & Noctor, 2000). A SOD catalisa a primeira etapa no processo enzimático de eliminação das espécies activas de oxigénio através da dismutação de duas moléculas do anião superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio molecular, por este modo, é a enzima responsável por manter o superóxido a baixos níveis na célula (Tsang *et al.*, 1991; Bowler *et al.*, 1994; Zhu & Scandalios, 1994; Scandalios, 1997). São conhecidos três tipos de SOD, que

diferem entre si no cofactor metálico presente no centro activo desta enzima; as SOD que contêm como metais prostéticos o cobre ou o zinco designam-se Cu/ZnSOD, as que contêm o manganês e o ferro designam-se por MnSOD e FeSOD, respectivamente. Os diferentes tipos de SOD estão localizados em compartimentos celulares distintos, assim a enzima Cu/ZnSOD é encontrada nos cloroplastos e no citosol, a MnSOD está localizada na mitocôndria e a FeSOD é encontrada nos cloroplastos (Bowler *et al.*, 1992, 1994; Scandalios, 1993, 1997; Tanaka *et al.*, 1996), embora exista a possibilidade de também se encontrar nos peroxissomas e mitocôndrias de algumas espécies (Droillard & Paulin, 1990). A abundância relativa destas isoformas é variável entre espécies e tecidos, no entanto, dos três tipos a Cu/ZnSOD é considerada a mais abundante nas plantas (Alscher *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1999). A função das SODs na defesa das células dos efeitos nocivos causados pelas EAOs está bem documentada na bibliografia (Bowler *et al.*, 1992 e referências; Raychaudhuri, 2000 e referências); diversos estudos demonstraram a maior actividade da SOD em resposta a diferentes factores de stresse oxidativo, confirmando assim a sua importância para a tolerância da planta e culturas de células a condições adversas (Spychalla *et al.*, 1990; Tsang *et al.*, 1991; Perl *et al.*, 1993; Bowler *et al.*, 1994; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; İnci *et al.*, 1998; Yu & Rengel, 1999; Raychaudhuri & Deng, 2000 e referências).

A maior actividade da SOD em situações de stresse terá que ser acompanhada pelo aumento da capacidade de eliminação do H_2O_2 , caso contrário irá haver condições favoráveis à formação do radical hidroxilo potencialmente tóxico (Gossett *et al.*, 1994a). A catalase é considerada a principal enzima envolvida na eliminação do H_2O_2 , dado que decompõe rapidamente o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água (Scandalios *et al.*, 1997; Willekens *et al.*, 1997; Foyer & Noctor, 2000). A catalase ocorre em três formas moleculares, a CAT1, CAT2 e CAT3, é uma enzima que está localizada nos peroxissomas e glioxissomas, embora seja também detectada na mitocôndria da planta do milho, logo vai ser responsável pela degradação do H_2O_2 produzido nesses organelos (Scandalios, 1990; Scandalios *et al.*, 1997; Smirnoff, 1995; Dat *et al.*, 2000). Várias situações de stresse induzem o aumento na actividade da catalase, e sendo esta uma enzima que participa na eliminação do H_2O_2 , conclui-se que a catalase está também envolvida na tolerância ao stresse oxidativo (Spychalla *et al.*, 1990; Saruyama & Tanida, 1995; Prasad, 1997; Willekens *et al.*, 1997; Savouré *et al.*, 1999).

A eliminação do H_2O_2 produzido em elevadas concentrações nos cloroplastos é fundamental para o funcionamento do organelo, dado que as enzimas do ciclo de Calvin são extremamente sensíveis ao H_2O_2 e níveis elevados de H_2O_2 inibem a fixação de CO_2 (Scandalios, 1993;

Scandalios *et al.*, 1997); contudo, a catalase não está presente nos cloroplastos, daí que a eliminação do H_2O_2 nos cloroplastos vai depender totalmente da actividade da peroxidase do ascorbato através do ciclo ascorbato-glutationa (Scandalios *et al.*, 1997; Foyer & Noctor, 2000). A peroxidase do ascorbato é uma enzima muito activa nos cloroplastos, mas para a redução do H_2O_2 em H_2O ela requer um substrato específico, o ácido ascórbico; para a função da APX o ácido ascórbico terá que estar disponível na forma reduzida, logo é importante que ocorra a sua regeneração (Noctor & Foyer, 1998; Davey *et al.*, 2000; Foyer & Noctor, 2000). O monodehidroascorbato, produto da peroxidação do ácido ascórbico pela APX, pode ser reduzido directamente em ácido ascórbico através da ferredoxina reduzida, ou por via enzimática através do ciclo ascorbato-glutationa (Wang *et al.*, 1999; Bray *et al.*, 2000). Por esta via, o monodehidroascorbato é reduzido em ácido ascórbico através da monodehidroascorbato redutase, que usa o NAD(P)H como agente redutor, e o monodehidroascorbato que não seja reduzido enzimaticamente é dismutado de forma espontânea em dehidroascorbato que, por sua vez, vai reagir com a glutathione para produzir o ácido ascórbico e glutathione oxidada numa reacção catalisada pela enzima dehidroascorbato redutase; a glutathione oxidada é depois regenerada pela glutathione redutase através da oxidação do NADPH (Smirnoff, 1995; Scandalios *et al.*, 1997; Bray *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2000; Foyer & Noctor, 2000). A actividade das enzimas do ciclo ascorbato-glutationa ocorre sobretudo nos cloroplastos e citosol das células (Smirnoff, 1995; Alscher *et al.*, 1997), no entanto, foi detectada a presença das enzimas intervenientes neste ciclo na mitocôndria e nos peroxissomas em folhas de ervilha (Jiménez *et al.*, 1997); por outro lado, são conhecidas cinco isoformas da APX (no citosol, peroxissomas, mitocôndria e duas no cloroplasto) que a tornam na enzima antioxidante mais abundante nas células vegetais (Noctor & Foyer, 1998; Jiménez *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Davey *et al.*, 2000), assim, as APXs e as restantes enzimas do ciclo ascorbato-glutationa podem estar envolvidas na eliminação do H_2O_2 produzido na mitocôndria e nos peroxissomas, impedindo a sua difusão para o citosol, como Hernández *et al.* (1993, 1995) e Gómez *et al.* (1999) demonstraram em condições de stresse salino. Embora a catalase seja considerada a principal enzima envolvida na remoção do peróxido de hidrogénio, a sua distribuição celular mais restrita em relação à da peroxidase do ascorbato, associado ao facto de ter menor afinidade para essa molécula oxidante do que a APX, fazem com que a peroxidase do ascorbato seja uma enzima muito eficiente no controlo da concentração de H_2O_2 presente nos organelos (Willekens *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 1998). Sendo assim, a maior afinidade para o H_2O_2 por parte das APXs, aliada à presença das enzimas do ciclo ascorbato-glutationa na mitocôndria e nos peroxissomas, vai permitir a

remoção do H_2O_2 que não foi eliminado pela actividade da catalase nesses locais (Noctor & Foyer, 1998; Dat *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2000; Foyer & Noctor, 2000).

Apesar da maioria das espécies activas de oxigénio serem extremamente reactivas e quando presentes em elevadas concentrações causarem a ruptura no funcionamento metabólico, a níveis moderados funcionam como moléculas sinal para a indução do sistema antioxidante, especialmente o H_2O_2 ; estudos realizados demonstram que o H_2O_2 está envolvido nas vias de transdução do sinal que conferem a tolerância a diversos factores de stresse, inclusivé ao sal (Alscher *et al.*, 1997; Foyer *et al.*, 1997; Noctor & Foyer, 1998; Ben-Hayyim *et al.*, 1999; Neill *et al.*, 1999 e referências; Polidoros & Scandalios, 1999; Dat *et al.*, 2000; Foyer & Noctor, 2000; Kuźniak & Urbanek, 2000 e referências).

1.3.4 – Mecanismos de tolerância à salinidade nas plantas

A tolerância à salinidade está relacionada não só com a adaptação à toxicidade pelos iões sódio e cloreto, mas também com a adaptação a outros efeitos da presença do sal, como o défice hídrico (Flowers *et al.*, 1977; Greenway & Munns, 1980). A tolerância à salinidade pode ser adquirida através da exclusão ou da inclusão do sal (Marschner, 1995); se a espécie vegetal se baseia na exclusão do sal, ela terá que desenvolver mecanismos para evitar o défice hídrico interno, se se baseia na inclusão do sal terá que mostrar elevada tolerância aos iões Na^+ e Cl^- ou desenvolver formas para impedir as elevadas concentrações internas destes elementos (Greenway & Munns, 1980; Binzel *et al.*, 1985). Nas halófitas, e também na beterraba, a tolerância ao sal é baseada principalmente na inclusão de iões inorgânicos e posterior utilização em diversas funções metabólicas, como na manutenção da turgescência ou na substituição do K^+ pelo Na^+ (Marschner, 1995); nas glicófitas, grupo que abrange a maioria das espécies cultivadas, a exclusão iónica é a estratégia predominante, ou seja, verifica-se uma relação inversa entre a absorção e a tolerância à salinidade (Greenway & Munns, 1980; Hernández *et al.*, 1993 e 1995; Alhagdow *et al.*, 1999; Maathuis & Amtmann, 1999; Schachtman & Liu, 1999). Estas diferenças entre as espécies vão-se repercutir no crescimento e no conteúdo e distribuição dos elementos iónicos na planta perante uma situação salina.

A tolerância ao sal requer um aumento na quantidade de solutos osmoticamente activos (Cheeseman, 1988; Bray *et al.*, 2000; Zhu, 2001); para tal, o ajustamento osmótico é geralmente conseguido através da acumulação nas células de uma diversidade de solutos, incluindo compostos orgânicos azotados (aminoácidos e betainas), açúcares, ácidos orgânicos,

e também iões inorgânicos. Os genótipos em que a exclusão do sal é o principal mecanismo de tolerância à salinidade, baseiam-se na acumulação de solutos orgânicos como os açúcares e aminoácidos, ou dos iões inorgânicos como o K^+ , o Ca^{2+} ou NO_3^- para evitar a perda de turgescência nas suas células; para esse efeito, a síntese dos solutos orgânicos ou a absorção dos elementos iónicos referidos terá que aumentar. A síntese de compostos orgânicos envolve maiores necessidades energéticas (maior consumo de fotoassimilados), logo o crescimento dessas plantas vai ser afectado negativamente por este facto em condições salinas (Greenway & Munns, 1980; Dracup, 1991; Marschner, 1995; Taiz & Zeiger, 1998); Sacher & Staples (1985) verificaram para o tomateiro, e Yang *et al.* (1990a) para o sorgo, que a maior acumulação de açúcares durante a exposição ao sal esteve associada com a diminuição no crescimento. Já nos genótipos em que a estratégia de adaptação reside na inclusão do sal, o ajustamento osmótico é realizado através da acumulação de sais nos tecidos da folha, como acontece com as halófitas que utilizam os iões inorgânicos na manutenção da turgescência, principalmente do Na^+ e do Cl^- , apesar de serem capazes de acumular outros iões (Flowers *et al.*, 1977; McNulty, 1985; Wang *et al.*, 1997; Bajji *et al.*, 1998).

A acumulação dos iões Na^+ e Cl^- durante o ajustamento osmótico ocorre fundamentalmente no interior dos vacúolos, onde estes são mantidos fora do contacto com as enzimas no citosol e com os organelos (Cheeseman, 1988; Taiz & Zeiger, 1998). Por outro lado, o vacúolo ocupa uma grande percentagem do volume celular numa folha adulta, cerca de 90 a 95%, daí que os iões necessários para o ajustamento osmótico estão localizados no seu interior, ou seja, a concentração neste compartimento está próxima daquela que pode ser estimada para o tecido como um todo (Flowers *et al.*, 1977). Numa linha celular não tolerante ao NaCl que cresceu na presença e na ausência do sal, Ben-Hayyim & Kochba (1983) observaram que o citoplasma ocupou grande parte do volume celular em ambas as situações, enquanto que na linha tolerante e na presença do NaCl o tamanho dos vacúolos aumentou de modo considerável; tal facto, reforça a função do vacúolo na acumulação dos sais e na manutenção da turgescência celular (Paris *et al.*, 1996) e confirma que as células vegetais estão estruturalmente adaptadas para a retenção iónica (Apse *et al.*, 1999).

Compreende-se assim que as halófitas e restantes espécies tolerantes possam crescer com elevado nível de salinidade na solução externa, e acumulem concentrações iónicas superiores do que nas plantas não tolerantes, pois elas baseiam-se na absorção dos iões que são posteriormente armazenados nos vacúolos (McNulty, 1985; Jolivet *et al.*, 1990; Bohnert *et al.*, 1995; Bolte *et al.*, 2000); no entanto, elas podem reduzir as elevadas concentrações de sais na folha através da sua secreção pelas glândulas salinas (Flowers *et al.*, 1977; Marschner, 1995;

Bajji *et al.*, 1998; Taiz & Zeiger, 1998; Blom-Zandstra, 2000), como documentado nos estudos de Marcum (1999) que verificou que o conteúdo foliar de Na^+ e de Cl^- foi baixo nas gramíneas halófitas devido à exclusão desses elementos pelas glândulas salinas.

A ideia generalizada sobre a maior sensibilidade das glicófitas a elevadas concentrações de Na^+ e de Cl^- do que as halófitas, é justificada com base na incapacidade da maioria delas em regular a absorção dos iões nas células com a compartimentação vacuolar desses elementos, ou então na impossibilidade de proceder à sua exclusão (Jolivet *et al.*, 1990; Niu *et al.*, 1995; Sabbah & Tal, 1995; Lovelli *et al.*, 2000). No entanto, diversos trabalhos em espécies não-halófitas demonstram que a osmoregulação pode ser realizada através da acumulação de sais nos vacúolos (Robinson *et al.*, 1983; Watad *et al.*, 1983; Binzel *et al.*, 1985; Binzel *et al.*, 1988; Plaut e Federman, 1991; Bethke & Drew, 1992). Por causa desta compartimentação iónica, outros solutos devem acumular-se no citoplasma para manter o equilíbrio osmótico da célula; estes solutos, chamados solutos compatíveis, são compostos orgânicos solúveis, osmoticamente activos, que não interferem com o metabolismo celular nem com a actividade enzimática, mesmo a elevadas concentrações (Greenway & Munns, 1980; McNulty, 1985; Bohnert *et al.*, 1995; Frommer *et al.*, 1999; Marcum, 1999; Bray *et al.*, 2000). A função destes solutos ultrapassa a sua acção no ajustamento osmótico, protegem as enzimas dos iões presentes no citoplasma e estabilizam as membranas celulares (Samaras *et al.*, 1995 e referências; Grillo *et al.*, 1996), para além de serem activos na eliminação das espécies activas de oxigénio, daí que a sua acumulação confira tolerância não apenas à salinidade, mas também a outros factores de stresse como por exemplo a secura e o frio, que também produzem espécies activas de oxigénio; esta actividade antioxidante sugere uma função para estes compostos na tolerância ao stresse osmótico (Bohnert *et al.*, 1995; Zhu, 2001).

A natureza química dos solutos compatíveis envolvidos na adaptação osmótica varia com as espécies vegetais. Entre os aminoácidos, a prolina é acumulada por um conjunto vasto de plantas, sendo por isso considerada um dos solutos compatíveis mais comuns, enquanto que a acumulação das betaínas, sobretudo da glicinabetaína, está confinada a um grupo mais restrito de plantas; os hidratos de carbono são os solutos que predominam, de um modo geral, nas glicófitas (Flowers *et al.*, 1977; Sacher & Staples, 1985; Somal & Yapa, 1998). A glicinabetaína é abundante em certas espécies halófitas que crescem em condições salinas, onde a sua concentração atinge valores citoplasmáticos elevados (Marcum, 1999), e de acordo com Marschner (1995), este soluto compatível não só protege a actividade das enzimas, como também reduz a exigência em K^+ para a activação enzimática; por sua vez, as não-halófitas acumulam-na a baixos níveis (Greenway & Munns, 1980; Bray *et al.*, 2000).

A acumulação de prolina é uma resposta bem conhecida à secura e à salinidade numa diversidade de espécies (Watad *et al.*, 1983; Yang *et al.*, 1990b; Mizoguchi *et al.*, 1996; Lazcano-Ferrat & Lovatt, 1997; Roosens *et al.*, 1999; Tsugane *et al.*, 1999); a sua acumulação no citosol durante a exposição ao stresse salino torna-a não só num soluto compatível (Roosens *et al.*, 1999), mas também numa reserva de azoto, protectora de enzimas e estruturas celulares dos efeitos da salinidade (van Swaaij *et al.*, 1986; Somal & Yapa, 1998; Okuma *et al.*, 2000), e com função antioxidante (Samaras *et al.*, 1995). O conteúdo de prolina livre é baixo nas plantas não expostas ao sal, mas a sua concentração aumenta nas folhas de forma linear com o aumento da concentração salina. Na literatura é referida a ocorrência desta resposta, nomeadamente em batateira (Levy *et al.*, 1988; Nadler & Heuer, 1995) e tomateiro (Hernandez *et al.*, 2000), nas plantas de cevada (Jolivet *et al.*, 1990), de *Vigna unguiculata* (Somal & Yapa, 1998) e de *Brassica* (Kwon *et al.*, 2000). A acumulação de prolina verifica-se não só nas folhas de plantas intactas, mas também nas culturas de células expostas a NaCl (Dracup, 1991); Watad *et al.* (1983) verificaram que uma linha celular tolerante ao NaCl acumulou mais prolina em todas as condições salinas testadas, sobretudo na salinidade mais elevada, o que não aconteceu na linha menos tolerante. Também na espécie *Nicotiana tabacum* L., Singh *et al.* (1985), e posteriormente LaRosa *et al.* (1991), observaram um aumento na quantidade de prolina nas células em cultura adaptadas ao NaCl, o que levou Singh *et al.* (1985) a sugerirem que a adaptação ao sal inibe a síntese das proteínas que contêm elevada proporção de prolina, ou então conduz à rápida decomposição dessas proteínas com o consequente aumento na disponibilidade deste aminoácido; no entanto, recentemente Okuma *et al.* (2000) verificaram que a biossíntese da prolina aumentou nas culturas de células em meio salino. O elevado teor em prolina registado nas linhas celulares tolerantes permitiu-lhes resistir à maior salinidade imposta, dado que a transferência dessas linhas celulares para o meio menos salino levou a prolina a baixar (Watad *et al.*, 1983; Singh *et al.*, 1985). Um estudo recente mostrou que a prolina fornecida pelo exterior melhorou o crescimento em condições salinas de uma linha celular de *Nicotiana tabacum* não adaptada ao NaCl, mas a presença do aminoácido não foi suficiente para tornar esta linha tolerante à salinidade (Okuma *et al.*, 2000).

Uma linha celular seleccionada para resistir ao sal é também capaz de tolerar o stresse hídrico, através da acumulação de mais prolina (Watad *et al.*, 1983); Binzel *et al.* (1985) confirmaram que as linhas celulares adaptadas ao sal exibiram maior tolerância ao stresse osmótico induzido pelo polietilenoglicol (PEG). Por sua vez, Leone *et al.* (1994a) verificaram que as culturas de células em suspensão de *Solanum tuberosum* adaptadas ao PEG mostraram ser

também tolerantes ao NaCl, e para os autores, a tolerância ao NaCl foi conferida pelo elevado conteúdo em prolina nestas células. Somal & Yapa (1998) demonstraram que as plantas com deficiências nutricionais acumulam mais prolina do que aquelas que recebem uma nutrição equilibrada, daí que a sua acumulação ultrapassa a função osmoprotectora que lhe é habitualmente conferida.

A acumulação de hidratos de carbono é fundamental para a tolerância à salinidade de diversas espécies glicófitas (Sacher & Staples, 1985; Yang *et al.*, 1990a; Khavari-Nejad & Mostofi, 1998), pelo seu contributo para a osmoregulação (Flowers *et al.*, 1977), para a protecção de organelos celulares (Greenway & Munns, 1980), para a manutenção das estruturas membranares e actividade de várias enzimas (Kerepesi & Galiba, 2000). Segundo Bohnert *et al.* (1995), os polióis como o mio-inositol, glicerol e manitol podem também actuar como solutos compatíveis, dado que a sua acumulação conduz à osmoregulação e à estabilização de proteínas e estruturas membranares, propriedades que são partilhadas por outros solutos compatíveis como a sacarose ou a prolina.

A homeostasia iónica é um requisito fundamental para as plantas crescerem em ambientes salinos (Bohnert *et al.*, 1995; Zhu, 2001), e Niu *et al.* (1995) definiram homeostasia iónica como a tendência da célula para manter uma condição interna estável, mesmo em resposta a qualquer perturbação ou estímulo ambiental que perturbe a normalidade. Os mecanismos celulares que regulam a homeostasia iónica enquanto decorre o ajustamento osmótico parecem ser comuns a todos os genótipos e são necessários para a tolerância ao sal (Bressan *et al.*, 1998; Apse *et al.*, 1999). Quando as células são expostas ao NaCl, a cinética no transporte do Na^+ e do Cl^- , e também dos iões K^+ e Ca^{2+} , é alterada, logo, a célula terá que restabelecer o equilíbrio iónico para o funcionamento metabólico (Binzel *et al.*, 1988). Para tal, os processos de transporte que regulam o influxo e o efluxo iónico na membrana plasmática e no tonoplasto, particularmente aqueles envolvidos no controlo do influxo do Na^+ e na compartimentação vacuolar, são muito importantes para a adaptação à salinidade (Cheeseman, 1988; Garbarino & Dupont, 1988; Watad *et al.*, 1991). As células expostas a elevadas concentrações de NaCl tendem a acumular Na^+ , já que é inevitável o influxo passivo de Na^+ para o citoplasma (Schachtman & Liu, 1999; White, 1999), no entanto, a acumulação do Na^+ no citoplasma pode ser impedida através da exclusão do catião para o apoplasto e para o vacúolo, via o sistema antiporte Na^+/H^+ presente na membrana plasmática e no tonoplasto, respectivamente (Barkla *et al.*, 1995; Bohnert *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1997; Apse *et al.*, 1999; Frommer *et al.*, 1999).

A actividade do antiporte Na^+/H^+ , sobretudo no tonoplasto, é induzida pelo tratamento salino (Niu *et al.*, 1995; Maathuis & Amtmann, 1999), e foi sugerido uma função para o transportador na adaptação das plantas ao NaCl (Apse *et al.*, 1999; Allakhverdiev *et al.*, 2000). Com efeito, Garbarino & Dupont (1988) detectaram a presença do antiporte Na^+/H^+ no tonoplasto das raízes de cevada, no entanto, a actividade do transportador foi observada apenas nas raízes que cresceram em NaCl. Nas células do mesófilo foliar em *Mesembryanthemum crystallinum*, Barkla *et al.* (1995) verificaram a existência do antiporte Na^+/H^+ , mas a actividade deste transportador foi evidente nas plantas expostas ao sal. A presença do transportador no tonoplasto das plantas indica que o antiporte Na^+/H^+ é constitutivamente expresso, mas a sua actividade é induzida pelo NaCl.

Tal como para o sódio, a compartimentação vacuolar do cloreto é essencial para a tolerância ao NaCl (Frommer *et al.*, 1999). Pouco é conhecido sobre o influxo e compartimentação vacuolar do Cl^- , admitindo-se que é realizado através de um simporte Cl^-/H^+ , embora haja a possibilidade do Cl^- entrar passivamente através de qualquer canal aniónico na membrana plasmática (Niu *et al.*, 1995; Sanders & Bethke, 2000); a entrada do anião no vacúolo pode ocorrer via antiporte Cl^-/H^+ , ou como alternativa através dos canais aniónicos no tonoplasto (Niu *et al.*, 1995; Apse *et al.*, 1999).

A compartimentação do Na^+ no vacúolo vai contribuir para a manutenção de uma razão K^+/Na^+ relativamente elevada no citoplasma, fundamental para a adaptação das células a ambientes salinos (Greenway & Munns, 1980; Garbarino & Dupont, 1988; Barkla *et al.*, 1995; White, 1999), no entanto, essa razão depende não só da acção conjunta dos sistemas de transporte localizados nas membranas plasmática e vacuolar (Maathuis & Amtmann, 1999; Schachtman & Liu, 1999), mas também da maior selectividade para o K^+ em detrimento do Na^+ por parte dos transportadores na membrana plasmática, tal como Watad *et al.* (1983, 1991) demonstraram em duas linhas celulares de tabaco com diferente resistência ao NaCl. Vários autores defendem que o cálcio é fundamental para essa selectividade, para além do seu efeito na redução do influxo de Na^+ para a célula, que contribui para estabelecer uma elevada razão K^+/Na^+ citoplasmática (Hawkins & Lips, 1997; Kinraide, 1999; Maathuis & Amtmann, 1999; Schachtman & Liu, 1999; Tsugane *et al.*, 1999; Sanders & Bethke, 2000). Por outro lado, a exposição ao NaCl causa um aumento no Ca^{2+} citosólico, que provavelmente actua como um sinal do stresse salino (Niu *et al.*, 1995; Bressan *et al.*, 1998; Taiz & Zeiger, 1998; Knight & Knight, 1999; Tsugane *et al.*, 1999; Kiegle *et al.*, 2000; Zhu, 2001). Diversas evidências levam a sugerir a função do Ca^{2+} como um mensageiro secundário na transdução do sinal que regula a expressão dos genes envolvidos na homeostasia iónica em ambientes

salinos, o cálcio é assim um mediador na adaptação ao sal (Bressan *et al.*, 1998; Maathuis & Amtmann, 1999; Kiegle *et al.*, 2000; Sanders & Bethke, 2000; Zhu, 2001).

As mudanças no metabolismo e no desenvolvimento das plantas em resposta ao stresse salino podem ser atribuídas a alterações nos padrões de expressão genética (Cheeseman, 1988; Winicov, 1993; Leone *et al.*, 1994b; Moons *et al.*, 1997; Kasuga *et al.*, 1999; Bolte *et al.*, 2000). O stresse salino modifica a regulação da expressão genética, de tal modo, que alguns genes são expressos mais intensamente, enquanto que outros são menos, podendo mesmo ser reprimidos, o que se traduz no aumento dos níveis de algumas proteínas e na diminuição de outras (Singh *et al.*, 1985; Hurkman & Tanaka, 1987; Ramagopal, 1987; Hurkman *et al.*, 1989; Winicov, 1993), ou então na inibição da síntese de algumas proteínas constitutivas; no entanto, pode ocorrer a expressão de certos genes e o consequente aparecimento de novas proteínas, referidas como as 'proteínas de stresse' (Ericson & Alfinito, 1984; Singh *et al.*, 1985; Ramagopal, 1987; Leone *et al.*, 1994b; Pruvot *et al.*, 1996). Este aspecto revela que no genoma das plantas há genes que não são normalmente expressos na ausência do stresse, mas quando activados são capazes de conferir a tolerância às plantas em situação adversa (Leone *et al.*, 1994a). As funções das referidas proteínas no processo de adaptação e dos mecanismos que regulam a sua síntese são alvo da pesquisa recente (Winicov, 1998; Taiz & Zeiger, 1998), embora Singh *et al.* (1985) considerem que a maioria dessas proteínas aparece como uma resposta imediata da célula ao ambiente alterado, ou em consequência de danos celulares, e poucas estão associadas com a adaptação das células ao novo ambiente. No entanto, Leone *et al.* (1994b) verificaram que os polipeptídeos que aparecem nas células de *Solanum tuberosum* adaptadas ao stresse hídrico de forma gradual e prolongada são diferentes daqueles que são observados nas células expostas ao factor de stresse sem qualquer adaptação prévia.

A variação observada para a tolerância salina entre genótipos relacionados provavelmente assenta em diferenças no padrão proteico (Bohnert *et al.*, 1995; Bohnert & Jensen, 1996); Ramagopal (1987) verificou que a salinidade induziu mudanças no padrão proteico de dois genótipos de cevada com diferente tolerância ao sal, mas as diferenças entre as cultivares consistiram nas proteínas que foram induzidas *de novo*. Por sua vez, Hurkman *et al.* (1989) mostraram que a exposição ao NaCl de dois genótipos de cevada com diferente resistência ao sal resultou em padrões electroforéticos que divergiram na intensidade das bandas polipeptídicas, mas que foram qualitativamente idênticos. Embora a síntese *de novo* de certas proteínas esteja normalmente associada à capacidade das plantas para crescerem em ambientes salinos, estudos realizados por Hurkman & Tanaka (1987) mostravam que surgiam apenas alterações quantitativas no padrão electroforético das proteínas extraídas da zona

radicular em condições salinas, com destaque para um conjunto de duas bandas polipeptídicas, que apareceu com uma marcação mais forte na concentração salina mais elevada e que diminuiu após transferência das plantas para meio com ausência de NaCl; para os autores, a maior expressão dos genes para estas proteínas poderá estar envolvida na adaptação das raízes ao NaCl.

A resistência exibida pelas linhas celulares de *Nicotiana tabacum* seleccionadas para crescer em elevadas concentrações salinas assenta fundamentalmente numa base genética (Singh *et al.*, 1985). As diferenças mais significativas entre os padrões proteicos em SDS-PAGE de duas linhas celulares a crescer em NaCl, uma adaptada ao sal e a outra não adaptada, foi a existência de duas bandas polipeptídicas mais realçadas na linha adaptada ao sal, e de uma nova banda que foi única nesta linha e que permaneceu inalterada no gel proteico quando esta cresceu em meio sem sal (Ericson & Alfinito, 1984). Essa banda polipeptídica com massa molecular de 26 kDa foi também detectada por Singh *et al.* (1985) no padrão electroforético de uma linha celular adaptada para crescer a 428mM NaCl, onde ela se apresenta intensamente corada. Singh *et al.* (1985) estimaram que o polipeptídeo 26 kDa contribui em cerca de 10% para a proteína total da linha celular adaptada, daí admitirem que ele poderá estar associado com a adaptação das células à elevada salinidade. Singh *et al.* (1987) designaram o polipeptídeo 26 kDa por osmotina, porque a sua síntese coincide com o ajustamento osmótico nas células em cultura de *Nicotiana tabacum* (Binzel *et al.*, 1985) e é acumulado pela linha celular adaptada ao sal. A osmotina é uma proteína que apresenta pelo menos duas isoformas nas culturas de células de tabaco, e mostra ter uma grande homologia com a taumatina, quer na sequência de aminoácidos quer na elevada proporção de prolina; a osmotina está localizada no vacúolo, embora seja também detectada no citoplasma de uma forma dispersa, o que leva a supor que poderá estar envolvida no ajustamento osmótico (Singh *et al.*, 1987). Apesar da osmotina estar envolvida na adaptação das células em cultura a condições salinas, ela foi também detectada em culturas de células de *Solanum tuberosum* adaptadas ao polietilenoglicol, bem como nas culturas de células que foram expostas a elevada concentração deste agente osmótico sem prévia adaptação (Leone *et al.*, 1994a,b), contrariamente ao observado por Singh *et al.* (1989) em culturas de células da planta de tabaco submetidas a choque salino, nas quais não foi detectada acumulação dos transcritos desta proteína. A osmotina é também referida como uma proteína relacionada com a patogénese por fungos, dado acumular-se após a infecção do agente patogénico e mostrar uma actividade anti-fúngica (Bray *et al.*, 2000).

Em plantas de *Solanum tuberosum* sujeitas a condições de secura duas novas proteínas de 32 e 34 kDa foram identificadas nos cloroplastos, designadas por CDSP 32 e CDSP 34, respectivamente ('chloroplastic drought-induced stress protein') (Pruvot *et al.*, 1996); enquanto que a primeira é acumulada no estroma e provavelmente está envolvida na osmoregulação desta estrutura (Eymery & Rey, 1999), a segunda está associada à lamela dos tilacóides, daí que ela possa ter uma função na integridade dos tilacóides durante a desidratação (Gillet *et al.*, 1998; Eymery & Rey, 1999). Por outro lado, a CDSP 32 é também induzida pelo stresse oxidativo e protege as estruturas dos cloroplastos contra os efeitos tóxicos das espécies activas de oxigénio (Broin *et al.*, 2000). Atendendo a que a salinidade provoca na planta uma situação de défice de água idêntica ao stresse hídrico, e gera também a indução de stresse oxidativo (Gossett *et al.*, 1994a; Hernández *et al.*, 1999; Hoshida *et al.*, 2000; Zhu, 2001), é possível encontrar essas proteínas nas plantas de *Solanum tuberosum* expostas ao sal; de facto, Pruvot *et al.* (1996) observaram a acumulação das proteínas CDSP 32 e CDSP 34 nas plantas sujeitas ao tratamento salino, no entanto, a CDSP 32 foi mais abundante na maior concentração salina das duas que foram testadas (150 e 300mM) por estes autores.

O ácido abscísico é conhecido por regular o crescimento e o desenvolvimento das plantas, nomeadamente durante a resposta aos factores de stresse que envolvem a perda de água (Chandler & Robertson, 1994). Perante a menor disponibilidade de água, as plantas desenvolveram formas de adaptação nas quais o ABA parece desempenhar uma importante função (LaRosa *et al.*, 1985; Moons *et al.*, 1997). A acção do ABA envolve alterações na expressão genética, e a expressão de diversos genes, conhecidos por *rab* ('ABA-responsive genes'), é regulada pelo aumento no conteúdo endógeno do regulador (Skriver & Mundy, 1990; Winicov, 1993). Diversos estudos descrevem os genes que são regulados pelo ABA e que são também expressos nas plantas sob stresse osmótico (Chandler & Robertson, 1994 e referências); por exemplo, a expressão dos genes que codificam a MnSOD no milho e em células de tabaco foi induzida pelo ABA e pelo stresse osmótico (Zhu & Scandalios, 1994; Bueno *et al.*, 1998).

Atendendo a que o teor em ABA aumenta nos tecidos sujeitos ao stresse osmótico induzido pelo NaCl (Zhao *et al.*, 1991; Bohnert *et al.*, 1995; Pruvot *et al.*, 1996; Moons *et al.*, 1997; Winicov, 1998), a aplicação externa desta fito-hormona poderá levar à síntese de proteínas que são também induzidas em resposta ao stresse osmótico (Skriver & Mundy, 1990). De facto, a aplicação exógena de ABA aumentou a síntese da CDSP 34, apesar da sua acumulação ter sido inferior à observada na situação de secura (Pruvot *et al.*, 1996; Gillet *et*

al., 1998), enquanto que o ABA exógeno não teve qualquer efeito na síntese da proteína CDSP 32 (Pruvot *et al.*, 1996). A síntese da osmotina é regulada pelo ácido abscísico, contudo, o ABA exógeno induz a sua transcrição mas não a acumulação da proteína, verificando-se que as células acumulam-na quando adaptadas ao NaCl (Singh *et al.*, 1989). Segundo Chandler & Robertson (1994), a expressão genética induzida pelo ABA pode ser complementada por factores de stresse presentes apenas nas plantas em situação adversa. No entanto, em células de tabaco não adaptadas ao sal e postas a crescer em NaCl a tolerância à salinidade foi alcançada mais cedo na presença do ABA do que na sua ausência, e este não teve qualquer efeito sobre as células já adaptadas (LaRosa *et al.*, 1985). Para Leone *et al.* (1994a,b), o ABA está principalmente envolvido na resposta rápida ao stresse do que na adaptação de forma gradual.

As plantas em contacto com a salinidade estão expostas não só à toxicidade por certos elementos iónicos e ao stresse osmótico, mas também às espécies activas de oxigénio geradas em consequência desses efeitos (Hernández *et al.*, 1993; Gossett *et al.*, 1994a; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Bueno *et al.*, 1998; Meneguzzo *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 1999; Savouré *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2000; Zhu, 2001). Diversos estudos mostram que o stresse salino aumenta a quantidade e a actividade das enzimas envolvidas na remoção das espécies activas de oxigénio e mostram também que o sistema antioxidante enzimático é um componente determinante na tolerância ao sal. A maior tolerância ao sal por parte de certas cultivares de algodão em relação a outras menos tolerantes foi explicada por Gossett *et al.* (1994a) com base na maior actividade constitutiva da catalase nas folhas, e na maior actividade da peroxidase total e da glutathione redutase induzida pelo sal, sugerindo que as cultivares mais tolerantes tiveram maior capacidade para remover as espécies activas de oxigénio, de tal modo, que a peroxidação lipídica foi mais reduzida. Em ervilheiras tolerantes ao NaCl, o aumento na formação de O_2^- e de H_2O_2 na mitocôndria e nos cloroplastos em consequência do tratamento salino, levou à maior actividade das enzimas antioxidantes nesses organelos, sobretudo da MnSOD e da Cu/ZnSOD, e também da APX, enquanto que a actividade da Cu/ZnSOD citosólica não foi afectada; estes resultados não foram observados nas plantas mais sensíveis, daí que a indução da actividade antioxidante ao nível dos organelos foi determinante para a tolerância da ervilheira ao NaCl, demonstrada através da menor peroxidação lipídica verificada nas estruturas membranares das plantas tolerantes (Hernández *et al.*, 1993, 1995). Quando as ervilheiras mais tolerantes foram sujeitas de forma prolongada a condições de elevada salinidade, o maior teor de H_2O_2 resultante da maior actividade das SODs cloroplastidial e citosólica, foi eliminado pela maior actividade da

peroxidase do ascorbato e das restantes enzimas do ciclo ascorbato-glutationa (Gómez *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 1999, 2000). A exposição ao sal de plantas de arroz também não levou à acumulação de H_2O_2 , nem aumentou a peroxidação lipídica, devido à maior actividade das enzimas do ciclo ascorbato-glutationa nas folhas (Lin & Kao, 2000). A tolerância ao NaCl das plantas mutantes *pst* ('photoautotrophic salt tolerance') isoladas por Tsugane *et al.* (1999) esteve associada com a maior actividade da SOD e da peroxidase do ascorbato em relação às plantas do tipo selvagem, daí que a mutação *pst* aumentou a tolerância ao sal através do aumento na actividade antioxidante. Segundo Ben-Hayyim *et al.* (1999), a indução da actividade das enzimas antioxidantes pelo stresse salino significa que elas têm uma função específica na resistência ao stresse oxidativo, por outro lado, quando se verifica a inibição da actividade dessas enzimas é um indício que a planta e/ou tecido está sob um intenso stresse oxidativo e a actividade metabólica encontra-se numa situação crítica.

Para Smith & McComb (1981), a tolerância ao sal observada na planta inteira é também revelada nas culturas de tecido caloso e os mecanismos que contribuem para a tolerância ao NaCl ao nível celular envolvem também a indução da actividade das enzimas antioxidantes. De facto, Gossett *et al.* (1994b) demonstraram que existe uma relação próxima entre a actividade antioxidante e a possibilidade do tecido caloso tolerante ao sal crescer em meio com 150 mM NaCl; com efeito, a maior actividade das enzimas antioxidantes no tecido tolerante conferiu-lhe a capacidade para eliminar o superóxido e para decompor o H_2O_2 , enquanto que a actividade destas enzimas não foi afectada pela exposição do tecido caloso sensível a concentrações de 75 ou 150mM NaCl. As actividades da SOD, catalase, peroxidase do ascorbato e glutathione redutase também aumentaram no tecido caloso de tomateiro adaptado a 50 mM NaCl, assim o tecido ficou protegido dos danos gerados pelas espécies activas de oxigénio, nomeadamente da peroxidação lipídica (Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999). Nas linhas celulares de citrinos tolerante e sensível ao NaCl, apenas a actividade da Cu/ZnSOD citosólica aumentou em consequência do tratamento salino, no entanto, a maior actividade constitutiva da peroxidase do ascorbato na linha celular tolerante foi determinante para a tolerância ao sal (Gueta-Dahan *et al.*, 1997), tal como Gossett *et al.* (1994a) verificaram para a catalase no algodoeiro. A adaptação de uma linha celular de algodoeiro a elevada salinidade foi também acompanhada pelo aumento na actividade antioxidante, nomeadamente pela maior actividade da catalase e peroxidase total, bem como das enzimas do ciclo ascorbato-glutationa. A maior actividade antioxidante revelada por esta linha celular, que permaneceu constitutivamente elevada após a remoção do stresse salino, justificou a sua aparente tolerância cruzada ao paraquato (Gossett *et al.*, 1996); assim, as células que são

previamente expostas a um factor de stresse que envolve stresse oxidativo adquirem tolerância cruzada a um outro factor (Taiz & Zeiger, 1998), o que leva a admitir que existe um mecanismo comum para a resistência às espécies activas de oxigénio (Alscher *et al.*, 1997).

A resposta da planta ao stresse oxidativo induzido pela salinidade envolve não só a activação das enzimas antioxidantes, mas também o sistema antioxidante não-enzimático através de compostos de baixo peso molecular, como o ascorbato e a glutathione. Gossett *et al.* (1994a) detectaram que em resposta ao tratamento salino a concentração do α -tocoferol foi superior nas plantas tolerantes ao sal do que nas mais sensíveis, e foi também evidente o maior teor de ascorbato e de glutathione nas primeiras; segundo os autores, o maior conteúdo nos antioxidantes justifica a menor peroxidação lipídica verificada nas plantas mais tolerantes. Do mesmo modo que foi verificado nos estudos com a planta intacta, o maior teor em ascorbato e glutathione foi observado nas culturas de tecido caloso tolerante a 150mM NaCl, enquanto que no tecido controlo as concentrações destes antioxidantes foram muito baixas, o que significa que a tolerância do tecido a elevados níveis de sal se deve à presença de um ciclo ascorbato-glutathione activo (Gossett *et al.*, 1996). Para Gossett *et al.* (1994a, 1996), a possibilidade das culturas de tecido caloso e da planta para crescerem em condições de elevada salinidade vai depender da sua capacidade para regular o ciclo ascorbato-glutathione.

A presença das espécies activas de oxigénio nos cloroplastos em resultado do tratamento salino, levou também as ervilheiras a acumularem mais ascorbato e glutathione nos cloroplastos, apesar deste aumento ser apenas observado nas mais tolerantes ao sal, já que nas menos tolerantes aumentou a oxidação e o consequente decréscimo na quantidade dos dois antioxidantes (Hernández *et al.*, 1995). Nas plantas tolerantes, a elevada actividade da peroxidase do ascorbato foi acompanhada pela maior regeneração do ascorbato através do aumento na actividade das enzimas do ciclo ascorbato-glutathione (Hernández *et al.*, 2000). Entre as enzimas deste ciclo, Hernández *et al.* (1999) salientaram que a actividade da glutathione redutase é fundamental para manter a glutathione na forma reduzida e, portanto, na adaptação das plantas ao sal; a importância da manutenção da glutathione na forma reduzida para o crescimento em sal de linhas celulares tolerantes ao NaCl foi também referido por Gossett *et al.* (1996).

A exposição ao NaCl levou as plantas de *Nicotiana plumbaginifolia* a acumularem o ascorbato e a glutathione na forma oxidada, sugerindo a sua incapacidade para regenerar estes antioxidantes através do ciclo ascorbato-glutathione; no entanto, a elevada acumulação de prolina nestas plantas, demonstra que o aminoácido pode também funcionar como antioxidante nas células vegetais (Savouré *et al.*, 1999).

O conhecimento sobre os mecanismos bioquímicos e moleculares que conferem a tolerância à salinidade em espécies halófitas e glicófitas é fundamental para melhorar a adaptação das espécies cultivadas à salinidade através da manipulação genética (Epstein *et al.*, 1980; Bohnert *et al.*, 1995; Bohnert & Jensen, 1996; Lin *et al.*, 1997; Winicov, 1998; Apse *et al.*, 1999; Frommer *et al.*, 1999; Bray *et al.*, 2000). Epstein *et al.* (1980), e posteriormente Subbarao *et al.* (1990), defenderam a exploração da variabilidade genética existente nas espécies para o melhoramento da tolerância ao sal; recentemente, Holmberg & Bülow (1998) referiram que a forma para conseguir plantas adaptadas ao stresse salino envolve a transferência dos genes que interferem na tolerância ao sal, por exemplo, os genes que codificam as enzimas que intervêm na biossíntese de solutos compatíveis como a prolina, ou as enzimas do sistema antioxidante, para uma planta onde eles são sobre-expressos em condições salinas. Contudo, a tolerância à salinidade é determinada por um conjunto vasto de genes e as plantas já transformadas expressam apenas um gene que não é suficiente para as tornar mais tolerantes ao stresse salino; será então necessário produzir plantas transgênicas que expressem vários genes no sentido de adquirir, de facto, a tolerância (Bohnert & Jensen, 1996; Mizoguchi *et al.*, 1996; Hilal *et al.*, 1998; Tsugane *et al.*, 1999; Hoshida *et al.*, 2000; Zhu, 2001). A melhor estratégia para esse objectivo pode ser conseguida através da introdução de vários genes na planta (Bar-Zvi & Gilad, 1999), ou através da manipulação de um ou mais factores de transcrição que regulam os genes determinantes para a tolerância ao sal (Winicov, 1998), como Kasuga *et al.* (1999) demonstraram para a *Arabidopsis thaliana*. Como alternativa à transformação das plantas, Winicov (1993, 1998) propôs a selecção de linhas celulares tolerantes ao sal em culturas *in vitro*, seguida pela regeneração de plantas tolerantes ao sal.

1.3.5 – Tolerância da batateira à salinidade

A batateira (*Solanum tuberosum* L.) foi considerada durante muito tempo como uma cultura moderadamente sensível ao sal (Maas e Hoffman, 1977), e mais recentemente, ela foi referida possuir uma tolerância moderada à salinidade (Shannon & Grieve, 1999; Katerji *et al.*, 2000). O crescimento na maioria das cultivares de batateira é adversamente afectado pela elevada salinidade e a produção de tubérculos é reduzida (Levy *et al.*, 1988; Naik & Widholm, 1993; Sabbah & Tal, 1995; Zhang & Donnelly, 1997), no entanto, a salinidade moderada reduz a produção de tubérculos com calibres que não são comercializáveis e aumenta a percentagem de matéria seca no caule e tubérculos (Levy *et al.*, 1993; Nadler & Heuer, 1995). A

sensibilidade das plantas de batateira à salinidade varia com a fase de desenvolvimento (Shannon & Grieve, 1999), ela é maior durante a fase de abrolhamento dos tubérculos, de tal modo, que a salinidade atrasa a emergência caulinar e o desenvolvimento da raiz e caule para a maioria das cultivares (Levy *et al.*, 1993).

A avaliação da tolerância da batateira à salinidade tem sido feita sobretudo em ensaios de campo, com base ou na produção de tubérculos (Levy *et al.*, 1988; Nadler & Heuer, 1995), ou no crescimento analisados em condições salinas (Naik & Widholm, 1993); devido às dificuldades nos estudos de campo para avaliar correctamente a tolerância ao sal, as técnicas de cultura *in vitro* foram propostas por Naik & Widholm (1993) como a alternativa para realizar esse tipo de estudos. No entanto, para a sua utilização como modelo experimental é necessário que a tolerância salina revelada pela planta se verifique também ao nível das culturas de células ou ao nível dos órgãos destacados (Smith & McComb, 1981). Nesta perspectiva, Naik & Widholm (1993) verificaram que a tolerância ao NaCl observada nas cultivares testadas não foi correspondida nas células em suspensão delas derivadas, apenas as culturas de raízes mostraram um comportamento semelhante ao do das plantas intactas. Sabbah & Tal (1995) compararam a batateira cultivada *Solanum tuberosum* e a espécie selvagem *Solanum kurzianum* em relação à tolerância ao sal, e as plantas do tipo selvagem foram mais tolerantes ao sal do que as da espécie cultivada, dado que o crescimento das primeiras foi menos reduzido pela salinidade; contudo, ao contrário do que seria esperado, o tecido caloso obtido a partir das plantas do tipo selvagem não foi mais tolerante à salinidade do que o da espécie cultivada. Também Hawkins & Lips (1997) verificaram que a diferença no comportamento das cultivares Désirée e Alpha em condições salinas não foi observada nas culturas de células provenientes de ambos os génotipos.

No sentido de avaliar em condições *in vitro* a tolerância ao sal dos génotipos de batateira, Zhang & Donnelly (1997) utilizaram culturas a partir de diferentes tipos de explante em situações salinas e compararam o comportamento destas com o das plantas no campo, de modo a identificarem o sistema de culturas mais apropriado para os estudos de tolerância ao sal na batateira; de entre as culturas de segmentos caulinares com um nó, extremidades radiculares e microtubérculos, as culturas de segmentos caulinares foram recomendadas para a caracterização *in vitro* da tolerância à salinidade na batateira.

A utilização das culturas de tecidos de batateira como a estratégia alternativa para a obtenção de plantas mais resistentes ao sal através da selecção de linhas celulares tolerantes ao sal deveria ser explorado (Naik & Widholm, 1993), atendendo a que o melhoramento da batateira pelos métodos tradicionais é lento e imprevisível (Bajaj, 1987). Smith & McComb (1981) já

havia referido a possibilidade de usar as culturas de tecidos no melhoramento de plantas, sobretudo para a produção de plantas tolerantes ao sal, através da selecção de células ou culturas de tecido caloso tolerantes ao sal e a regeneração posterior de plantas a partir destas. Apesar de diversos autores terem seleccionado linhas celulares tolerantes ao NaCl em batateira (van Swaaij *et al.*, 1986; Sabbah & Tal, 1990), não foram regeneradas plantas tolerantes ao sal a partir dessas linhas, e assim não foi possível identificar o fenómeno, epigenético ou genético, subjacente à tolerância adquirida por essas linhas celulares; de acordo com Ochatt *et al.* (1999), a forma mais segura para distinguir os variantes somaclonais dos clones fisiologicamente adaptados, no contexto da tolerância ao sal, assenta na regeneração de somaclones resistentes ao sal, e os clones regenerados vão permitir identificar os genes responsáveis pela tolerância salina adquirida ao nível da planta inteira (Winicov, 1993). Nesta perspectiva, Ochatt *et al.* (1999) seleccionaram uma linha celular de batateira tolerante ao sal da cultivar Kennebec, capaz de crescer em meio com 60mM até 450mM de NaCl, e as plantas posteriormente regeneradas dessa linha adaptada a 150mM NaCl mostraram ser também tolerantes ao stresse salino, através do maior crescimento e da maior produção de tubérculos quando expostas ao NaCl. No entanto, estas plantas diferiram não só fenotipicamente das plantas controlo, na forma da folha e do tubérculo, na cor da pele (epiderme) e da polpa do tubérculo, como genotipicamente; a análise genotípica das plantas regeneradas confirmou que elas foram variantes somaclonais. De salientar neste estudo, que a regeneração de plantas através da organogénese ocorreu em concentrações até 120mM NaCl, e através da embriogénese para concentrações superiores.

1.3.6 – Os sistemas *in vitro* como modelo para os estudos de salinidade

As técnicas de culturas *in vitro* têm sido usadas particularmente em estudos relacionados com os mecanismos de tolerância à salinidade ao nível da célula vegetal (Lutts *et al.*, 1999). As culturas de tecido caloso ou de células em suspensão podem ser consideradas uma forma simplificada dos mecanismos complexos que estão envolvidos na resposta da planta à salinidade (Leone *et al.*, 1994b); por outro lado, essas culturas representam um sistema experimental homogéneo e facilmente controlável, que possibilita estudar os processos fisiológicos e bioquímicos que contribuem para a tolerância à salinidade ao nível celular, sem as interferências dos diferentes tecidos vegetais e da fase de desenvolvimento (Smith & McComb, 1981; Ben-Hayyim & Kochba, 1983; Watad *et al.*, 1983; Ben-Hayyim *et al.*, 1985; Binzel *et al.*, 1985; Rains *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 1990b; Hawkins & Lips, 1997). Em

estudos com plantas é difícil separar os mecanismos celulares de tolerância daqueles que são baseados em estruturas anatómicas ou que requerem a organização e especialização de células e de tecidos que existem na planta intacta, mas através das culturas *in vitro* essa dificuldade é reduzida e é possível investigar ao nível celular os mecanismos da tolerância ao sal (Rains *et al.*, 1986; Binzel *et al.*, 1988; Rus *et al.*, 1999). A substituição das plantas pelas culturas *in vitro* nos estudos de tolerância salina permite não só poupar espaço e tempo de pesquisa, como pode ter particular importância quando se pretende modificar geneticamente a planta (Santos, 1997).

As respostas das células expostas ao sal são as mesmas que algumas das observadas ao nível da planta (Leone *et al.*, 1994a); a diminuição no crescimento é uma característica comum nas plantas e nas culturas de células em condições salinas (Ericson & Alfinito, 1984; Binzel *et al.*, 1985; Leone *et al.*, 1994a), a redução no tamanho das células nas folhas sujeitas ao sal (Neumann *et al.*, 1988; Shannon & Grieve, 1999) é também observada nas células em suspensão (Binzel *et al.*, 1985, 1988). Assim, as culturas de tecidos podem funcionar como modelo experimental para os mecanismos ligados com a tolerância à salinidade, embora as interações celulares e a organização das células no tecido não sejam consideradas (Rains *et al.*, 1986; Leone *et al.*, 1994a), e apresentam-se como a forma disponível para conhecer os processos que funcionam ao nível celular na tolerância ao sal da planta inteira (Yang *et al.*, 1990b). Contudo, para Dracup (1991) a substituição das plantas pelas culturas *in vitro* nos estudos de tolerância à salinidade implica que haja uma correspondência entre os graus de tolerância de ambos os níveis de organização; logo, é fundamental que a relação da tolerância ao sal das células cultivadas e da planta intacta seja estudada, dado que a integridade funcional da planta é essencial para a sua resistência à salinidade, e os mecanismos de tolerância ao sal envolvidos na planta intacta podem ser muito diferentes daqueles que actuam ao nível da célula (Lutts *et al.*, 1999). Diversos estudos sobre a relação entre a tolerância ao sal na planta intacta e nas culturas de tecidos correspondentes têm sido realizados com diferentes espécies, e nalguns casos não foi observada qualquer relação entre as respostas das culturas de tecido caloso e as da planta à salinidade; por exemplo, as plantas de *Phaseolus vulgaris* e da halófita *Suaeda australis* que apresentam uma resposta muito diferente em situações salinas, tiveram um crescimento idêntico em condições *in vitro*; o comportamento diferente que a halófita mostrou ter nas culturas de tecido caloso indica que a sua tolerância ao sal depende da integridade anatómica e fisiológica de toda a planta (Smith & McComb, 1981). Também os estudos realizados em batateira demonstraram que a tolerância ao sal por parte das plantas intactas nem sempre se verificou nas culturas de células (Naik & Widholm,

1993; Sabbah & Tal, 1995; Hawkins & Lips, 1997). Hernandez *et al.* (2000) testaram diferentes tipos de explantes com o objectivo de estabelecer o modelo de culturas mais apropriado para os estudos de salinidade e que mais se aproxima com a organização da planta, e verificaram que os explantes usados não mostraram a mesma resposta que a planta após o tratamento salino. No entanto, estudos comparativos da resposta de plantas e tecidos *in vitro* em situação salina que demonstram o contrário foram também realizados; as culturas de tecido caloso de *Beta vulgaris* resistiram aos níveis de salinidade que foram aplicados à planta, daí que a resistência ao sal nesta espécie parece depender inteiramente dos mecanismos de tolerância que ocorrem ao nível celular (Smith & McComb, 1981); as diferenças varietais na tolerância ao sal detectadas nos estudos com a planta de *Gossypium hirsutum* L. manifestaram-se também nas culturas de tecido caloso, o que reforça a hipótese da tolerância ao sal na planta intacta ser determinada pelos mecanismos que actuam na célula vegetal (Gossett *et al.*, 1994b). As respostas em termos de crescimento das plantas *Sorghum bicolor* e *S. halepense* e das respectivas culturas de tecido caloso estiveram relacionadas em condições salinas, apesar de registadas algumas diferenças entre os dois níveis de organização, como a maior acumulação de Na^+ e de prolina no tecido caloso do que nas folhas, mas apesar destas diferenças, Yang *et al.* (1990b) consideraram que o crescimento do tecido caloso pode ser usado como indicador da tolerância ao sal na planta de sorgo; num estudo semelhante feito em tomateiro, as culturas de tecido caloso mostraram um padrão de tolerância idêntico ao das plantas ensaiadas, e as diferenças detectadas nos dois sistemas de organização foram devidas à diferente capacidade na acumulação de água pelo tecido caloso e pelas folhas em condições salinas (Rus *et al.*, 1999). Por sua vez, os resultados obtidos por Bajji *et al.* (1998) demonstraram que não há correspondência entre o comportamento da planta e as culturas de tecido caloso, mas sugerem a existência de uma base celular para a resistência à salinidade, cuja expressão parece ser afectada pela complexidade anatómica e fisiológica da planta intacta. Para Naik & Widholm (1993), a relação positiva entre as respostas da planta e as das culturas de tecido caloso para a tolerância ao sal observada nos vários estudos pode ser justificada pelo facto da tolerância dessas plantas ser determinada fundamentalmente por mecanismos celulares; sendo assim, a possibilidade de usar as culturas de tecidos como modelo experimental para estabelecer a tolerância ao sal das plantas justifica-se apenas se a tolerância destas for conferida por mecanismos celulares (Dracup, 1991). Relativamente a esta problemática, Gossett *et al.* (1994b) concluíram que as respostas da célula ao stresse oxidativo induzido pelo sal contribuíram para a tolerância ao nível de toda a planta, assim, a utilização de linhas celulares com diferente tolerância ao sal proporciona o

sistema experimental mais adequado para relacionar a tolerância ao sal com a actividade antioxidante (Gueta-Dahan *et al.*, 1997). Os estudos realizados em culturas de tecido caloso e na planta intacta por Gossett *et al.* (1994b) e por Gueta-Dahan *et al.* (1997) mostram que existe uma relação próxima entre o aumento na actividade antioxidante e a tolerância ao sal em ambos os níveis de organização; apesar de se verificarem algumas diferenças na resposta antioxidante por parte da planta e do tecido caloso em cultura, nomeadamente na actividade de algumas enzimas e na detecção de certas isoformas das enzimas SOD e peroxidase do ascorbato, estas diferenças não foram totalmente inesperadas, devido por um lado, à diferente organização estrutural dos dois sistemas, e por outro, à regulação genética no tecido caloso que cresceu em meio corrigido com fitohormonas ser provavelmente diferente da regulação no tecido que passou pela ontogenia normal (Gossett *et al.*, 1994b). Dracup (1991) expôs várias razões para a tolerância ao sal nas culturas de células e/ou tecidos poder não ser expressa nas plantas intactas: as plantas dependem de vários mecanismos para se adaptarem à salinidade, dos quais alguns envolvem interacções de células e tecidos de uma forma coordenada, daí que a organização anatómica e fisiológica que existe nas plantas intactas é fundamental para a adaptação; as respostas das culturas de células à salinidade podem não ser expressas na planta dado que os ambientes hormonal, osmótico e nutricional nas células em cultura são diferentes nas células da planta inteira. De referir também, que o tipo de explante e a própria metodologia utilizada podem influenciar a relação entre a tolerância ao sal das culturas de células e a da planta intacta (Rus *et al.*, 1999; Hernandez *et al.*, 2000); a este respeito, Perez-Alfocea *et al.* (1994) verificaram que o comportamento das culturas de tecido caloso em condições salinas esteve mais próximo do da planta intacta quando o explante usado para o estabelecimento do tecido caloso foi proveniente de folha. Outro factor que influencia essa relação, e que geralmente não é tido em consideração, é a estabilidade do fenótipo de tolerância, que depende sobretudo do número de passagens das culturas em meio salino antes de se avaliar a tolerância ao sal (Ben-Hayyim & Kochba, 1983; Watad *et al.*, 1983; Rus *et al.*, 1999).

Dos resultados apresentados, a possibilidade de usar as culturas de células e/ou tecidos como modelo de estudo para as respostas à salinidade ao nível da planta, nomeadamente para avaliar a tolerância salina na planta, é uma questão controversa, no entanto, é certo que elas podem ser usadas como modelo de diversos processos celulares (Hawkins & Lips, 1997; Bueno *et al.*, 1998; Neill *et al.*, 1999), designadamente as linhas celulares tolerantes à salinidade são o melhor sistema para esclarecer os processos que estão envolvidos na sua tolerância (Watad *et al.*, 1983; Ben-Hayyim *et al.*, 1985; Binzel *et al.*, 1985; Rains *et al.*,

1986). Bajji *et al.* (1998) acrescentaram que as técnicas de cultura *in vitro* constituem o instrumento mais conveniente para comparar as respostas à salinidade aos níveis celular e da planta inteira, no sentido de separar as respostas que são exclusivas da célula e aquelas que são específicas do tecido e/ou órgãos, e que portanto, dependem de estruturas organizadas.

1.4 – Objectivos

Sendo a salinidade considerada um dos maiores factores que afecta a produtividade das culturas e com tendência para aumentar, o conhecimento sobre os mecanismos utilizados pelas plantas para lidar com os ambientes salinos é importante e essencial para nos próximos tempos aumentar a tolerância das plantas à salinidade, de modo a assegurar a produtividade das mesmas. Sabe-se que a salinidade interfere com o desenvolvimento das plantas através de vários factores, que incluem o stresse osmótico e a toxicidade provocada pela acumulação dos iões sódio e cloreto. Para além disto, a salinidade interfere com a actividade metabólica induzindo o aumento de produção de espécies activas de oxigénio; sendo assim, o efeito negativo da salinidade no crescimento e na produção das plantas pode ser também consequência do aumento do nível das EAOs, que causa o stresse oxidativo.

Os mecanismos de adaptação que as plantas desenvolveram para a manutenção das actividades bioquímicas e fisiológicas conducentes ao seu crescimento em condições de stresse salino são objecto da pesquisa recente. Nesse sentido, vários estudos demonstraram a possibilidade de usar as culturas *in vitro* como modelo experimental, nomeadamente através da utilização de linhas celulares tolerantes a NaCl, para estudar os mecanismos de tolerância à salinidade ao nível celular. Assim, as culturas *in vitro* têm vindo a desempenhar um papel determinante na selecção e caracterização de linhas celulares adaptadas a condições de stresse salino.

Apesar de terem já sido seleccionadas linhas celulares de diversas espécies com diferente tolerância a NaCl, pouca informação existe sobre a possibilidade de seleccionar *in vitro* linhas tolerantes a diferentes níveis de NaCl na batateira; acresce, ainda, o facto das alterações a nível fisiológico e bioquímico que podem surgir durante o crescimento dessas linhas em condições salinas, e que eventualmente contribuem para a aquisição da tolerância à salinidade, estar ainda menos documentado na literatura. Enquanto que para outras espécies (*Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Gossypium hirsutum*, *Citrus sinensis* e *C. aurantium*) vários trabalhos têm incidido na comparação da resposta de linhas celulares não

adaptadas a NaCl com a das linhas tolerantes seleccionadas *in vitro*, de modo a se estabelecer uma relação entre o comportamento destas linhas e a capacidade de tolerarem a presença de NaCl no meio, para a batateira os estudos realizados neste âmbito são praticamente inexistentes. Neste contexto, o nosso estudo teve como objectivo seleccionar *in vitro* linhas celulares de batateira tolerantes a diferentes níveis de NaCl (50, 100, 150 e 200mM de NaCl). Para o efeito procurou-se induzir a produção de tecido caloso de batateira a partir de diversos tipos de explantes. Seguidamente, o tecido caloso foi colocado a diferentes concentrações de NaCl presentes no meio de cultura, dado o nosso objectivo de obter linhas tolerantes a diversos níveis de salinidade, recorrendo a duas metodologias diferentes. Uma vez obtidas linhas de tecido caloso tolerantes a NaCl, pretendeu-se analisar o seu comportamento ao nível do crescimento e do conteúdo hídrico, bem como avaliar alguns parâmetros bioquímicos que são alterados em resposta à salinidade no meio, entre os quais, encontram-se alguns que estão associados à tolerância à salinidade.

Os resultados do presente estudo irão contribuir para o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na tolerância à salinidade do tecido caloso de batateira.

2 – MATERIAL e MÉTODOS

2.1 – Indução e estabelecimento da cultura de tecido caloso de *Solanum tuberosum* L.

2.1.1 – Material vegetal

Para a indução e estabelecimento da cultura de tecido caloso foram utilizadas folhas jovens obtidas de plantas de *Solanum tuberosum* L. da cultivar Désirée crescidas em condições de estufa com cerca de 25 dae, e foram também usados tubérculos jovens, isentos de qualquer defeito visível, provenientes da mesma planta e brotos isolados de tubérculos.

2.1.2 – Preparação e cultura do material vegetal

As folhas colhidas foram desinfectadas em etanol a 70% durante 5 minutos, solução de hipoclorito de sódio 20% durante 5 minutos e, de seguida, lavadas abundantemente em água desionizada e esterilizada. Os tubérculos foram primeiro desinfectados em etanol 70% durante 10 minutos e depois em hipoclorito de sódio 20%, durante 15 minutos, para serem de seguida lavados em água desionizada e esterilizada. O mesmo procedimento foi feito com os brotos, ou seja, após a desinfecção em etanol 70% e em hipoclorito de sódio 20% durante 10 minutos, os brotos foram lavados em água desionizada e esterilizada.

A preparação e cultura dos diferentes explantes da planta de batateira bem como todos os passos inerentes aos processos de subcultura do tecido caloso foram efectuados numa câmara de fluxo laminar. Utilizou-se para o efeito material de vidro e instrumentos metálicos (lâminas e pinças) esterilizados em autoclave a 121°C durante 30 minutos. Os meios de cultura foram também esterilizados por autoclavagem a 121°C e durante 20 minutos.

Já em condições assépticas, foi feita a última lavagem dos órgãos dadores do explante em água desionizada e esterilizada e, de seguida, procedeu-se à preparação dos diversos explantes. As folhas foram seccionadas em pequenas porções com cerca de 1cm², após a remoção da parte periférica. Nos tubérculos foram removidos cilindros de tecido recorrendo à utilização de um furador (1cm de diâmetro) previamente esterilizado em autoclave, que foi inserido ao longo do eixo de cada tubérculo; cada cilindro foi cortado em vários discos com aproximadamente 2mm de espessura, desprezando as porções terminais. Os brotos foram cortados em pequenos segmentos com um comprimento aproximado de 0,5-0,8 cm, efectuando-se cortes transversais e longitudinais. Como meios de cultura foram usados meios solidificados com 0,6% de agar (Sicomol) e com o pH ajustado para 5,7 com KOH 0,1M.

Os explantes foram cultivados no meio desenvolvido por Lam (1977) e no meio desenvolvido por Muneta *et al.* (1990). O primeiro meio de cultura (MI₁) continha como composição básica os nutrientes inorgânicos do meio modificado de Murashige & Skoog (1962) e orgânicos do meio de Nitsch & Nitsch (1969), como se indicam no Quadro I:

Compostos inorgânicos		Compostos orgânicos	
NH ₄ NO ₃	1650 mg/dm ³	Ácido nicotínico	0,5 mg/dm ³
KNO ₃	1900 mg/dm ³	Piridoxina	0,5 mg/dm ³
CaCl ₂	332 mg/dm ³	Tiamina	0,5 mg/dm ³
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 mg/dm ³	Biotina	0,05 mg/dm ³
KH ₂ PO ₄	170 mg/dm ³	Mio-inositol	2,0 mg/dm ³
Fe-EDTA	40 mg/dm ³	Glicina	5,0 mg/dm ³
KI	0,83 mg/dm ³	Ácido fólico	0,5 mg/dm ³
H ₃ BO ₃	6,2 mg/dm ³	Sacarose	20000 mg/dm ³
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3 mg/dm ³		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6 mg/dm ³		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg/dm ³		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg/dm ³		
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,025 mg/dm ³		

Quadro I – Composição do meio nutritivo de Lam (1977) utilizado na indução de tecido caloso de *S. tuberosum*.

De acordo com Lam (1977), o meio foi suplementado com 0,1% (p/v) de hidrolisado de caseína. Ao meio de indução foram adicionados os seguintes reguladores de crescimento: ácido indolacético (IAA) 1,0 mg/dm³, ácido naftaleno-acético (NAA) 0,2 mg/dm³, cinetina (KIN) 1,0 mg/dm³, benzilaminopurina (BA) 0,5 mg/dm³, zeatina (ZEA) 0,4 mg/dm³ e ácido giberélico (GA) 0,5 mg/dm³.

O meio de cultura (MI₂) apresentado por Muneta *et al.* (1990) incluía na composição básica os nutrientes inorgânicos e o mio-inositol do meio modificado de Murashige & Skoog (1962) (MS), juntamente com a mistura de nutrientes orgânicos do meio B₅ de Gamborg (1968), como se mostra no Quadro II.

O meio de cultura desenvolvido por Muneta *et al.* (1990) ficou completo após a incorporação do regulador de crescimento picloram – 2,42 mg/dm³ – para a indução de tecido caloso.

Compostos inorgânicos		Compostos orgânicos	
NH ₄ NO ₃	1650 mg/dm ³	Mio-Inositol (MS)	100 mg/dm ³
KNO ₃	1900 mg/dm ³	Meio B ₅ de Gamborg:	
CaCl ₂	332 mg/dm ³	Mio-Inositol	100 mg/dm ³
MgSO ₄ .7H ₂ O	370 mg/dm ³	Ácido nicotínico	1,0 mg/dm ³
KH ₂ PO ₄	170 mg/dm ³	Piridoxina	1,0 mg/dm ³
Fe-EDTA	40 mg/dm ³	Tiamina	10,0 mg/dm ³
KI	0,83 mg/dm ³	Sacarose	30000 mg/dm ³
H ₃ BO ₃	6,2 mg/dm ³		
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3 mg/dm ³		
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6 mg/dm ³		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25 mg/dm ³		
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg/dm ³		
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,025 mg/dm ³		

Quadro II – Composição do meio nutritivo de Muneta *et al.* (1990) utilizado na indução de tecido caloso de *S. tuberosum*.

A cultura dos diferentes explantes processou-se em placas de Petri de plástico (55 mm de diâmetro), que foram colocadas em estufa de cultura à temperatura de 27°C e sujeitas a um fotoperíodo de 13 horas de luz fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo 'day light', com uma densidade de fluxo fotónico de 35 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; no entanto, parte das culturas de explantes de broto e de tubérculo foram mantidas na obscuridade. Após cerca de 20 dias os explantes eram transferidos para meio de cultura fresco.

A manutenção da cultura de tecido caloso induzida foi realizada em dois meios de cultura diferentes. Um dos meios, o meio de manutenção, tinha a mesma composição básica do primeiro meio de indução (MI₁), tendo sido adicionados como reguladores de crescimento, uma auxina, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) – 2 mg/dm³, e uma citocinina, a benzilaminopurina (BA) – 0,5 mg/dm³; o outro meio apresentava a mesma composição nutritiva e em reguladores de crescimento que o segundo meio usado para a indução de tecido caloso (MI₂), ou seja, o meio de Muneta *et al.* (1990) utilizado na indução foi também usado na manutenção da cultura de tecido caloso.

A cultura estabelecida de tecido caloso foi mantida em frascos de cultura com 100cm³ de meio nutritivo, à temperatura de 27°C e num fotoperíodo de 13 horas de luz, com densidade

de fluxo fotónico de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, produzido por lâmpadas fluorescentes tipo 'day light'. Após cerca de 20-21 dias o tecido era subcultivado por transferência para meio fresco para evitar a necrose e manter o crescimento do tecido.

2.2 – Selecção *in vitro* de linhas celulares de *Solanum tuberosum* L. tolerantes a NaCl

2.2.1 – Material vegetal

Para a selecção de linhas celulares de *S. tuberosum* tolerantes a NaCl foi utilizada a cultura estabelecida de tecido caloso (gentilmente cedida pela Prof. Dr^a Fernanda Fidalgo) obtida a partir de fragmentos foliares de plantas jovens de *S. tuberosum* L. cv. Désirée.

2.2.2 – Preparação dos meios de cultura suplementados com NaCl

Para a sujeição de tecido caloso a condições de stresse salino foi preparado meio de manutenção – meio Lam suplementado com 2 mg/dm^3 de 2,4-D e $0,5 \text{ mg/dm}^3$ de BA – ao qual se adicionou NaCl nas seguintes concentrações: 50, 100, 150 e 200mM. Foram assim feitos quatro meios de cultura que diferiram apenas na concentração salina presente.

2.2.3 – Selecção de tecido caloso tolerante a NaCl

No momento de se proceder à subcultura do tecido caloso estabelecido para meio fresco, porções de tecido (aproximadamente 5 g de peso fresco) foram sujeitas a condições de stresse salino seguindo dois métodos de selecção:

- 1) Selecção directa: o tecido caloso foi dividido em cinco grupos e colocado em placas de Petri contendo 30 cm^3 de meio de manutenção suplementado com 0mM, 50mM, 100mM, 150mM e 200mM de NaCl, respectivamente. No final foi possível ter uma amostragem de dez placas por cada grupo de tratamento.
- 2) Selecção gradual: o tecido caloso foi inicialmente transferido para meio de manutenção contendo 50mM de NaCl. A intervalos de cerca de 26 dias procedeu-se à transferência de fragmentos de tecido caloso para o mesmo meio mas com níveis de salinidade crescentes, respectivamente 100 e 150mM de NaCl.

As placas de Petri contendo o tecido caloso controlo e submetido a condições salinas (50, 100, 150 e 200mM de NaCl) foram mantidas na estufa de cultura a 27°C e num fotoperíodo de 13 horas de luz, com uma densidade de fluxo fotónico de $35 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fornecido por

lâmpadas fluorescentes. Em ambos os métodos de selecção procedeu-se à repicagem do tecido caloso cada 26 dias, procurando-se excluir as regiões necrosadas.

2.3 – Estudos em tecido caloso de *Solanum tuberosum* L. tolerante a diferentes níveis de salinidade

Depois da obtenção de tecido caloso em abundância das cinco situações em cultura seria possível iniciar o estudo do comportamento do tecido caloso mantido a diferentes níveis de salinidade. Contudo, dada a necessidade de se dispor de elevada quantidade de material vegetal para se proceder à análise bioquímica de determinados parâmetros, e atendendo à menor disponibilidade de tecido nas condições de 150mM e 200mM de NaCl, optámos por realizar o presente estudo no tecido caloso crescido na ausência de sal (situação de controlo) e na presença de NaCl a 50mM e a 100mM.

2.3.1 – Crescimento de tecido caloso

Porções de tecido das três situações estudadas (0, 50 e 100mM de NaCl) foram pesadas assepticamente em frascos de cultura contendo 100cm³ de meio de manutenção suplementado com 0, 50 e 100mM de NaCl, respectivamente. De salientar o facto de que para a determinação de crescimento do tecido caloso adaptado a 100mM de NaCl foram retirados grupos de tecido tolerantes a 100mM de NaCl obtidos por selecção directa e por selecção gradual.

Após cerca de 5 semanas de cultura todo o tecido foi retirado dos respectivos frascos e pesado. O crescimento foi expresso em termos de crescimento absoluto, isto é, percentagem de aumento de peso de tecido nos vários tratamentos:

Crescimento = $[(p_f - p_i) / p_i] \times 100$, sendo p_f (g) o peso no fim do período de cultura considerado e p_i (g) o peso inicial.

De referir, que o tecido após ser pesado, foi utilizado para as determinações bioquímicas posteriores, tendo-se entretanto preparado as amostras destinadas às várias determinações, que foram depois congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C.

2.3.2 – Conteúdo hídrico no tecido caloso

O tecido caloso usado na determinação de crescimento foi utilizado para a determinação de peso seco; este parâmetro foi conhecido após a secagem em estufa a 70°C de várias amostras de tecido das três situações em estudo (0, 50 e 100mM de NaCl) até à estabilização do peso. Com base nos valores obtidos para o peso fresco e peso seco determinou-se o conteúdo hídrico para o tecido caloso crescido na ausência de sal e na presença de 50mM e 100mM de NaCl.

2.3.3 – Determinações bioquímicas

→ Clorofilas e Carotenóides

As clorofilas foram extraídas e quantificadas de acordo com o método de Hodgins & van Huystee (1986); de acordo com a técnica, usou-se como solvente acetona a 80% contendo 1% (v/v) de amónia em solução (25%). Após a homogeneização de amostras de tecido caloso (com cerca de 2 g), os extractos foram mantidos a 4°C, na obscuridade durante 30 minutos e depois centrifugados a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, a 4°C, em centrífuga Hettich Rotanta/RP (rotor 6254); os sobrenadantes foram recolhidos e os sedimentos resultantes foram ressuspensos no mesmo solvente e mantidos nas mesmas condições (a 4°C e na obscuridade) durante 15 minutos. Os sobrenadantes resultantes desta segunda extracção foram adicionados aos obtidos inicialmente, efectuando-se de seguida leituras de absorvâncias a 480 nm, a 645 nm e a 663 nm. As concentrações das clorofilas a e b, expressas em mmoles/dm³, foram calculadas a partir dos valores das absorvâncias a 663 nm e a 645 nm, respectivamente, e dos coeficientes de extinção milimolar das clorofilas a e b aos comprimentos de onda considerados.

Pigmento	Comprimento de onda (nm)	Coefficiente de extinção milimolar (mM⁻¹cm⁻¹)
Clorofila a	663	73,30
Clorofila b	645	41,38

A concentração total de carotenóides no extracto foi determinada a partir do valor da absorvância a 480 nm e aplicando a seguinte fórmula (Liaaen-Jensen & Jensen, 1971):

Carotenóides = $A_{480} \times v \times f \times 10/2500$ (mg), sendo A_{480} a absorvância lida a 480 nm, v o volume do extracto, f o factor de diluição, 2500 é um coeficiente de extinção médio para os carotenóides.

→ Peroxidação lipídica

A determinação da peroxidação lipídica em tecido caloso foi realizada através da quantificação do malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, de acordo com o método descrito por Draper & Hadley (1990).

Amostras de tecido caloso foram pulverizadas em azoto líquido num almofariz a 0-4°C; cerca de 50 mg de cada amostra foi homogeneizado em meio de extracção contendo 500 µl de TCA¹ 5% (v/v) e 50 µl de BHT² 2% (p/v). O homogeneizado foi a ferver em banho maria a 92-93 °C, durante 30 minutos; após arrefecimento à temperatura ambiente, o homogeneizado foi centrifugado a 12000 r.p.m. durante 20 minutos. A alíquotas de 500 µl de sobrenadante foram adicionados 500 µl de TBA³ 0,67% (p/v) para a determinação colorimétrica dos níveis de MDA; o branco foi preparado pela junção de TBA com a mistura de TCA com BHT em substituição do extracto de amostra. De seguida, o branco e as amostras foram novamente a ferver em banho maria a 92-93 °C, durante 30 minutos, para ao fim desse tempo, e após arrefecimento à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 532 nm e 600 nm.

→ Prolina

Amostras de tecido caloso com cerca de 0,3 g de peso foram homogeneizadas num almofariz contendo areia de quartzo, no meio de homogeneização que apresentava na sua composição 2 ml de ácido 5-sulfosalicílico a 3% (p/v). Os homogeneizados foram centrifugados a 1600 r.p.m. e a 4°C, durante 10 minutos em centrífuga Hettich Rotanta/RP (rotor 6254), sendo os sobrenadantes recolhidos no final para um tubo de ensaio. Os sobrenadantes foram usados para a reacção colorimétrica com 2 ml de ácido acético glacial e 2 ml de ninidrina ácida adicionados, que decorreu durante uma hora em banho maria a 100°C. Ao fim desse tempo, a

¹ TCA – Ácido tricloroacético

² BHT – Hidroxitolueno butilado

³ TBA – Ácido tiobarbitúrico

mistura foi arrefecida em banho de gelo e 4 ml de tolueno foram adicionados; após agitação forte, foi possível separar duas fases, tendo-se removido a fase superior de cor avermelhada. De seguida, a absorvância foi lida a 520 nm, usando o tolueno como branco.

A recta padrão para a quantificação da prolina foi construída utilizando-se ácido acético glacial, ninidrina ácida e tolueno.

→ Ácido ascórbico

A quantificação do ácido ascórbico foi feita em amostras (com cerca de 1 g) de tecido caloso, que foram homogeneizadas a 0-4°C num almofariz contendo areia de quartzo, tendo sido utilizados 3 ml do meio de extracção que continha ácido metafosfórico 5% (p/v). Os extractos foram centrifugados em centrífuga Hettich Rotanta/RP (rotor 6254), a 4000 r.p.m. durante 15 minutos, a 4°C. Aos sobrenadantes obtidos foi adicionado Folin 1% (v/v) e o branco foi preparado com Folin 1%, substituindo-se a amostra por água desionizada. Após 40 minutos, a absorvância foi lida a 730 nm.

Para a construção da recta padrão utilizou-se solução de ácido ascórbico.

→ Proteínas

Para a extracção das proteínas totais (solúveis e insolúveis), amostras de tecido caloso foram homogeneizadas num almofariz previamente arrefecido e em banho gelo, com areia de quartzo e PVP⁴ insolúvel a 1% (p/v), em 3 ml de meio de homogeneização; o meio de homogeneização continha na sua composição tampão Tris-HCl⁵ 0,06M, pH 6,8, PMSF⁶ 1mM e leupeptina 10µM. Os homogeneizados foram centrifugados a 4000 r.p.m. e a 4°C em centrífuga Hettich Rotanta/RP (rotor 6254), durante 15 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram usados para a quantificação das proteínas solúveis de acordo com a técnica descrita por Peterson (1977). Esta técnica é uma modificação ao método de Lowry *et al.* (1951) e utiliza os seguintes reagentes e procedimentos:

- Solução de cobre-tartarato-carbonato (solução CTC): uma solução de carbonato de sódio a 20% (p/v) é adicionada lentamente, com agitação, a uma solução de sulfato de cobre em tartarato de potássio, de modo a obter-se concentrações finais de sulfato de cobre

⁴ PVP – Polivinilpirrolidona

⁵ Tris-HCl – Tris (hidroximetil) aminometano, com pH ajustado com ácido clorídrico (HCl)

⁶ PMSF – Fenilmetilsulfonil fluoreto

pentahidratado 0,1% (p/v), tartarato de potássio 0,2% (p/v) e carbonato de sódio 10% (p/v).

- Solução A: preparada a partir da mistura de volumes iguais das soluções CTC, NaOH⁷ 0,8M, SDS⁸ 10% (p/v) e água desionizada.
- Solução B: 1 volume de reagente Folin-Ciocalteus é adicionado a 5 volumes de água desionizada.

Em tubos de ensaio, adicionou-se 1 ml de cada amostra convenientemente diluída a 1 ml da solução A; para o branco, misturou-se 1 ml de água desionizada em vez da amostra. Após 10 minutos, à temperatura ambiente, adicionou-se 0,5 ml da solução B e, passados 20 minutos, foi lida a absorvância a 750 nm.

Para a quantificação das proteínas insolúveis, o sedimento proveniente da centrifugação anterior foi ressuspenso em 3 ml do mesmo tampão (Tris-HCl 0,06M, pH 6,8) contendo SDS 2,5% (p/v); a suspensão resultante foi incubada durante 3 horas a 4°C, seguido de 1 hora à temperatura ambiente. Após centrifugação da suspensão a 4000 r.p.m. durante 15 minutos, as proteínas insolúveis foram também quantificadas pelo método de Peterson (1977).

As rectas padrão de proteínas foram construídas com albumina sérica bovina (BSA).

Depois de realizada a quantificação de proteínas, às amostras concentradas foi adicionado tampão de amostra para fazer posteriormente a separação em gel das proteínas solúveis e insolúveis. O tampão de amostra foi preparado com tampão Tris-HCl 187,5mM, SDS 6% (p/v), β -mercaptoetanol 15% (v/v), azul de bromofenol 0,003% (v/v) e glicerol 30% (v/v), pH 6,8. As amostras misturadas com este tampão (100 μ l + 50 μ l, respectivamente) foram fervidas a 100°C, durante 10 minutos. Depois de arrefecidas, foram guardadas em câmara frigorífica a -80°C.

⁷ NaOH – Hidróxido de sódio

⁸ SDS – Dodecil sulfato de sódio

➔ Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As proteínas solúveis e insolúveis foram separadas em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A electroforese foi realizada em gel vertical usando o sistema descontínuo de Laemmli (1970), tendo sido utilizada a unidade SE 280 da Hoefer. A malha do gel concentrador foi de 5% (acrilamida: *bis* acrilamida) e a do gel de separação foi de 10% (acrilamida: *bis* acrilamida).

Os reagentes para a preparação de um gel com malha de 5% (gel concentrador) e espessura de 1,5mm, na unidade SE 280, foram os seguintes (Quadro III):

Acrilamida: <i>bis</i> acrilamida	670 µl
Tris-HCl 0,5M, pH 6,8	1000 µl
Água desionizada	2189 µl
SDS 10% (p/v)	40 µl
APS ⁹ 2% (p/v)	100 µl
TEMED ¹⁰	1 µl
Volume final	4000 µl

Quadro III – Composição do gel concentrador.

Os reagentes para a preparação de um gel com malha de 10% (gel separador) e espessura de 1,5mm, na mesma unidade (SE 280), foram os seguintes (Quadro IV):

Acrilamida: <i>bis</i> acrilamida	3000 µl
Tris-HCl 1,5M, pH 8,8	2250 µl
Água desionizada	3433 µl
SDS 10% (p/v)	90 µl
APS 2% (p/v)	225 µl
TEMED	2,25 µl
Volume final	9000 µl

Quadro IV – Composição do gel separador.

⁹ APS – Persulfato de amónio

¹⁰ TEMED – Tetrametiletilenodiamina

O tampão de electroforese apresentava a seguinte composição: tampão Tris-HCl 25mM, glicina 192mM e SDS 0,1% (p/v), pH 8,3.

Foram aplicadas 10 µg de proteínas (amostras) em cada poço do gel e paralelamente aplicou-se o marcador de proteínas de baixa massa molecular (14,400 a 97,400 kDa – BIORAD).

As electroforeses foram realizadas com uma voltagem constante (600 V) e intensidade da corrente de 15 mA no gel concentrador e de 20 mA no gel separador.

A coloração foi realizada com nitrato de prata, utilizando o seguinte procedimento:

1. fixação do gel numa solução de 50% de metanol, 12% de ácido acético e 0,05% (v/v) de formaldeído a 37%, com agitação, na obscuridade e durante 30 minutos;
2. três lavagens, cada uma com duração de 10 minutos, em 50% de etanol com agitação e na obscuridade;
3. pré-tratamento com agitação em 0,02% (p/v) de tiosulfato de sódio, durante 1 minuto;
4. três lavagens em água desionizada, com duração de 20 minutos para cada lavagem;
5. impregnação, com agitação, numa solução de 0,2% de nitrato de prata e 0,075% de formaldeído, durante 20 minutos;
6. duas lavagens em água desionizada;
7. revelação com uma solução de 0,162% de carbonato de sódio, 0,05% de formaldeído a 37% e 0,004% de tiosulfato de sódio, durante 15 minutos, aproximadamente;
8. paragem da revelação com uma solução de 50% de metanol e 12% de ácido acético, durante 5 minutos;
9. lavagem com 50% de metanol.

O gel foi analisado num processador de imagem Cybertech CS 1.

2.4 – Análise estatística

Para a comparação das médias dos dados experimentais obtidos nas determinações de crescimento e conteúdo de água do tecido caloso e nas determinações bioquímicas, foi usado o teste *t* de 'Student', com um nível de significância de $P < 0,05$.

3 – RESULTADOS e DISCUSSÃO

3.1 – Indução e estabelecimento da cultura de tecido caloso de *Solanum tuberosum* L.

Para a indução de tecido caloso de batateira foram utilizados três tipos de explantes: os fragmentos foliares, isolados de folhas jovens colhidas em plantas de *S. tuberosum* L. cv. Désirée, os segmentos de broto, obtidos de brotos que foram removidos de tubérculos quando se encontravam em fase de abrolhamento, e os discos de tubérculo, obtidos a partir de cilindros de tecido provenientes de tubérculos jovens (ver Material e Métodos); após realizada a desinfecção, e já em condições assépticas, os diferentes explantes foram colocados no meio de indução. Os fragmentos de folha, de broto e de tubérculo, isolados como previamente descrito em Material e Métodos, foram cultivados em dois meios de cultura (MI₁ e MI₂) que divergiram, entre outros aspectos da composição, nos reguladores de crescimento usados para a indução do tecido caloso a partir desses fragmentos (ver Material e Métodos). Passados alguns dias de cultura (8 dias), foi já possível observar o aparecimento de tecido caloso nas superfícies periféricas dos explantes de broto (Fig. 3), que se tornou mais evidente ao fim de 16 dias em cultura (Fig. 4). Os primeiros sinais de formação de tecido caloso surgiram mais tarde na cultura dos explantes de tubérculo, uma vez que após 8 dias em cultura os explantes tinham aumentado ligeiramente em volume, mas ainda não era visível exteriormente a formação do tecido (Fig. 5), que veio a ser detectado passados 18 dias (Fig. 6). Quer para os explantes de broto, quer para os de tubérculo, a indução de tecido caloso ocorreu de forma mais rápida e homogênea no meio MI₂, ou seja no meio que utilizou a auxina picloram para a indução de tecido caloso, do que no meio MI₁, onde foram usados diversos reguladores de crescimento. Apesar de ter sido possível induzir a formação de tecido caloso nas superfícies de porções de broto através do meio de cultura MI₁, a indução foi lenta (formação de tecido caloso após 25-30 dias de cultura) e acompanhada pela perda de alguns explantes, enquanto que através do segundo meio (MI₂) conseguimos obter uma resposta em termos de indução bastante mais rápida (formação de tecido caloso após 10-15 dias de cultura) e uniforme entre os explantes (Fig. 7). A formação de tecido caloso a partir dos explantes provenientes de tubérculo cultivados no meio MI₁ foi ainda mais lenta do que fora observado com os fragmentos de broto, verificando-se que alguns explantes necrosaram antes de ocorrer a indução do tecido, no entanto, quando os explantes de tubérculo foram cultivados no meio MI₂ observámos a formação de tecido caloso ao fim de 25-27 dias (Fig. 8), sem que tivéssemos registado perdas de material vegetal, a não ser por eventuais infecções.

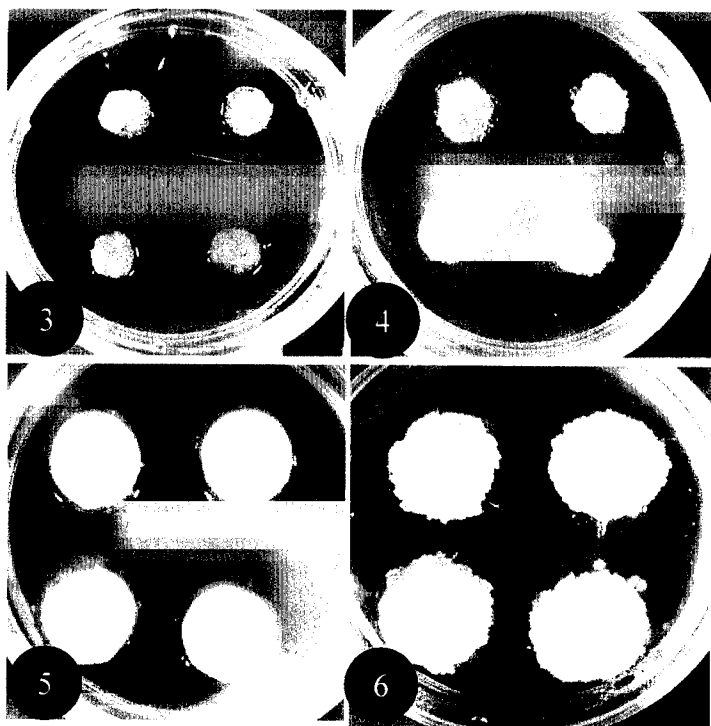


Fig. 3 – Aspecto de explantes de brotinho ao fim de 8 dias de cultura, em meio de indução. Fig. 4 – Aspecto de explantes de brotinho ao fim de 16 dias de cultura, em meio de indução, onde se pode observar tecido caloso nas regiões periféricas dos explantes.

Fig. 5 – Aspecto de explantes de tubérculo ao fim de 8 dias de cultura, em meio de indução; ainda não é visível o aparecimento de tecido caloso. Fig. 6 – Aspecto de explantes de tubérculo ao fim de 18 dias de cultura, em meio de indução, onde se observa tecido caloso nas regiões periféricas dos explantes.

Fig. 7 – Aspecto de explantes de brotinho cultivados em meio de indução MI_2 (à esq.) e em MI_1 (à dir.) ao fim de 16 dias; é visível pelo aspecto dos explantes que a resposta foi mais rápida no meio MI_2 .

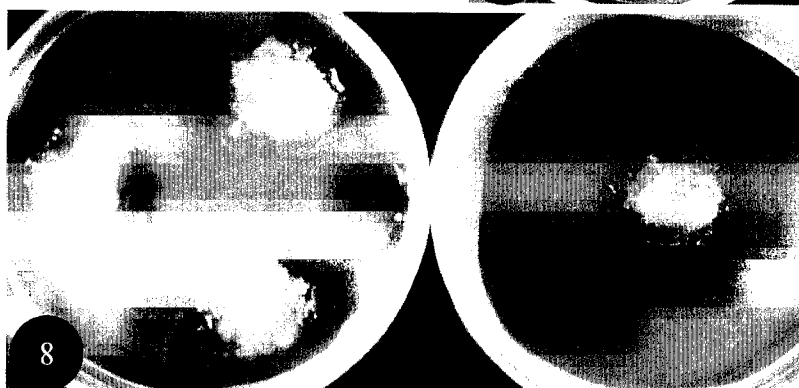
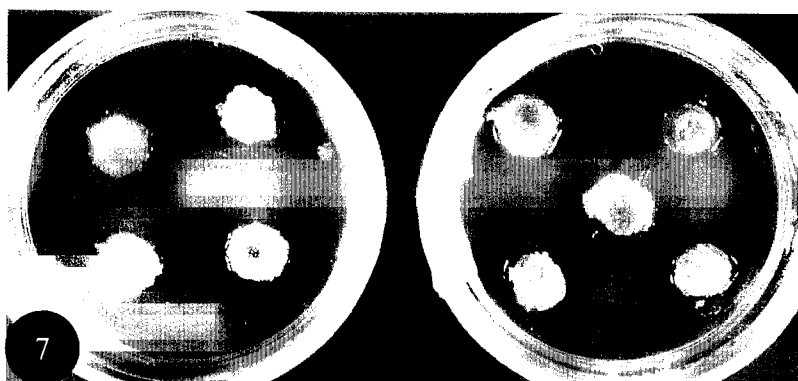


Fig. 8 – Aspecto de explantes de tubérculo cultivados em meio de indução MI_2 (à esq.) e em MI_1 (à dir.) ao fim de 26 dias; notar que a indução foi melhor conseguida no meio MI_2 .

Com base nas observações realizadas, podemos desde já referir que a indução de tecido caloso a partir dos explantes de brolho e de tubérculo foi melhor conseguida no meio MI₂, no entanto, a resposta foi variável quando eles foram expostos a diferentes condições de luminosidade; assim, a indução da formação de tecido na superfície dos fragmentos de brolho foi favorecida pela exposição dos mesmos à luz (Fig. 9), enquanto que a formação de tecido a partir dos discos de tubérculo ocorreu de forma rápida e homogênea nos explantes sujeitos à condição de obscuridade (Fig. 10). Nos discos de tubérculo cultivados nos meios MI₁ e MI₂ e expostos à luz não se observou a formação de tecido caloso (Fig. 11), de tal modo que, os fragmentos que se encontravam à luz foram posteriormente transferidos para a condição de obscuridade de forma a induzir a formação do tecido; também as culturas dos fragmentos de brolho nos dois meios de indução (MI₁ e MI₂) que inicialmente estavam na obscuridade (Fig. 12) foram transferidas para a luz, atendendo a que a formação do tecido caloso deu-se mais rapidamente e sem se registarem perdas de material vegetal em condições de luminosidade (Fig. 9). Face a estes resultados, considerámos que para a indução e produção de tecido caloso com sucesso através da cultura dos explantes de brolho e de tubérculo o meio de indução que tinha presente um único regulador de crescimento – o picloram – foi o mais adequado, embora a presença ou ausência de luz tenha sido também importante, dado que as culturas dos fragmentos de brolho no meio MI₂ à luz e dos discos de tubérculo nesse mesmo meio na obscuridade deu os melhores resultados em termos de formação e proliferação de tecido caloso.

Relativamente às porções foliares cultivadas nos dois meios de indução observámos que após vários dias em cultura (cerca de 16 dias) os explantes apresentavam um aspecto que indicava uma reacção positiva aos meios de indução (Fig. 13). Contudo, os fragmentos foliares cultivados no meio MI₁ começaram entretanto a necrosar (Fig. 14), impedindo a formação do tecido, por sua vez, os explantes no meio MI₂ com a evolução da cultura formavam massas de tecido caloso nas zonas periféricas (Fig. 15). Assim, a cultura de explantes foliares no meio de indução MI₁ não resultou na formação de tecido caloso, sendo no meio de indução alternativo (MI₂) que a produção de tecido foi bem sucedida.

Uma vez induzida a formação de tecido caloso e com a evolução das culturas, os aglomerados de tecido caloso inicialmente formados nas regiões periféricas dos explantes isolados da planta de batateira rapidamente estenderam-se a todas as superfícies destes, cobrindo-os na totalidade, o que motivou a transferir o tecido formado para o meio de manutenção de modo assegurar o seu estabelecimento. Assim, o crescimento do tecido caloso formado a partir da cultura dos segmentos de brolho no meio de indução MI₁ foi mantido por transferência para

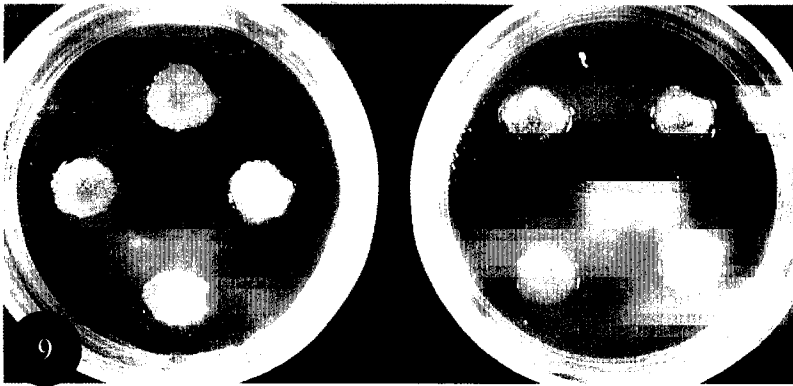


Fig. 9 – Explantes de broto cultivados no meio de indução MI_2 em condições de luminosidade (à esq.) e de obscuridade (à dir.) ao fim de 16 dias; notar que a formação de tecido caloso foi favorecida pela exposição dos explantes à luz.

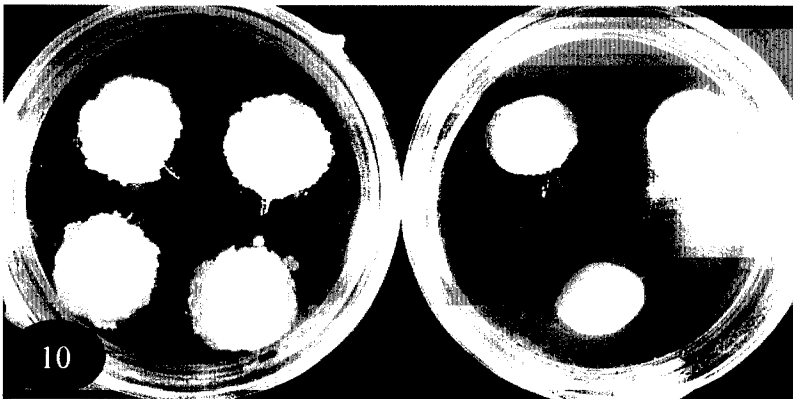


Fig. 10 – Explantes de tubérculo cultivados no meio de indução MI_2 em condições de obscuridade (à esq.) e de luminosidade (à dir.) ao fim de 18 dias; é notório que a formação de tecido caloso foi favorecida pela exposição dos explantes na obscuridade.

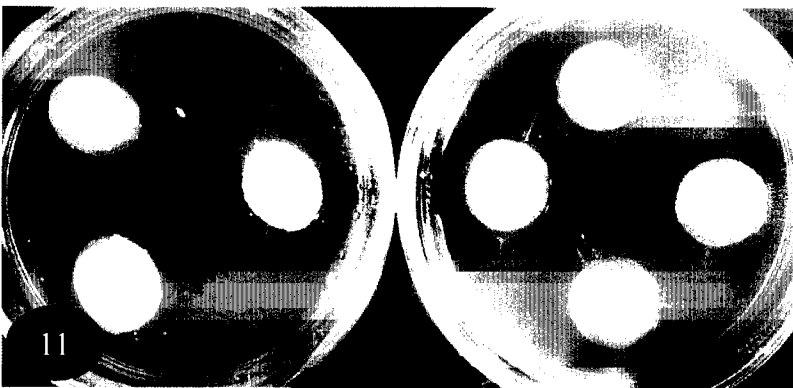


Fig. 11 – Explantes de tubérculo cultivados nos meios de indução MI_2 (à esq.) e MI_1 (à dir.) em condições de luminosidade, ao fim de 18 dias, onde se pode ver que não ocorre a formação de tecido caloso na presença de luz.

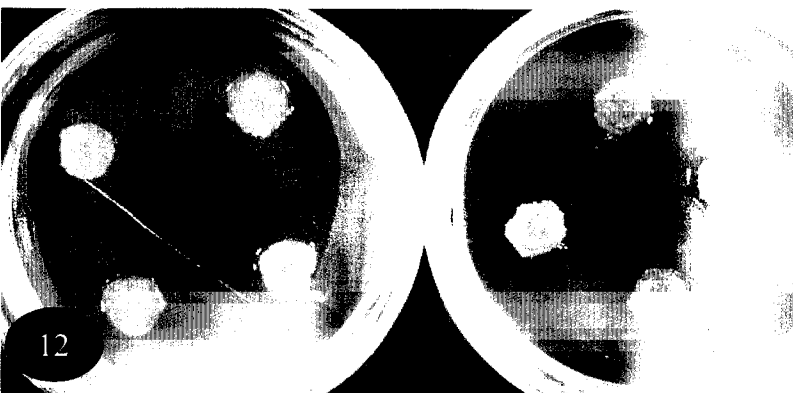


Fig. 12 – Explantes de broto cultivados nos meios de indução MI_2 (à esq.) e MI_1 (à dir.) em condições de obscuridade, ao fim de 16 dias; é possível observar que a formação de tecido caloso é afectada pela obscuridade, nomeadamente nos explantes cultivados em MI_1 .

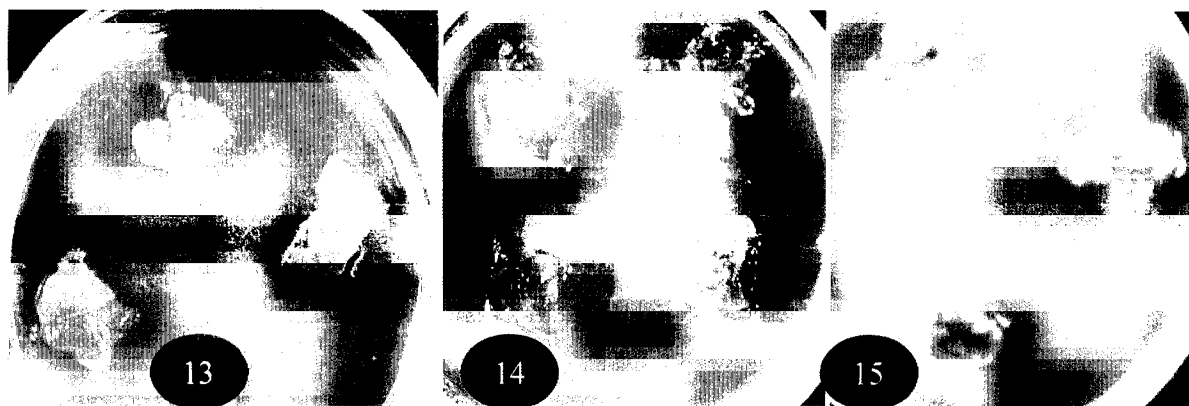


Fig. 13 – Aspecto de explantes foliares ao fim de 16 dias de cultura, em meio de indução. Fig. 14 – Explantes foliares cultivados em meio de indução MI_1 que começaram a necrosar, ao fim de cerca de 25 dias de cultura, não ocorrendo a formação de tecido caloso. Fig. 15 – Imagem de explantes foliares cultivados no meio de indução MI_2 , onde se observa tecido caloso nas regiões periféricas dos explantes.

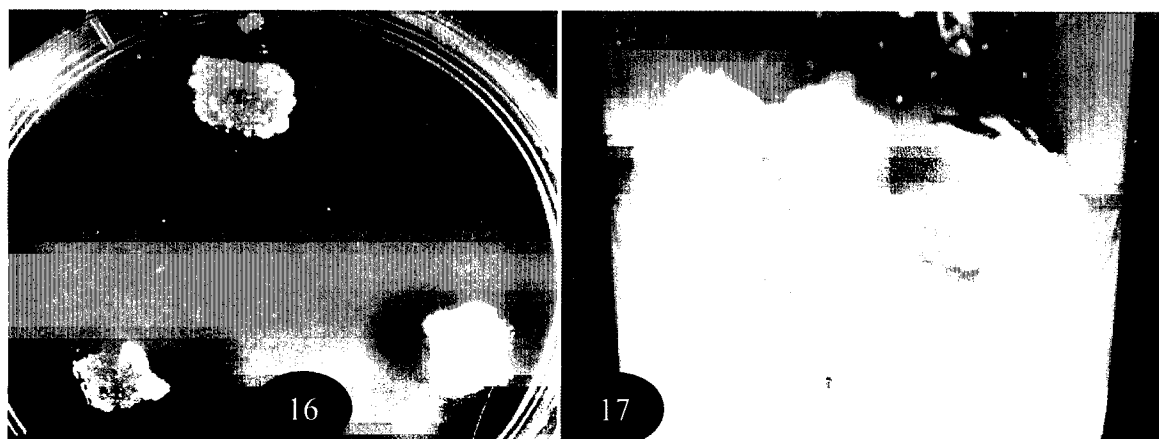


Fig. 16 – Imagem de explantes de broto após transferência para meio de manutenção, para garantir a proliferação do tecido caloso entretanto formado. Fig. 17 – Aspecto de tecido caloso induzido a partir de explantes de tubérculo cultivados em meio de indução MI_2 .

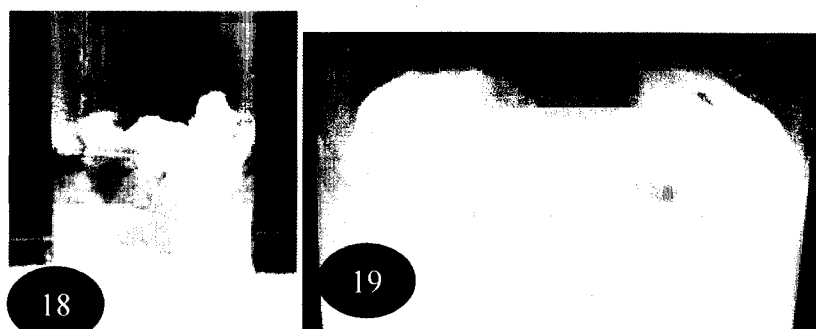


Fig. 18 – Aspecto de tecido caloso derivado da cultura de explantes de broto, após cerca de 15 dias de ter sido transferido para meio de manutenção. Fig. 19 – Tecido caloso obtido a partir de explantes de tubérculo, crescido durante 45 dias em meio de indução MI_2 .

meio de manutenção (Fig. 16), que tinha a mesma composição básica do meio MI₁, tendo sido substituídos os reguladores de crescimento pela auxina 2,4-D e pela citocinina BA (ver Material e Métodos); o meio MI₂ que tinha sido usado para a indução de tecido caloso foi utilizado também para a manutenção do tecido entretanto formado e, sendo assim, o crescimento do tecido proveniente dos explantes de broto cultivados no meio de indução MI₂ foi assegurado neste mesmo meio, embora fosse também mantido por transferência para o meio de manutenção. Uma vez que a quantidade de tecido caloso formado a partir dos fragmentos de tubérculo cultivados no meio de indução MI₁ foi tão baixa, fomos levados a desprezar esse tecido em favor daquele que fora induzido através do outro meio e que se encontrava em proliferação activa (Fig. 17). Sendo assim, o desenvolvimento do tecido caloso induzido a partir dos discos de tubérculo cultivados no meio de cultura MI₂ foi mantido neste meio em condições de luminosidade, e foi também subcultivado para o meio de manutenção. Um procedimento semelhante foi usado com o tecido caloso resultante das culturas de explantes foliares, ou seja, o tecido foi mantido no mesmo meio de cultura utilizado para a indução (MI₂), embora fosse também transferido para o meio de manutenção.

Na fase inicial de estabelecimento do tecido caloso pudemos verificar que o crescimento foi mais ou menos rápido em função do tipo de explante utilizado para a indução, isto é, o tecido caloso obtido a partir das culturas dos fragmentos de broto apresentou um desenvolvimento mais rápido relativamente ao do tecido proveniente das culturas de explantes foliares e de tubérculo (Figs. 18 e 19). O crescimento do tecido caloso resultante das culturas de discos de tubérculo foi o mais lento e também o mais difícil de manter em cultura, no entanto, o meio de manutenção utilizado nesta fase inicial foi determinante para o seu estabelecimento. Os nossos resultados mostram que o crescimento do tecido caloso proveniente das culturas de segmentos de broto nos meios de indução MI₁ e MI₂ foi abundante quando o tecido foi cultivado no meio de manutenção e quando permaneceu no meio MI₂. O tecido cultivado no meio de manutenção apresentava no início do seu estabelecimento cor verde amarelada e consistência bastante friável (Fig. 20), que com a evolução da cultura e após várias repicagens conseguiu-se obter tecido caloso com consistência mais compacta e em que a cor verde surgia mais acentuada, indicando um teor clorofílico mais elevado (Fig. 21). O tecido caloso que manteve o seu desenvolvimento no meio MI₂ cresceu consideravelmente, como se pode visualizar na Fig. 22, no entanto, após estabelecido apresentava cor esbranquiçada, o que indicava a ausência de pigmentos. Perante este facto, o tecido estabelecido no meio MI₂ foi transferido para o meio de manutenção com o objectivo de promover o seu reverdecimento, e

essa mudança resultou no desenvolvimento de tecido caloso com um nível superior de clorofilas (Fig. 23).

Em relação ao comportamento do tecido caloso formado a partir das culturas de discos de tubérculo, verificámos que o tecido pouco cresceu após ter sido transferido do meio de indução MI₂ para o meio de manutenção e para as condições de luminosidade, e ao fim de certo tempo em cultura começou a necrosar (Fig 24), o que contrasta com o crescimento activo observado quando permaneceu no meio MI₂ (Fig 25). O elevado desenvolvimento do tecido caloso no meio que fora usado para a respectiva indução permitiu a obtenção de tecido em abundância, que após o crescimento durante cerca de 23-25 dias era subcultivado para meio fresco. Contudo, e tal como foi verificado para o tecido caloso estabelecido no meio MI₂ obtido das culturas de segmentos de broto, o tecido caloso mantido no meio MI₂ e após algumas repicagens conservou a cor branca; esta situação levou-nos a mudar o tecido estabelecido nesse meio para o meio de manutenção, o que resultou no reverdecimento gradual do tecido, sem que o seu crescimento tivesse sido aparentemente prejudicado em consequência dessa mudança (Fig. 26).

O tecido caloso resultante das culturas de explantes foliares cresceu bem quando foi cultivado no meio de manutenção e quando foi mantido no meio de cultura MI₂, no entanto, as culturas de tecido caloso no meio MI₂ destacaram-se pelo facto do crescimento do tecido ter sido superior em relação ao que foi observado no outro meio de cultura (Fig. 27). Apesar do tecido que foi cultivado no meio de manutenção ter mostrado inicialmente um menor ritmo de crescimento, ele desenvolveu um nível superior de clorofilas, evidenciado pela tonalidade verde amarelada que foi progressivamente alterada para verde ao longo do estabelecimento das culturas (Fig. 28). Com base neste facto, e perante a cor branca evidente após o estabelecimento do tecido caloso no meio MI₂, este tecido foi subcultivado no meio de manutenção de modo a induzir-lhe a formação de pigmentos, o que foi bem sucedido (Fig. 29).

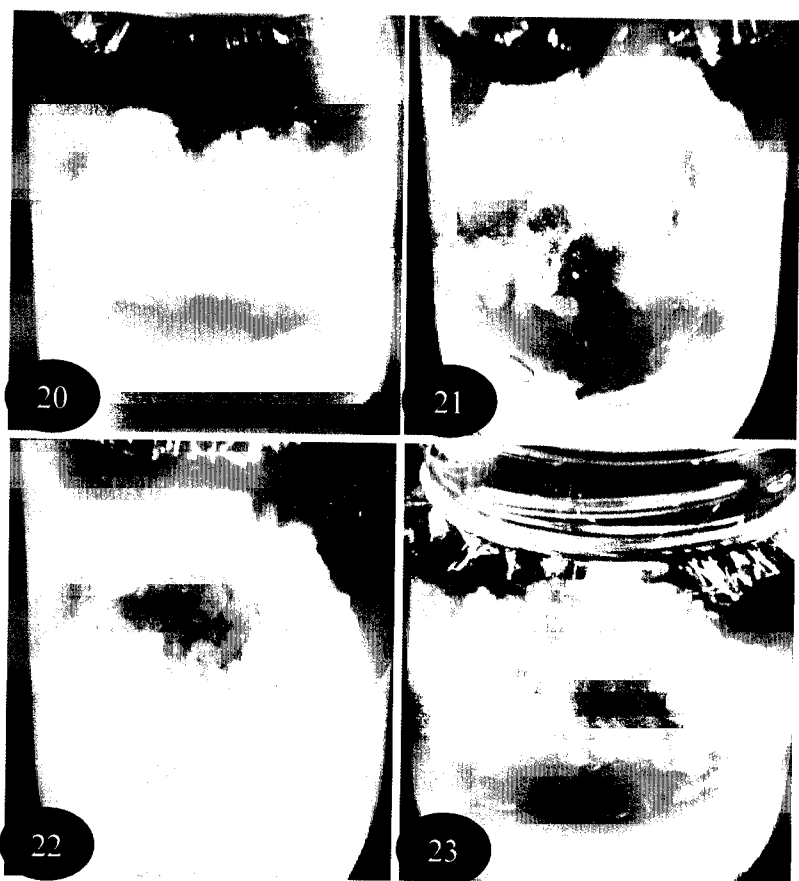


Fig. 20 – Tecido caloso proveniente da cultura de explantes de broto, crescido durante cerca de 35 dias em meio de manutenção; é evidente a cor verde amarelada que o tecido apresenta. Fig. 21 – Aspecto de tecido caloso derivado de explantes de broto em meio de manutenção, após 3 meses em cultura; quando comparado este tecido com o ilustrado na Fig. 20, é notória a diferença de cor resultante do diferente teor de clorofilas que possui. Fig. 22 – Imagem de tecido caloso proveniente de explantes de broto, mantido no meio de indução MI_2 , onde a cor esbranquiçada evidenciada pelo tecido indicia a ausência de pigmentos. Fig. 23 – Imagem de tecido caloso derivado de explantes de broto após ter sido transferido de meio MI_2 para meio de manutenção; em consequência desse procedimento o teor de clorofilas aumentou no tecido.

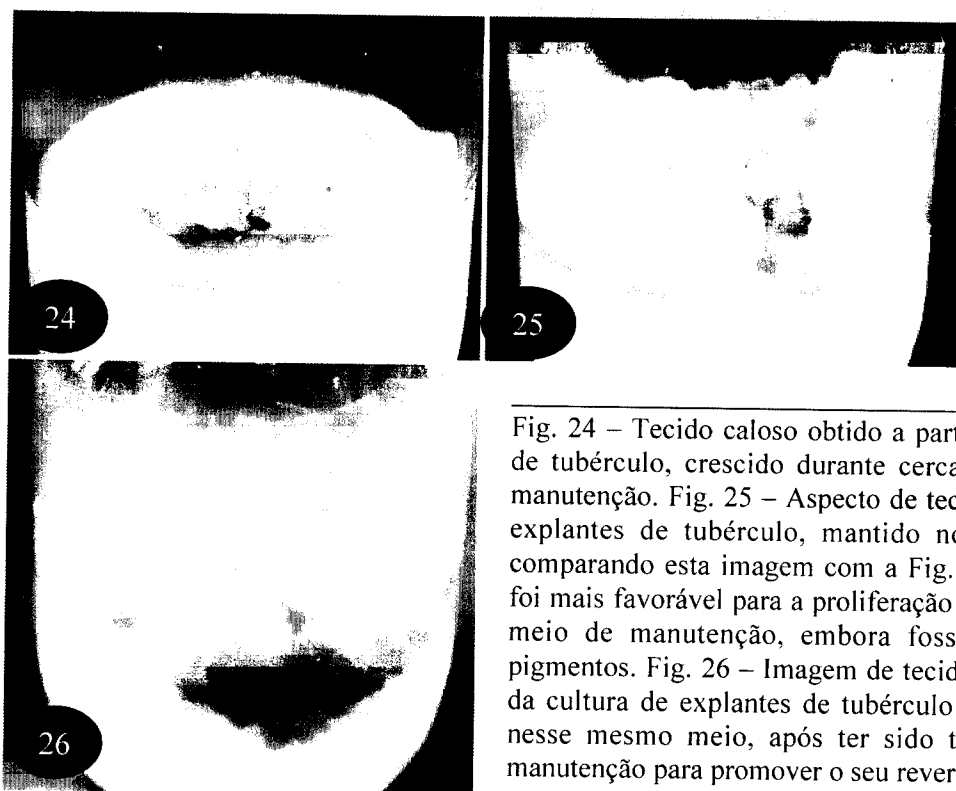


Fig. 24 – Tecido caloso obtido a partir da cultura de explantes de tubérculo, crescido durante cerca de 26 dias em meio de manutenção. Fig. 25 – Aspecto de tecido caloso proveniente de explantes de tubérculo, mantido no meio de indução MI_2 ; comparando esta imagem com a Fig. 24, conclui-se que o MI_2 foi mais favorável para a proliferação do tecido caloso do que o meio de manutenção, embora fosse visível a ausência de pigmentos. Fig. 26 – Imagem de tecido caloso induzido a partir da cultura de explantes de tubérculo no meio MI_2 , e crescido nesse mesmo meio, após ter sido transferido para meio de manutenção para promover o seu reverdecimento.

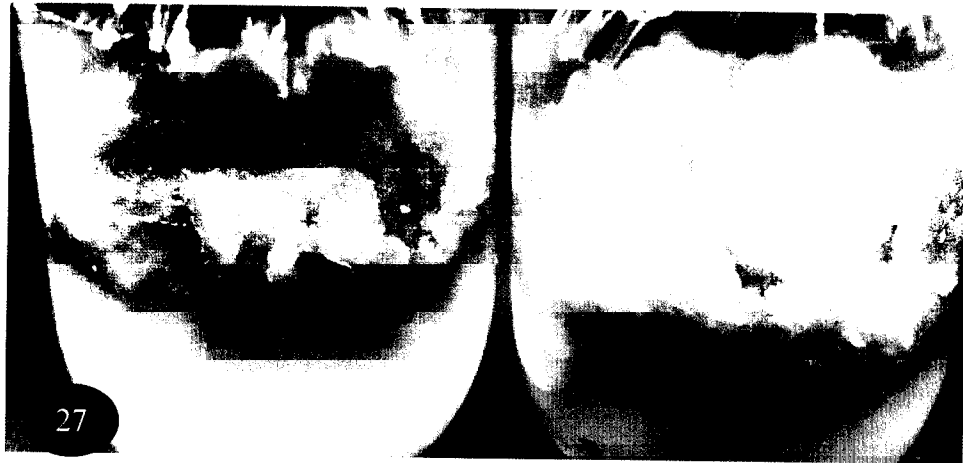


Fig. 27 – Tecido caloso resultante da cultura de explantes foliares, crescido durante 45 dias em meio de manutenção (à esq.) e em meio de indução MI₂ (à dir.); notar a maior proliferação de tecido no meio MI₂ comparativamente à observada no meio de manutenção.

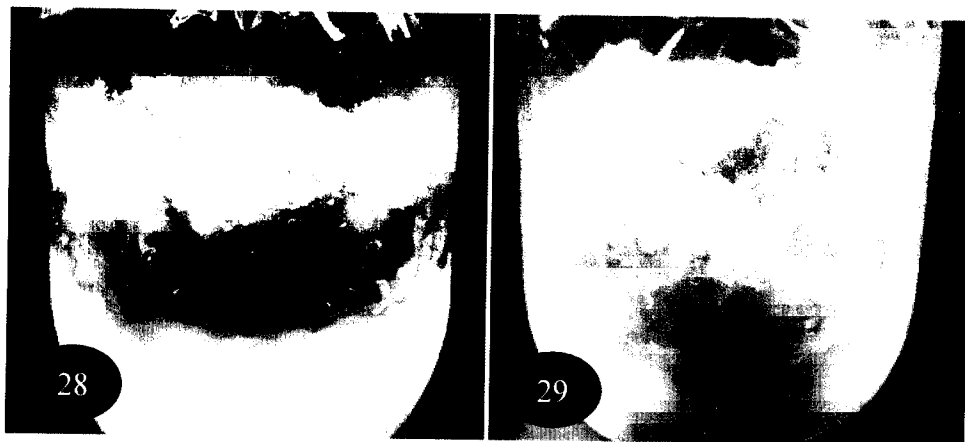


Fig. 28 – Aspecto de tecido caloso produzido a partir de explantes foliares, mantido em meio de manutenção durante 3 meses; de assinalar a cor verde que o tecido apresenta e que contrasta com o aspecto observado no frasco da esquerda da Fig.27. Fig. 29 – Aspecto de tecido caloso proveniente de explantes de folha que, após ter sido mantido durante algum tempo no meio MI₂, foi subcultivado em meio de manutenção, o que levou ao reverdecimento do tecido.

A indução e produção de tecido caloso com sucesso depende do estado fisiológico do tecido ou do órgão no momento em que o explante é isolado, verificando-se que a indução da formação do tecido é mais rápida se o explante é obtido de regiões jovens e fisiologicamente mais activas (Quraishi *et al.*, 1987; Hartmann *et al.*, 1990). Este aspecto está de certa forma relacionado com o tipo de explante utilizado para a formação do tecido caloso, daí que para Quraishi *et al.* (1987) a escolha do explante seja fundamental para a indução de tecido caloso de *Solanum tuberosum*. No nosso estudo foram utilizados três tipos de explantes provenientes de órgãos com uma actividade fisiológica distinta: os segmentos de brolho, os fragmentos foliares e os discos de tubérculo. Apesar dos explantes usados terem iniciado a formação da cultura de tecido caloso, os explantes de brolho iniciaram-na de forma mais rápida e mais homogénea entre si, já os fragmentos de folha e de tubérculo necessitaram de mais tempo em cultura, principalmente os de tubérculo, até se detectar o aparecimento do tecido caloso. Quraishi *et al.* (1987) tinham já demonstrado que os explantes isolados de brolho apresentavam uma boa aptidão para a calogénese e que estavam mais aptos para este fenómeno do que as porções de tubérculo. Para os autores o estado fisiológico do tubérculo dador do explante é determinante para a indução de tecido caloso, sendo particularmente importante a idade e a temperatura de conservação dos tubérculos, daí que a diferença que foi verificada na aptidão para a calogénese entre os fragmentos de brolho e os de tubérculo está provavelmente relacionada com o carácter juvenil que o material de brolho apresenta. Por outro lado, o tubérculo da batateira não pode ser usado nas culturas *in vitro* como uma massa homogénea de tecido, é preciso considerar a diversidade de tecidos que existem no tubérculo. Nesta perspectiva, Jarret *et al.* (1980) avaliaram a capacidade dos diferentes tecidos de tubérculo para regenerar *in vitro* rebentos adventícios e verificaram que a aptidão dos tecidos perimedular e cortical para a formação de rebentos foi muito superior à do tecido de medula. Quando os discos de tubérculo constituídos por tecido da medula foram postos em cultura cerca de 50% iniciaram a formação de tecido caloso, enquanto que os restantes não sobreviveram, no entanto, entre os explantes que iniciaram a formação de tecido uma parte deles veio a necrosar. Os resultados obtidos por estes autores demonstram que a capacidade para regenerar rebentos adventícios ou para formar tecido caloso usando o tubérculo como dador do explante é dependente do tecido a partir do qual os explantes são isolados. Os resultados do nosso estudo mostraram que para além da influência do tipo de explante usado, a indução e produção de tecido caloso foi também dependente das condições de cultura usadas, nomeadamente da composição do meio nutritivo relativamente aos reguladores de crescimento. A iniciação da divisão celular e subsequente produção de tecido caloso a partir

de um fragmento de tecido requer a presença de uma, ou mais, auxinas, que podem estar combinadas com citocininas na proporção adequada, sendo as auxinas como o ácido indol-acético (IAA), o ácido naftalenoacético (NAA) e o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) os reguladores de crescimento normalmente usados para induzir e produzir tecido caloso, embora as citocininas como a cinetina ou a benzilaminopurina possam ser também incorporadas no meio nutritivo (Hussey, 1980; Hartmann *et al.*, 1990). Segundo Anstis & Northcote (1973), a indução e estabelecimento de tecido caloso a partir de explantes de batateira depende sobretudo das concentrações de auxina e de citocinina que estão presentes no meio de cultura. Para a produção de tecido caloso da planta *S. tuberosum* L. cv. Désirée foram utilizados dois meios de cultura que diferiram nos reguladores de crescimento que estiveram presentes, entre outros aspectos da composição. Um dos meios reuniu o maior número de reguladores de crescimento, incluindo as auxinas IAA e NAA, as citocininas KIN, BA e ZEA e o ácido giberélico; apesar deste meio de cultura se ter apresentado como o mais completo em termos de composição em reguladores de crescimento, a formação de tecido caloso a partir dos explantes de broto e de tubérculo cultivados nesse meio foi baixa, não tendo havido iniciação de tecido nas culturas de fragmentos foliares, o que nos leva a concluir que seja um meio pouco eficaz para a iniciação de tecido caloso. Para além da formação de tecido caloso ser escassa, verificou-se que a indução foi lenta nos explantes de broto e de tubérculo cultivados nesse meio, ocorrendo de forma bastante heterogênea entre os explantes. Contrariamente ao esperado, os explantes foliares não iniciaram a formação de tecido caloso nesse meio de cultura com elevada presença de reguladores de crescimento, sendo esta observação contrária aos resultados obtidos por Fidalgo (1995); este autor para avaliar a possibilidade da utilização das culturas *in vitro* de batateira como modelo experimental para estudos sobre situações adversas provocadas por agroquímicos utilizou culturas de tecido caloso estabelecido, que foram obtidas a partir de fragmentos foliares de plantas da cultivar Désirée cultivados num meio de cultura idêntico ao que foi utilizado neste estudo para a indução de tecido caloso e a partir do qual não obtivemos resposta. Atendendo a que os princípios que foram considerados para a recolha do material vegetal a usar na indução de tecido caloso e que as condições de cultura a que foram expostos os explantes foliares foram os mesmos que os utilizados por Fidalgo (1995), provavelmente factores ligados à preparação dos explantes, assim como o seu tamanho ou as características da planta dadora dos explantes determinaram a diferença de resultados, já que estes são factores igualmente importantes na indução da formação de tecido caloso (Dixon, 1985).

Perante os resultados apresentados, é possível concluir que a utilização do meio nutritivo com vários reguladores de crescimento adicionados para a formação de tecido caloso justifica-se apenas para as culturas de porções de broto; embora a indução tenha ocorrido nos fragmentos de tubérculo em cultura, a proliferação do tecido deu-se a um ritmo muito baixo, o que faz com que o meio de cultura em causa não seja o mais indicado para a formação de tecido caloso a partir de discos de tubérculos. Na tentativa de esclarecer o processo de iniciação e crescimento de tecido caloso da planta de batateira, Anstis & Northcote (1973) utilizaram diferentes combinações de auxinas (NAA, IAA e 2,4-D) com a citocinina cinetina para a formação de tecido caloso a partir de discos de tubérculo, tendo verificado que entre as auxinas usadas o NAA foi o mais eficaz e que a presença da cinetina foi inibitória para a iniciação do tecido e seu crescimento; de acordo com os autores, a inibição exercida pela citocinina exógena foi provavelmente devido aos elevados níveis de citocininas presentes nos tecidos de tubérculo, daí que o meio de indução mais adequado para as culturas de discos de tubérculo será aquele que não tiver citocininas. Com base no trabalho de Anstis & Northcote (1973), e atendendo a que a iniciação da divisão celular e a proliferação de tecido caloso é dependente da interação entre as fito-hormonas endógenas presentes no explante e os reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura (Hartmann *et al.*, 1990), é possível que a baixa formação de tecido caloso observada nos fragmentos de tubérculo cultivados no meio mais completo, associada ao crescimento reduzido do tecido após a sua indução, possam ter resultado da inibição desencadeada pela presença das citocininas cinetina e benzilaminopurina no meio de indução. No entanto, os resultados obtidos recentemente por Esna-Ashari & Villiers (1998) mostraram a produção de tecido caloso em culturas de porções de tubérculo da cv. Désirée no meio nutritivo contendo a auxina 2,4-D e a citocinina BA, o que demonstra que a citocinina não exerceu um efeito inibitório sobre a iniciação e proliferação de tecido caloso. Os estudos realizados por Anstis & Northcote (1973) e por Esna-Ashari e Villiers (1998) contribuíram para reforçar a noção de que para haver produção de tecido caloso é necessária a presença de auxinas e que as citocininas não são necessárias para a iniciação e crescimento do tecido. Neste contexto, Hagen *et al.* (1990) sugeriram a utilização da auxina picloram para a iniciação das culturas de tecido caloso a partir de fragmentos de tubérculo de batateira, bem como para a manutenção dessas culturas, após terem verificado a superioridade deste regulador de crescimento na indução e crescimento de tecido caloso; deste modo, o tecido caloso induzido e estabelecido em meio de cultura com o picloram como regulador de crescimento foi utilizado nos estudos realizados pela equipa de trabalho de Hagen (Muneta *et al.*, 1990; Hagen *et al.*, 1991; Hagen & Muneta, 1993; Hagen *et*

al., 1993), como modelo experimental para investigar o metabolismo dos hidratos de carbono nos tubérculos. Os resultados obtidos por Hagen *et al.* (1990, 1991) levaram-nos a testar o efeito da auxina picloram na produção de tecido caloso da planta de batateira, assim esse regulador de crescimento foi adicionado ao meio nutritivo usado nas culturas dos vários explantes para a indução e formação de tecido caloso. A resposta dos explantes isolados da planta de batateira à presença do picloram no meio de cultura consistiu na rápida iniciação e proliferação de tecido caloso, que decorreu de forma homogênea entre os explantes em cultura, resultando na produção de tecido caloso em abundância. Esta resposta verificou-se nas culturas de fragmentos foliares, de brolho e de tubérculo, contrastando claramente com o que fora observado quando os explantes foram cultivados no meio nutritivo suplementado com diversos reguladores de crescimento, e veio não só confirmar a possibilidade de usar a auxina picloram na produção de tecido caloso a partir das culturas de discos de tubérculo, mas mostrar também que esse regulador de crescimento pode ser usado nas culturas de porções de brolho e de folha para a formação de tecido caloso. A auxina picloram é descrita como sendo um regulador de crescimento com elevada actividade fisiológica, superior à das auxinas NAA e IAA, como tal é recomendada a sua utilização para induzir a rápida proliferação celular (Sigma, 1993); com efeito, o meio de cultura que teve a auxina picloram como regulador de crescimento foi o melhor em termos de indução e crescimento de tecido caloso, por sua vez, o meio que reuniu o maior número de reguladores de crescimento (as auxinas IAA e NAA, diversas citocininas e uma giberelina), e que à partida se apresentou como mais completo, foi o menos eficaz para a iniciação de tecido caloso, o que demonstra a importância da utilização de auxinas com elevada actividade para a produção de tecido caloso a partir das culturas de explantes isolados da planta de batateira e a dispensabilidade das citocininas para esse efeito, ideia que tinha já sido referida por outros autores (Anstis & Northcote, 1973; Hussey, 1980; Jarret *et al.*, 1980; Esna-Ashari e Villiers, 1998).

A formação de tecido caloso de batateira dependeu igualmente da situação de luz empregue durante a cultura dos explantes de brolho e de tubérculo. A indução de tecido caloso é variável com as condições de luminosidade e de obscuridade (Hartmann *et al.*, 1990), e de facto verificou-se que a indução da formação de tecido a partir dos fragmentos de brolho em cultura foi favorecida pela exposição destes à luz, enquanto que a cultura de discos de tubérculo iniciou a formação de tecido quando foi exposta à condição de obscuridade. Embora as culturas de segmentos de brolho tenham iniciado a produção de tecido caloso na obscuridade, a proliferação do tecido foi demasiado lenta em comparação com a que ocorreu à luz, sobretudo nos fragmentos que foram cultivados no meio com diversos reguladores de

crescimento adicionados para a indução, por sua vez, os discos de tubérculo cultivados em qualquer um dos meios usados para a indução não iniciaram a formação de tecido caloso quando estiveram expostos à luz, tendo ocorrido na obscuridade. Ao estudarem a iniciação e o crescimento de tecido caloso proveniente da cultura de fragmentos de tubérculo da planta de batateira, Anstis & Northcote (1973) verificaram que a indução foi rápida quando essa cultura foi sujeita à situação de obscuridade, sendo a luz inibitória para o processo de indução de tecido caloso, e posteriormente outros autores vieram a demonstrar o mesmo (van der Plas & Wagner, 1984; Hawkins & Lips, 1997).

Os resultados do nosso estudo indicam que a indução e produção de culturas de tecido caloso a partir de explantes isolados da planta de *S. tuberosum* L. é dependente do tipo de explante que é colocado em cultura e das condições de cultura empregues, nomeadamente da composição do meio nutritivo em reguladores de crescimento e da presença ou ausência de luz no ambiente de cultura. O processo de proliferação de tecido caloso envolve uma fase inicial de indução em que as células se preparam para a divisão e o metabolismo é activado, sendo esta fase mais ou menos prolongada em função do estado fisiológico das células do explante e das condições de cultura (Hartmann *et al.*, 1990; Dracup, 1991). De facto, verificou-se que a duração da fase de indução, designada fase de latência, foi variável com o tipo de explante em cultura e com a composição dos reguladores de crescimento presente no meio nutritivo, tendo esta fase sido mais rápida na cultura de porções de broto em meio nutritivo acrescido da auxina picloram e na presença de luz, e mais longa com a cultura de discos de tubérculo no meio com vários reguladores de crescimento e na ausência de luz, encontrando-se numa situação intermédia os fragmentos foliares cultivados em meio com o picloram. Contudo, quando os discos de tubérculo foram cultivados no meio nutritivo suplementado com a auxina picloram e mantidos em condições de obscuridade a fase de indução de tecido caloso foi menos demorada em relação à que se verificou nos discos postos em contacto com o outro meio de indução. Assim, a fase de latência para a cultura de segmentos de broto no meio com picloram possivelmente durou cerca de uma semana, uma vez que ao fim desse tempo era visível o início da proliferação de tecido caloso na periferia dos fragmentos, enquanto que para a cultura que esteve em contacto com o meio nutritivo suplementado com os vários reguladores de crescimento, essa fase prolongou-se até às duas semanas. A fase de indução na cultura de discos de tubérculo em meio com picloram estendeu-se às duas semanas antes do aparecimento de tecido caloso, no entanto, após oito dias em cultura os explantes aumentaram ligeiramente de volume, e de acordo com Esna-Ashari e Villiers (1998), esse aumento é indicador da ocorrência de divisões celulares; se de

facto assim for, podemos concluir que houve uma fase de latência de uma semana para a cultura de discos de tubérculo no meio com picloram. Em trabalhos que envolveram a obtenção de tecido caloso da planta de batateira foi referido o início da proliferação de tecido caloso ao fim de oito dias de cultura, sendo de uma semana a duração da fase de latência (Jarret *et al.*, 1980; Jaiswal & Narayan, 1985); para a cultura de discos de tubérculo em meio com a auxina 2,4-D e na ausência da citocinina cinetina, Anstis & Northcote (1973) referiram a ocorrência de uma fase de latência de uma semana antes do aparecimento de tecido caloso.

Uma vez induzida a formação de tecido caloso é necessário assegurar o crescimento do tecido, que é geralmente mantido por transferência para meio de manutenção. Um factor importante a considerar para o estabelecimento do tecido caloso é que o meio nutritivo que foi adequado para a indução de tecido caloso poderá não ser conveniente para a manutenção da cultura, um aspecto que se relaciona sobretudo com os reguladores de crescimento a incluir no meio nutritivo (Anstis & Northcote, 1973; Ahloowalia, 1982; Jaiswal & Narayan, 1985). Nesta perspectiva, optámos por usar um meio de manutenção com a mesma composição básica que um dos meios de indução, tendo sido substituídos os reguladores de crescimento pela auxina 2,4-D e a citocinina BA, e como alternativa, as culturas de tecido caloso foram mantidas no meio usado para a sua indução, ou seja, o meio nutritivo com a presença da auxina picloram que serviu para a indução de tecido a partir dos diferentes explantes isolados foi usado para a manutenção dessas culturas. Da mesma forma que a indução de tecido caloso foi mais rápida nos explantes provenientes de órgãos ou tecidos jovens e à partida fisiologicamente mais activos, ou seja nos explantes isolados de brolho, verificou-se que o crescimento do tecido caloso foi mais rápido quando o tecido foi obtido a partir da cultura dos fragmentos de brolho, tendo o tecido proveniente das culturas de explantes foliares e de tubérculo apresentado um desenvolvimento mais lento, principalmente o derivado da cultura de discos de tubérculo. Segundo Dixon (1985), as culturas de tecido caloso apresentam um crescimento mais rápido se foram obtidas a partir de um explante retirado das partes jovens e fisiologicamente mais activas da planta; neste caso, o tecido caloso obtido das culturas de segmentos de brolho foi o mais fácil de estabelecer em cultura. O mesmo não pode ser referido em relação ao tecido derivado das culturas de discos de tubérculo, cujo crescimento foi o mais difícil de manter em cultura, embora o meio de manutenção utilizado na fase inicial tenha sido fundamental para conseguir o seu estabelecimento. Assim, verificou-se que a manutenção do crescimento do tecido caloso no meio que fora usado para a sua indução a partir da cultura de discos de tubérculo foi a melhor opção, na medida em que nesse meio o seu crescimento foi elevado, permitindo a obtenção de tecido em abundância; por sua vez, a

transferência do tecido para o meio com a presença da auxina 2,4-D e da citocinina BA ainda numa fase inicial do seu estabelecimento não foi bem sucedida, na medida em que o tecido pouco cresceu e acabou por necrosar. A auxina 2,4-D parece ser o regulador de crescimento mais utilizado para a manutenção das culturas de tecido caloso induzidas a partir de vários fragmentos isolados da planta de batateira (Anstis & Northcote, 1973; Ahloowalia, 1982; Jaiswal & Narayan, 1985; Wang & Hu, 1985; Hagen *et al.*, 1991), no entanto, a auxina picloram foi apresentada por Hagen *et al.* (1990) como sendo superior à 2,4-D para o crescimento de tecido caloso proveniente da cultura de fragmentos de tubérculo, devendo ser incluída no meio de manutenção. De facto, verificámos que a manutenção do tecido caloso no meio com picloram durante a fase inicial de estabelecimento resultou na maior proliferação, não só do tecido derivado da cultura de discos de tubérculo, mas também do tecido formado a partir das culturas de explantes foliares e de brolho, relativamente ao que ocorreu no meio com a auxina 2,4-D e a citocinina BA.

Apesar da manutenção das várias culturas de tecido caloso no meio nutritivo suplementado com picloram proporcionar a obtenção de tecido caloso em abundância, o tecido estabelecido neste meio apresentava cor branca, o que indicava a ausência de pigmentos, enquanto que o tecido caloso derivado das culturas de explantes foliares e de brolho e estabelecido no meio de manutenção apresentava uma cor verde pálida, que após algumas repicagens veio a escurecer, e portanto, a ter um teor clorofilino mais elevado. Também Hagen *et al.* (1991) verificaram a ocorrência de algumas diferenças no tecido caloso estabelecido em meio de cultura com picloram em relação ao tecido que foi mantido no meio com a auxina 2,4-D, nomeadamente no teor em amido, que foi superior para o tecido caloso que cresceu no meio com a 2,4-D, o que levou Hagen *et al.* (1993) a desenvolverem uma metodologia para aumentar o teor de amido no tecido caloso estabelecido no meio de cultura com picloram, de modo a que este pudesse ser utilizado como modelo experimental (Hagen & Muneta, 1993). No presente trabalho, com o objectivo que o tecido caloso estabelecido no meio nutritivo com picloram apresentasse um nível superior de clorofilas, as culturas de tecido caloso provenientes dos explantes de brolho, tubérculo e folha e que estavam a crescer no meio com a referida auxina foram transferidas para o meio de manutenção com a auxina 2,4-D e a citocinina BA, e em consequência dessa mudança, conseguimos obter tecido com um teor de clorofilas que foi progressivamente aumentando com a evolução das culturas e também com as repicagens periodicamente realizadas. Assim, e perante a resposta do tecido caloso às alterações nas condições de cultura, é possível concluir que para o reverdecimento do tecido foi determinante a presença da citocinina BA, o que contrasta com os resultados de Anstis &

Northcote (1973), que verificaram que o tecido caloso produzido a partir da cultura de explantes de tubérculo e a crescer em meio sem citocinina ficou verde e, após algumas semanas em cultura, apresentava elevada concentração de clorofilas, concluindo os autores que o tecido caloso estabelecido não exigia a presença de citocinina no meio pois produzia as suas próprias citocininas.

Os resultados relativos à indução e produção de tecido caloso da planta de batateira indicam que vários factores intervêm nesse processo, que vão desde a escolha do explante para iniciar a cultura de tecido caloso, às condições de cultura empregues quer para a indução do tecido quer durante o seu crescimento, sendo particularmente importante a composição do meio nutritivo relativamente aos reguladores de crescimento. A indução de tecido caloso foi bem sucedida através da utilização de porções de broto como explante, tendo sido determinante as condições de cultura aplicadas para a indução de tecido a partir de explantes foliares e de tubérculo; para estas situações, as culturas de fragmentos de tubérculo e de folha no meio nutritivo suplementado com a auxina picloram, submetendo os primeiros à obscuridade, proporcionou os melhores resultados. A manutenção das diversas culturas de tecido caloso no meio com a auxina picloram foi também favorável ao seu desenvolvimento, permitindo a obtenção de tecido em abundância, embora tenhamos verificado que o tecido caloso mantido nesse meio não reverdeceu; sendo assim, considerámos que durante a fase inicial de estabelecimento das culturas de tecido caloso o mais vantajoso para o seu crescimento é a manutenção dessas culturas no meio com o picloram, e logo que o tecido esteja estabelecido deverá ser subcultivado para meio que, para além de auxina, tenha também citocinina, no sentido de aumentar o seu teor de clorofilas.

3.2 – Selecção *in vitro* de linhas celulares de *Solanum tuberosum* L. tolerantes a NaCl

Para a selecção de linhas celulares da planta de batateira tolerantes a NaCl foi utilizada uma cultura estabelecida de tecido caloso obtida a partir de fragmentos foliares de plantas jovens de *S. tuberosum* L. cv. Désirée. Atendendo a que um dos objectivos do nosso trabalho foi a obtenção de tecido caloso a partir das culturas de explantes foliares, de broto e de tubérculo isolados da planta de batateira, seria desejável utilizar o material vegetal obtido e estabelecido recentemente para a selecção de linhas celulares tolerantes à salinidade e posterior estudo bioquímico; no entanto, dadas as limitações de tempo a que o presente trabalho esteve sujeito, e atendendo a que o processo de indução e estabelecimento das diversas culturas de tecido

caloso foi lento, envolvendo vários meses de trabalho, associado à necessidade de se obter tecido caloso em abundância para ser exposto a condições salinas e se iniciar o processo de selecção das linhas celulares tolerantes, acrescido do facto de que após essas linhas serem seleccionadas, elas são multiplicadas para se conseguir material vegetal em quantidade que permita avaliar o seu comportamento a nível bioquímico, considerámos que estes factos são suficientes para justificar a utilização de material vegetal previamente estabelecido e disponível em quantidade para a selecção de linhas celulares tolerantes a NaCl. Por outro lado, verificámos que Leone *et al.* (1994a,b) utilizaram culturas de células em suspensão de batateira estabelecidas há já um certo tempo para obterem linhas celulares adaptadas a baixo potencial hídrico induzido pela presença de polietilenoglicol no meio de cultura, o mesmo acontecendo para a obtenção de linhas celulares de *Nicotiana tabacum* L. resistentes a NaCl (Watad *et al.*, 1983; Binzel *et al.*, 1985).

A cultura estabelecida de tecido caloso foi então submetida a diferentes condições salinas, de forma a permitir a selecção directa de linhas celulares tolerantes a essas condições; para tal, foi preparado meio de manutenção ao qual se adicionou o NaCl em várias concentrações – 50, 100, 150 e 200 mM (ver Material e Métodos). Após o crescimento do tecido durante cerca de 21 dias, no momento em que o tecido em situação normal seria subcultivado para meio fresco, parte do tecido foi transferido para meio com diferentes teores de NaCl, de tal modo, que no final o tecido caloso encontrava-se a crescer em condições de 50, 100, 150 e 200mM de NaCl, para além da situação controlo. Ao fim de alguns dias de cultura (26 dias) foi possível conhecer a resposta do tecido caloso crescido na presença de sal; assim, o tecido caloso que estava a crescer na presença de 50mM de NaCl mostrava o aspecto normal do tecido controlo (Fig. 30), crescendo de forma homogénea e sem perder a cor verde (Fig. 31), o que nos leva a concluir que o tecido não foi afectado pela concentração salina imposta sendo, portanto, tolerante a esse nível de salinidade. Por sua vez, o tecido que foi sujeito à situação de 100mM de NaCl apresentou um comportamento algo heterogéneo entre as várias amostras existentes (Fig. 32), em que se numas era evidente a ocorrência de clorose e o desenvolvimento de áreas de necrose, noutras o tecido parecia não ser perturbado pela presença do sal e continuou a crescer, embora a um ritmo menor do que o do tecido em 50mM. O tecido que esteve exposto ao nível de salinidade de 150mM não cresceu, apresentando-se clorótico para a generalidade das amostras, embora nalgumas delas essa resposta à presença do sal no meio de cultura tenha sido mais rápida do que noutras (Fig. 33); há, no entanto, que referir a existência de pequenas áreas no tecido clorótico que se distinguem pela cor verde que possuem (Fig. 34), o que significa que esses conjuntos celulares resistiram à salinidade imposta. Finalmente, o tecido

caloso que esteve em contacto com o tratamento salino mais elevado (200mM) veio a revelar ao fim de quatro semanas de cultura o aspecto do tecido exposto a 150mM, ou seja, o tecido não manifestou qualquer crescimento, desenvolvendo cloroses nas margens que rapidamente se estenderam a todo o tecido e culminaram com a degenerescência do mesmo (Fig. 35), embora pequenas manchas no tecido conservaram a tonalidade verde e, portanto, não degeneraram, sendo tolerantes à concentração salina de 200mM (Fig. 36).

As linhas celulares que sobreviveram durante a fase de cultura no meio com as concentrações salinas de 100, 150 e 200mM, e que à partida seriam tolerantes ao nível de salinidade a que foram submetidas, foram depois isoladas e transferidas para meio de manutenção sem sal em tubos de cultura, onde foi mantido o seu crescimento. Uma vez que o tecido que cresceu no meio de cultura com 50mM de NaCl mostrou não ser afectado numa fase inicial por essa concentração salina, apresentando um aspecto semelhante ao do tecido que crescia na ausência de sal, optámos por mantê-lo em condições salinas, sendo transferido para os frascos de cultura onde foi cultivado no meio de manutenção com 50mM de NaCl adicionado. Após o crescimento, durante cerca de 26 dias, as linhas seleccionadas tolerantes a NaCl nas concentrações de 100, 150 e 200mM foram novamente submetidas a condições salinas, sendo subcultivadas para meio de manutenção fresco contendo NaCl com as mesmas concentrações que foram usadas para a sua selecção *in vitro*, mas enquanto que as linhas que resistiram em cultura às concentrações de 100 e 150mM de NaCl foram subcultivadas para frascos de cultura, a linha seleccionada por ter subsistido no meio com NaCl na concentração de 200mM foi mantida em tubos de cultura. Esta diferença no procedimento resulta do facto de que no final da passagem por meio sem sal, o crescimento das linhas tolerantes a condições salinas de 100 e 150mM foi bastante superior ao ocorrido na linha tolerante à presença de 200mM de NaCl no meio de cultura (Figs. 37, 38 e 39). Por sua vez, o tecido caloso que já se encontrava a crescer em frascos de cultura na condição salina de 50mM pareceu estar a adaptar-se à salinidade imposta, embora o seu aspecto fosse diferente do observado no tecido controlo, na medida em que o crescimento era claramente inferior ao do tecido controlo e apresentava uma cor verde amarelada que contrastava com a cor verde que era evidente na situação controlo (Fig. 40). No entanto, com a evolução da cultura o tecido caloso exposto a 50mM de NaCl foi-se adaptando progressivamente a essa concentração salina, de tal modo que no final apresentava um aspecto semelhante ao do tecido controlo e que contrastava com o que fora observado na fase inicial de estabelecimento do tecido caloso à condição salina (Fig. 41). A evolução que foi possível assistir na cultura de tecido caloso em 50mM de NaCl também ocorreu nas linhas celulares adaptadas a 100 e 150mM de NaCl, que após a passagem por

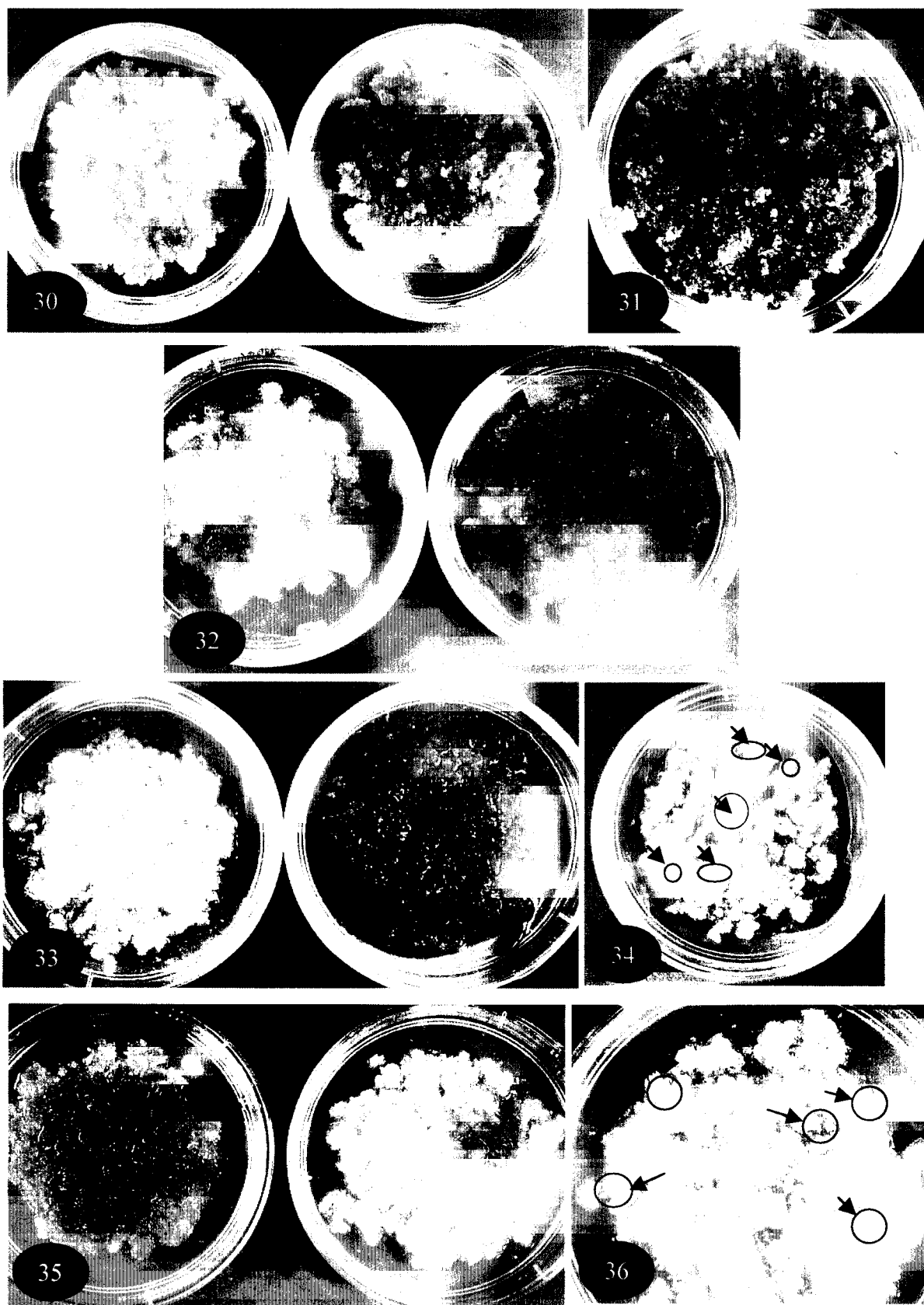


Fig. 30 – Tecido caloso a crescer na presença de 50mM de NaCl (à dir.) e na ausência de NaCl (à esq.) ao fim de 26 dias de cultura. Fig. 31 – Tecido caloso crescido na presença de 50mM de NaCl, onde é evidente a cor verde que o tecido apresenta. Fig. 32 – Aspecto de tecido caloso exposto directamente a 100mM de NaCl após quatro semanas, mostrando um comportamento heterogéneo como se pode observar pelo diferente aspecto das duas placas. Fig. 33 – Imagem de tecido caloso submetido directamente a 150mM de NaCl, ao fim de cerca de quatro semanas, onde se pode ver que o tecido não cresceu, apresentando-se clorótico nalgumas das amostras. Fig. 34 – No tecido caloso sujeito a 150mM de NaCl distinguem-se pequenas áreas verdes (assinaladas com →) no tecido clorótico. Fig. 35 – Aspecto de tecido caloso exposto directamente a 200mM de NaCl ao fim de quatro semanas de cultura, onde é evidente o desenvolvimento de grandes áreas cloróticas. Fig. 36 – Pequenos aglomerados celulares que se distinguem do restante tecido pela diferente tonalidade que apresentavam (assinalados com →).

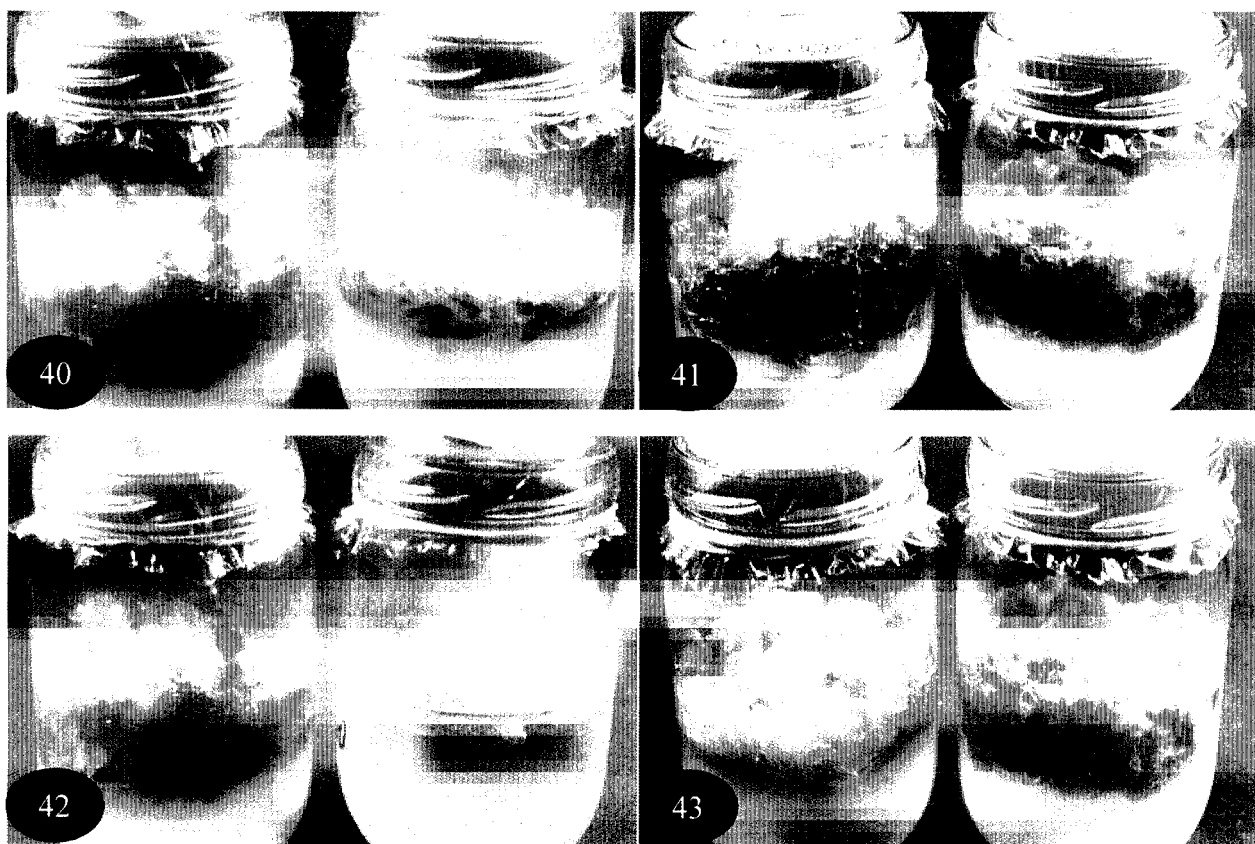
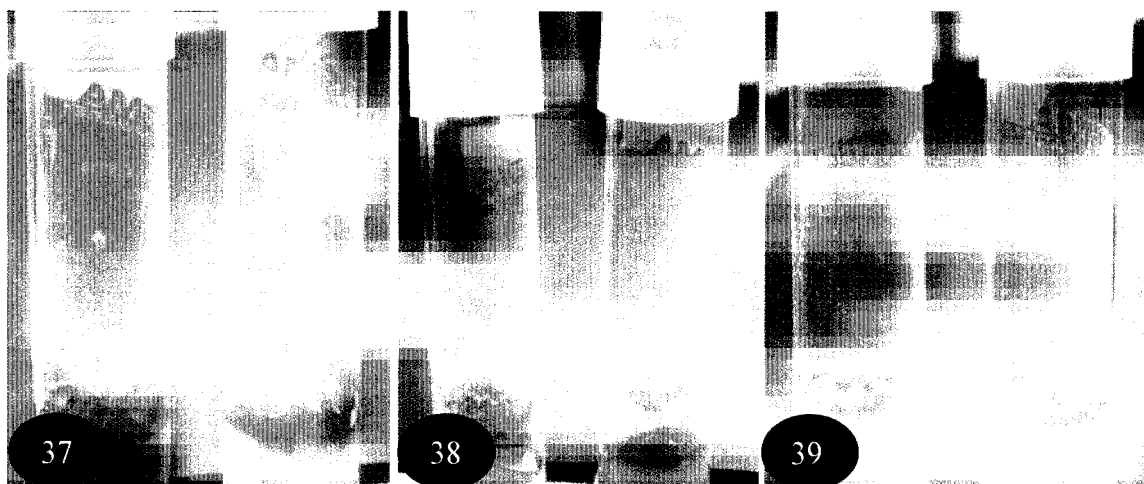


Fig. 37 – Linhas celulares tolerantes a 100mM de NaCl a crescerem em meio nutritivo contendo 0mM de NaCl. Fig. 38 – Linhas celulares tolerantes a 150mM de NaCl a crescerem em meio de manutenção na ausência de NaCl. Fig. 39 – Linhas celulares tolerantes a 200mM de NaCl a crescerem em meio sem NaCl. Fig. 40 – Aspecto de tecido caloso após ter sido mantido durante 42 dias em 50mM de NaCl (à dir.), a contrastar com o aspecto observado no tecido controlo (à esq.). Fig. 41 – Aspecto de tecido caloso adaptado a 50mM de NaCl ao fim de três meses de cultura (à esq.) muito semelhante ao do tecido controlo (à dir.) e que contrasta com o que foi observado na fase inicial de adaptação à condição salina (Fig. 40). Fig. 42 – Imagem de tecido caloso da linha celular obtida por selecção directa exposto durante 42 dias a 100mM de NaCl (à dir.), a contrastar com a imagem do tecido controlo (à esq.). Fig. 43 – Aspecto de tecido caloso da linha celular tolerante a 100mM de NaCl após a subcultura durante três meses (à esq.) e de tecido da situação controlo (à dir.); notar a maior proliferação do tecido adaptado a 100mM de NaCl com cor verde menos amarelada comparativamente ao que foi observado no início do seu estabelecimento (Fig. 42).

meio sem sal, tinham sido colocadas a crescer em meio com NaCl adicionado nas concentrações de 100 e 150mM respectivamente, verificando-se que numa fase inicial o seu crescimento era reduzido em ambas as condições de salinidade (Figs. 42 e 44); todavia, ao longo do tempo e após algumas repicagens, a proliferação de tecido caloso dessas linhas foi aumentando, o mesmo se pode dizer do nível de clorofilas, embora estes fenómenos tenham ocorrido a um ritmo mais baixo para a linha mantida na condição de 150mM (Figs. 43 e 45). Em relação à linha celular que foi mantida no meio com 200mM de NaCl verificou-se que o seu crescimento foi consideravelmente afectado pela elevada salinidade presente no meio de cultura, daí ter sido mantida durante um período alargado de tempo a crescer em tubos de cultura (Fig. 46), no entanto, com a evolução da cultura foi possível multiplicar o tecido caloso adaptado para crescer em meio com elevada concentração salina (200mM) em frascos de cultura (Figs. 47 e 48).

O método que foi atrás descrito, a selecção directa, mostrou ser eficaz para a selecção de linhas celulares tolerantes a diferentes níveis de salinidade; de facto, a sua utilização possibilitou a obtenção de tecido caloso capaz de crescer em cultura na presença de NaCl com as concentrações de 50, 100, 150 e 200mM, sendo assim tolerante a situações de baixa e elevada salinidade. Apesar do sucesso conseguido com o método descrito, ensaiámos outro método em simultâneo com o anterior que, para a obtenção de linhas celulares tolerantes ao sal, baseou-se na exposição gradual do tecido a concentrações salinas progressivamente mais elevadas de modo a promover a sua adaptação. Assim, a partir da cultura de tecido caloso que estava adaptada à situação de menor salinidade (50mM) (Fig. 49), porções desse tecido foram subcultivadas para meio de manutenção contendo 100mM de NaCl, tendo sido verificado que o desenvolvimento do tecido neste meio foi elevado, podendo ser observado na imagem da Fig. 50 a presença de linhas celulares perfeitamente adaptadas a essa condição salina. Depois da obtenção de tecido caloso em abundância tolerante à condição salina de 100mM, parte desse tecido foi transferido para meio de manutenção com NaCl adicionado na concentração de 150mM, tendo o tecido mostrado uma resposta positiva a essa mudança, já que o seu aspecto não divergiu muito daquele que foi observado no tecido adaptado a 100mM e, ao fim de um certo tempo de cultura, a cor verde que o tecido apresentava sugeria que estava adaptado à concentração salina a que foi sujeito (Fig. 51). A exposição do tecido caloso que se encontrava a crescer na presença de 150 mM de NaCl a uma concentração superior de 200mM certamente que iria resultar na produção de tecido capaz de crescer a elevada salinidade e, portanto, do mesmo modo que através deste método de selecção foi possível obter no final tecido caloso a crescer em meio de cultura com NaCl nas concentrações de 100

e 150mM, provavelmente também iríamos ter tecido a crescer em 200mM; no entanto, optámos por não avançar para a obtenção de tecido caloso adaptado à concentração salina de 200mM, se por um lado o nosso objectivo tinha sido já atingido, ou seja, a selecção e obtenção de linhas celulares tolerantes a níveis de salinidade de 50, 100, 150 e 200mM, por outro lado, as limitações de tempo a que o nosso trabalho estava sujeito impediu-nos de acompanhar o processo até à obtenção de tecido caloso adaptado a 200mM por este método. Perante os resultados apresentados, conclui-se que através da selecção directa ou da selecção gradual foi possível ter no final tecido caloso de *S. tuberosum* L. cv. Désirée a crescer na presença de NaCl com as concentrações de 50, 100 e de 150mM, e por selecção directa conseguiu-se obter tecido caloso capaz de crescer na presença de 200mM de NaCl (Figs. 54, 55, 56, 57 e 58); no entanto, e comparando as culturas de tecido caloso tolerantes a 100mM e a 150mM de NaCl que foram obtidas através dos dois métodos de selecção usados, verifica-se que o tecido caloso resultante da utilização do método de selecção gradual foi mais abundante e apresentava cor verde, quer o que estava a crescer em meio contendo 100mM de NaCl quer aquele que estava em 150mM, enquanto que o tecido caloso proveniente de selecção directa, com passagem pelo meio de cultura sem sal, mostrou ser menos abundante e a cor verde amarelada que apresentava nas mesmas condições salinas indicia que teria um teor clorofilino mais baixo (Figs. 52 e 53).

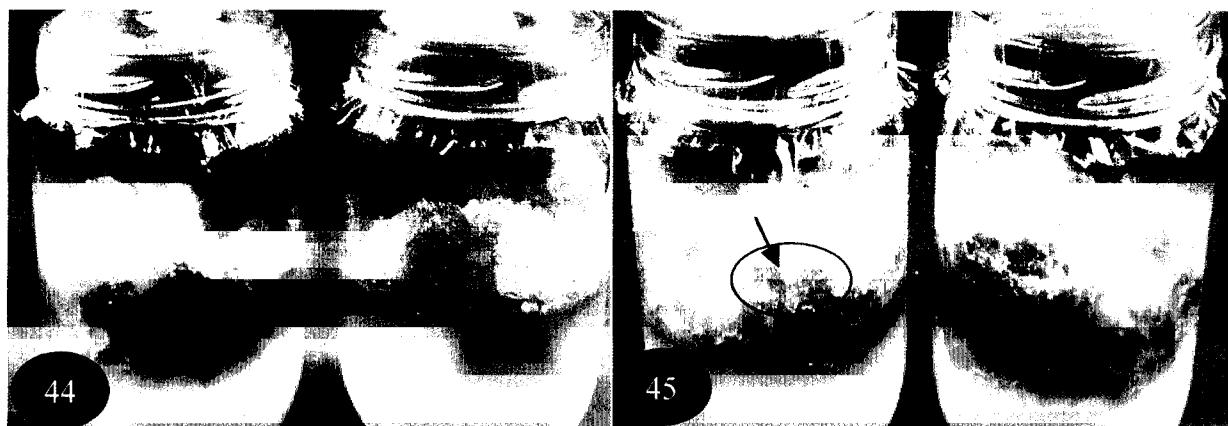


Fig. 44 – Tecido caloso da linha celular tolerante a 150mM de NaCl obtida por selecção directa ao fim de 42 dias de cultura (à dir.); à esquerda pode observar-se tecido controlo. Fig. 45 – Aspecto de tecido caloso crescido na presença de 150mM de NaCl ao fim de três meses de cultura (à esq.), onde são visíveis aglomerados celulares adaptados ao nível de salinidade imposto (assinalados com →), mostrando aspecto semelhante ao do tecido controlo (à dir.).

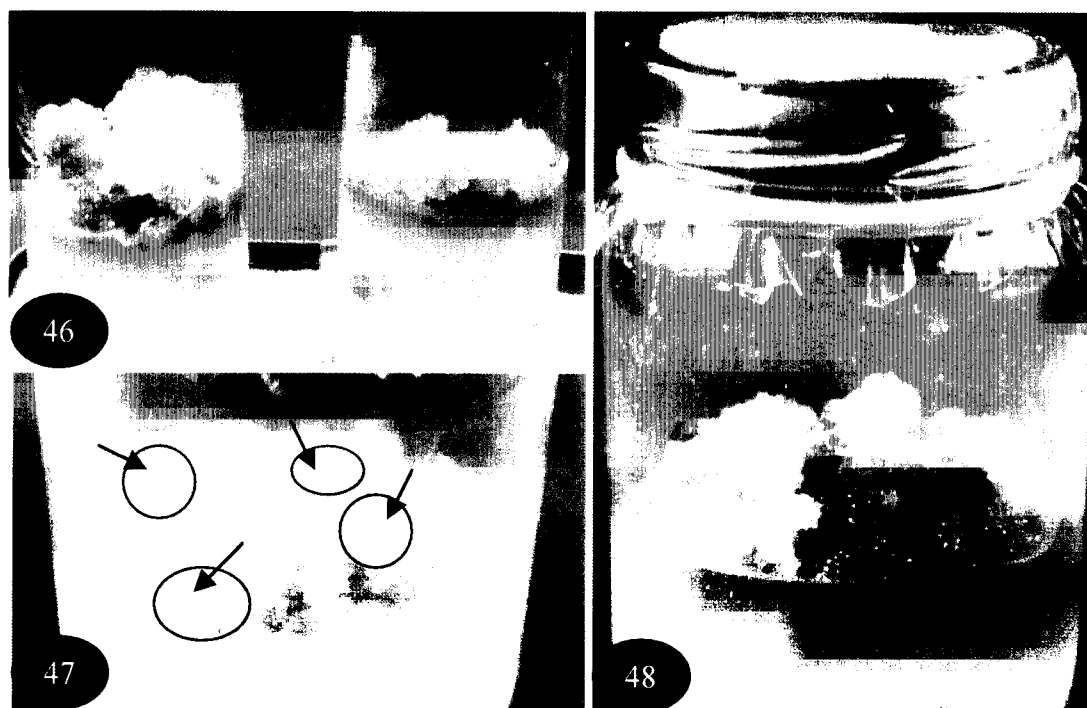


Fig. 46 – Tecido caloso da linha celular tolerante a 200mM de NaCl obtida por selecção directa ao fim de 62 dias de cultura. Fig. 47 – Aspecto de tecido caloso crescido na presença de 200mM de NaCl ao fim de três meses de cultura, onde se podem observar pequenas porções de tecido adaptadas a elevada salinidade (assinaladas com →). Fig. 48 – Imagem de tecido caloso adaptado a 200mM de NaCl passados quatro meses em cultura.

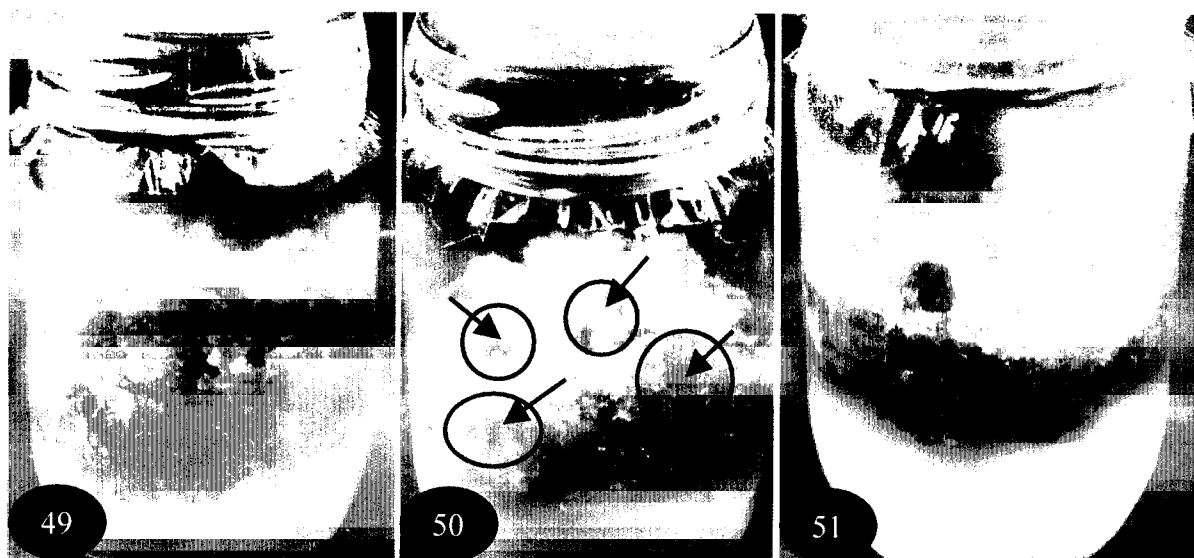


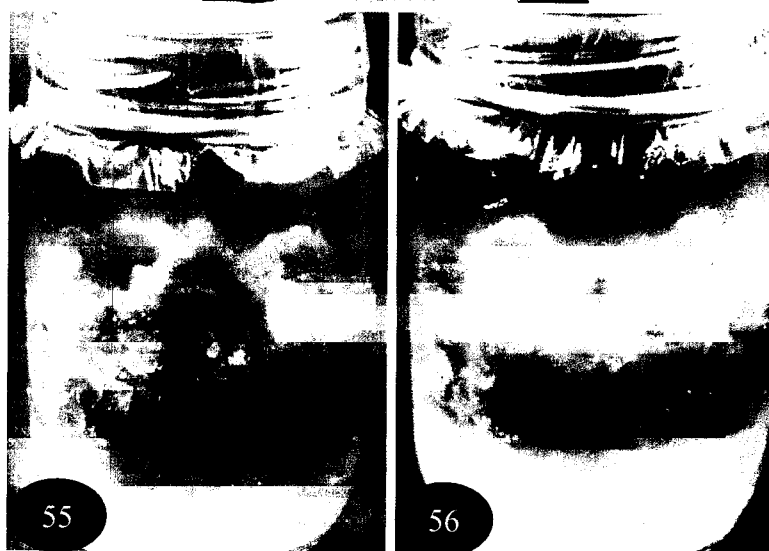
Fig. 49 – Tecido caloso tolerante a 50mM de NaCl passados cerca de 4 meses em cultura. Fig. 50 – Imagem de tecido caloso tolerante a 100mM de NaCl ao fim de 90 dias de cultura; este tecido foi obtido após a subcultura de porções de tecido adaptado a 50mM para meio suplementado com 100mM de NaCl, sendo possível visualizar após 90 dias de cultura linhas celulares adaptadas à condição salina de 100mM (assinaladas com $\odot$). Fig. 51 – Aspecto de tecido caloso tolerante a 150mM de NaCl proveniente da subcultura de porções de tecido tolerante a 100mM em meio contendo 150mM de NaCl; de notar que o aspecto do tecido ao fim de 60 dias não diferia daquele que foi observado no tecido adaptado a 100mM.



Fig. 52 – Tecido caloso tolerante a 100mM de NaCl obtido por selecção gradual (à esq.) e por selecção directa (à dir.). Fig. 53 – Tecido caloso tolerante a 150mM de NaCl obtido por selecção gradual (à esq.) e por selecção directa (à dir.). Quando comparado o tecido caloso proveniente de selecção gradual com o obtido por selecção directa, pode ver-se que o primeiro apresentou maior proliferação e cor verde mais acentuada, enquanto que o tecido resultante de selecção directa mostrou-se menos abundante e com cor verde amarelada; estas observações verificaram-se quer no tecido que estava a crescer em meio contendo 100mM de NaCl, quer no que se encontrava a 150mM.



Fig. 54 – Aspecto de tecido caloso crescido na ausência de NaCl (controle) ao fim de alguns meses de cultura (cerca de 5 meses).



Figs. 55 e 56 – Tecido caloso das linhas celulares tolerantes a 50mM (Fig. 55) e a 100mM de NaCl (Fig. 56), ao fim de aproximadamente 4 meses de cultura.



Figs. 57 e 58 – Tecido caloso crescido na presença de 150mM (Fig. 57) e de 200mM de NaCl (Fig. 58), após cerca de 4 meses em cultura.

A salinidade é considerada o maior factor que afecta a produtividade das culturas em todo o mundo (Subbarao *et al.*, 1990; Hernández *et al.*, 1999; Lovelli *et al.*, 2000; Zhu, 2001), assim a resposta das plantas e os mecanismos que estas desenvolveram para lidar com os ambientes salinos são assuntos que têm sido estudados por muitos autores (Flowers *et al.*, 1977, Greenway & Munns, 1980; Munns & Termaat, 1986; Levy *et al.*, 1988; Gossett *et al.*, 1994a; Niu *et al.*, 1995; Rodriguez *et al.*, 1997; Marcum, 1999; Shannon & Grieve, 1999; Zhu, 2001). As técnicas de culturas *in vitro* começaram por ser utilizadas como o método alternativo para a produção de plantas resistentes ao sal, nomeadamente através da selecção de linhas celulares tolerantes ao sal e posterior regeneração de plantas a partir delas, dado que os métodos tradicionais de melhoramento de plantas tinham tido pouco sucesso na melhoria da resposta das espécies cultivadas à salinidade (Epstein *et al.*, 1980; Smith & McComb, 1981; Ben-Hayyim *et al.*, 1985; Winicov, 1993, 1998; Shannon *et al.*, 1998; Ochatt *et al.*, 1999). Durante os últimos anos a importância das culturas *in vitro* ultrapassou a sua aplicação no campo do melhoramento, uma vez que elas têm sido utilizadas como modelo experimental em determinados estudos fisiológicos e bioquímicos; entre esses estudos, destaca-se o uso das culturas *in vitro* como modelo experimental para investigar os mecanismos de tolerância salina (Binzel *et al.*, 1988; Naik & Widholm, 1993; Lutts *et al.*, 1999; Rus *et al.*, 1999). De acordo com Rains *et al.* (1986), as técnicas *in vitro* oferecem diversas vantagens para estudar os mecanismos fisiológicos e bioquímicos que estão envolvidos na tolerância salina; por um lado, as culturas *in vitro* permitem que as células em cultura se possam adaptar a elevadas concentrações salinas e serem seleccionadas, por outro lado, permitem caracterizar as alterações que ocorrem ao nível celular e que contribuem para a tolerância salina, independentemente dos ajustamentos ao nível dos tecidos e/ou órgãos que podem ocorrer na planta intacta. Para além disto, as culturas de tecidos representam um sistema experimental homogéneo, que pode ser facilmente manipulado, e permitem a obtenção de material vegetal em grande quantidade, num ambiente controlado (Leone *et al.*, 1994b). Estas condições são difíceis de reunir quando são usadas plantas intactas como sistemas experimentais e, por isso, as técnicas de culturas *in vitro* são frequentemente utilizadas para o estudo ao nível celular e molecular do fenómeno de tolerância salina (Ben-Hayyim & Kochba, 1983; Watad *et al.*, 1983; Ben-Hayyim *et al.*, 1985; Binzel *et al.*, 1985; Rains *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 1990b; Hawkins & Lips, 1997).

A selecção *in vitro* de linhas celulares adaptadas à salinidade baseia-se no princípio que, ao submeter-se uma grande população de células a um meio de cultura contendo concentrações de NaCl que afectam negativamente o crescimento da planta intacta, as células em suspensão

e/ou tecido caloso que sobrevivem, mostrando tolerância ao sal, podem então ser isoladas (Rains *et al.*, 1986; Santos, 1997). As linhas celulares tolerantes são geralmente identificadas através do seu crescimento contínuo na presença de sal (Rains *et al.*, 1986), e foi por esta forma que identificámos e seleccionámos as linhas celulares tolerantes a 50, 100, 150 e 200 mM. Uma vez identificadas, estas linhas adaptadas poderiam depois ser transferidas para meios de cultura adequados à regeneração de plantas por embriogénese somática ou organogénese (Rains *et al.*, 1986; Santos, 1997; Ochatt *et al.*, 1999), ou então serem mantidas em condições salinas de modo a permitir a obtenção de material em quantidade suficiente para ser usado na caracterização bioquímica dessas linhas.

A selecção *in vitro* de linhas celulares tolerantes a NaCl foi já conseguida para algumas glicófitas; citam-se como exemplos *Nicotiana tabacum* (Ericson & Alfinito, 1984; Binzel *et al.*, 1985; LaRosa *et al.*, 1985, 1991; Singh *et al.*, 1985, 1987; Watad *et al.*, 1983), *Lycopersicon esculentum* (Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999), *Solanum tuberosum* (Van Swaaij *et al.*, 1986; Sabbah & Tal, 1990; Naik & Widholm, 1993; Ochatt *et al.*, 1999); *Citrus sinensis* e *Citrus aurantium* (Ben-Hayyim & Kochba, 1983; Ben-Hayyim *et al.*, 1985), *Gossypium hirsutum* (Gossett *et al.*, 1996) e *Medicago sativa* (Winicov, 1993). Foram também seleccionadas células de *Solanum tuberosum* tolerantes a 20% de PEG que sobreviveram a 200mM de NaCl por tolerância cruzada (Leone *et al.*, 1994a).

Segundo Santos (1997), a selecção de linhas celulares tolerantes à salinidade pode ser feita por uma ou várias etapas, podendo envolver diferentes técnicas: uma única exposição à salinidade; cultura em concentrações crescentes de NaCl; cultura de células ou tecidos na presença de produtos químicos que aumentem a tolerância à salinidade, como por exemplo o ABA; co-cultura com células previamente adaptadas a stresse salino ou osmótico e que manifestam maior tolerância a NaCl; selecção por tolerância cruzada de células previamente adaptadas a outro sal e que manifestam também tolerância a NaCl. A exposição a um único nível de salinidade e a exposição gradual a níveis de salinidade crescentes são os métodos que mais têm sido usados para a selecção de linhas celulares tolerantes; por exemplo, Ochatt *et al.* (1999) isolaram uma linha celular de batateira tolerante a NaCl através da exposição directa da cultura de tecido caloso a várias concentrações salinas, também em batateira van der Plas & Wagner (1984) obtiveram tecido caloso adaptado ao stresse osmótico após ter sido exposto no meio nutritivo contendo diferentes teores de manitol. Noutros trabalhos, as linhas celulares tolerantes a NaCl foram seleccionadas a partir da transferência das culturas de células em suspensão de *Nicotiana tabacum* (Watad *et al.*, 1983; Binzel *et al.*, 1985) ou de tecido caloso de *Gossypium hirsutum* (Gossett *et al.*, 1996) e de *Lycopersicon esculentum* (Rodríguez-

Rosales *et al.*, 1999) para meio com concentrações salinas crescentes. No entanto, e recorrendo a outras técnicas, foi também possível seleccionar linhas celulares tolerantes à salinidade de *Solanum tuberosum*, conforme se verificou com as culturas de células em suspensão adaptadas às concentrações de 150 e 200mM de NaCl que foram obtidas após a pré-adaptação ao stresse osmótico induzido pelo manitol (Sabbah & Tal, 1990) e pelo PEG (Leone *et al.*, 1994a) respectivamente, ou então aplicando uma técnica diferente, que baseada na selecção de linhas celulares resistentes a substâncias análogas de aminoácidos, permitiu a obtenção de linhas celulares tolerantes a NaCl, tal como Van Swaaij *et al.* (1986) mostraram; estes autores isolaram linhas celulares tolerantes a NaCl através da selecção de linhas resistentes a hidroxiprolina, uma substância análoga da prolina, em que a tolerância dessas linhas foi induzida pela acumulação do aminoácido prolina.

No caso presente, para a selecção de linhas tolerantes a NaCl, a cultura estabelecida de tecido caloso de *S. tuberosum* foi sujeita a stresse salino seguindo dois métodos de selecção, a selecção directa, em que o tecido caloso foi cultivado no meio contendo NaCl nas concentrações de 50, 100, 150 e 200mM, e a selecção gradual, no qual parte do tecido caloso que era mantido em condições de 50mM foi transferido para meio de cultura com níveis de salinidade crescentes, respectivamente 100 e 150mM de NaCl. Ambos os métodos utilizados revelaram ser eficazes na selecção de linhas celulares tolerantes a NaCl, no entanto, o método da selecção gradual foi aquele que permitiu, de uma forma mais rápida e sem se registarem perdas de material devido a mortalidade, a obtenção de tecido caloso das linhas celulares adaptadas a vários níveis de salinidade. Em contrapartida, a selecção directa foi eficaz na medida em que possibilitou a selecção de linhas celulares tolerantes nas culturas de tecido caloso que foram expostas a elevadas concentrações salinas (150 e 200mM de NaCl), mas para tal verificaram-se elevadas perdas de tecido caloso nessas culturas ao fim de um certo tempo. Para além disto, verificámos que a adaptação gradual a elevadas concentrações de NaCl esteve associada à aquisição de uma cor verde mais escura e ao aumento da compacticidade do tecido caloso, bem como à maior abundância de tecido, enquanto que o tecido caloso tolerante a 100 e 150mM de NaCl obtido da selecção directa apresentava consistência menos compacta e menos granulosa, associada à cor verde amarelada e a um ritmo de crescimento inferior ao observado para o anterior. Também Santos (1997) concluiu que o melhor método para a selecção de linhas adaptadas a NaCl de *Helianthus annuus* foi o da selecção gradual, dado que as culturas de tecido caloso quando foram expostas gradualmente a meios com concentrações crescentes de sal, adquiriram uma elevada capacidade para crescer em concentrações extremas de NaCl, consideradas letais para a planta

intacta. De acordo com Leone *et al.* (1994a), a adaptação gradual ao aumento de intensidade de um dado factor de stresse, uma condição que ocorre naturalmente, permite os ajustamentos estruturais e metabólicos que são determinantes para o equilíbrio homeostático compatível com o stresse que foi imposto; estes autores (Leone *et al.*, 1994b) mostraram que a exposição gradual ao stresse osmótico permitiu que a cultura de células em suspensão de *Solanum tuberosum* continuasse a crescer a um potencial hídrico que à partida inibia o crescimento das células directamente expostas a essa intensidade de stresse. No caso do stresse salino, Watad *et al.* (1983) demonstraram que a capacidade das culturas de células em suspensão de *Nicotiana tabacum* para resistirem a níveis de salinidade crescentes e serem tolerantes a 200mM de NaCl foi adquirida de forma gradual, já que a exposição directa a 200mM de NaCl foi letal para as culturas.

Uma vez seleccionadas as linhas celulares, a estabilidade da tolerância salina é, em geral, avaliada ao nível do tecido caloso e das células em suspensão pela cultura alternadamente na presença e ausência do sal (Ben-Hayyim & Kochba, 1983; Rains *et al.*, 1986); em algumas das linhas celulares que foram seleccionadas observou-se a estabilidade da tolerância à salinidade após transferências alternadas para meios com e sem NaCl (Ben-Hayyim & Kochba, 1983; Watad *et al.*, 1983; Binzel *et al.*, 1985; Santos, 1997; Ochatt *et al.*, 1999). No trabalho presente não foi feito o estudo da estabilidade da tolerância salina nas culturas de tecido caloso tolerantes, no entanto, após a transferência para meio de manutenção sem NaCl das linhas que sobreviveram em cultura a 100, 150 e 200mM de NaCl verificou-se que, apesar de serem tolerantes a elevadas concentrações salinas, essas linhas apresentaram baixo crescimento na ausência de NaCl, sobretudo a linha que foi isolada a 200mM de NaCl que mostrou um crescimento muito reduzido ou quase inexistente, tendo algumas amostras dessa linha não sobrevivido na ausência de NaCl. As linhas celulares de *Helianthus annuus* tolerantes a 200 e 300mM de NaCl necessitaram da presença de NaCl para atingirem taxas de crescimento máximas e as linhas tolerantes a 300mM de NaCl não sobreviveram na ausência de NaCl (Santos, 1997); para Rains *et al.* (1986) quando as linhas celulares seleccionadas não crescem bem na ausência de sal, mostrando um crescimento superior no meio com sal, significa que a tolerância salina foi mantida ao longo de gerações de células em cultura e, segundo este autor, a manutenção da tolerância após o crescimento em meio com ausência de NaCl sugere que as linhas celulares seleccionadas podem ser mutantes. Atendendo às considerações feitas, é possível admitir que a tolerância salina foi mantida após a passagem das linhas tolerantes a 100, 150 e 200mM de NaCl pelo meio de cultura sem sal.

As linhas celulares tolerantes à salinidade que foram seleccionadas por vários autores têm sido caracterizadas a vários níveis, em que a maioria dos estudos realizados nesta área têm incidido na comparação a nível morfológico e bioquímico de culturas de células em suspensão ou de tecido caloso não adaptadas com culturas adaptadas seleccionadas *in vitro* e a crescer a diversos níveis de salinidade (Ben-Hayyim & Kochba, 1983; Binzel *et al.*, 1985, 1988; LaRosa *et al.*, 1985, 1991; Singh *et al.*, 1985; Gossett *et al.*, 1996; Gueta-Dahan *et al.*, 1997). No caso presente, foi também nosso objectivo caracterizar as linhas celulares de *S. tuberosum* L. cv. Désirée que foram seleccionadas para crescer em cultura na presença de diferentes concentrações de NaCl, e nesse sentido foi comparado o comportamento do tecido caloso não adaptado a NaCl com o do tecido tolerante a crescer em condições salinas, contribuindo assim para o conhecimento de alguns dos mecanismos que estão envolvidos na tolerância ao stresse salino.

3.3 – Estudos em tecido caloso de *Solanum tuberosum* L. tolerante a diferentes níveis de salinidade

3.3.1 – Crescimento de tecido caloso

O crescimento de tecido caloso foi expresso em termos de crescimento absoluto, isto é, percentagem de aumento de peso fresco de tecido ao fim de 35 dias de cultura nas condições salinas (0, 50 e 100mM de NaCl) estudadas. Como se pode observar pela análise da Tabela 1 e Gráfico 1, o crescimento do tecido caloso foi afectado negativamente pela presença de NaCl no meio de cultura. Apesar do tecido caloso estar aparentemente adaptado para crescer na presença de 50mM e de 100 mM de NaCl, apresentou um crescimento inferior à média observada para o tecido não adaptado e a crescer na ausência de NaCl. A exposição a 50mM de NaCl afectou significativamente o crescimento do tecido caloso, de tal modo que registámos uma redução do crescimento de 41% face ao controlo, que foi ainda mais acentuada no tecido em 100mM de NaCl (55%). Embora a representação gráfica dos valores obtidos na quantificação do crescimento não mostre uma variação muito elevada entre o crescimento do tecido caloso adaptado a 50mM e o do tecido adaptado a 100mM de NaCl, a análise estatística revelou que essa diferença (24%) foi significativamente diferente. Face a estes resultados considerámos que o crescimento do tecido caloso das linhas celulares tolerantes a 50mM e a 100 mM de NaCl está relacionado negativamente com o aumento da concentração de NaCl no meio.

Tabela 1 – Crescimento em tecido caloso cultivado na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura.

Crescimento (%)		
0mM	50mM	100mM
263,14 ± 25,12 ^a	155,5 ± 10,09 ^b	117,71 ± 9,32 ^c

Valores expressos como médias ± E.P. (n=8). Os valores assinalados na linha com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05).

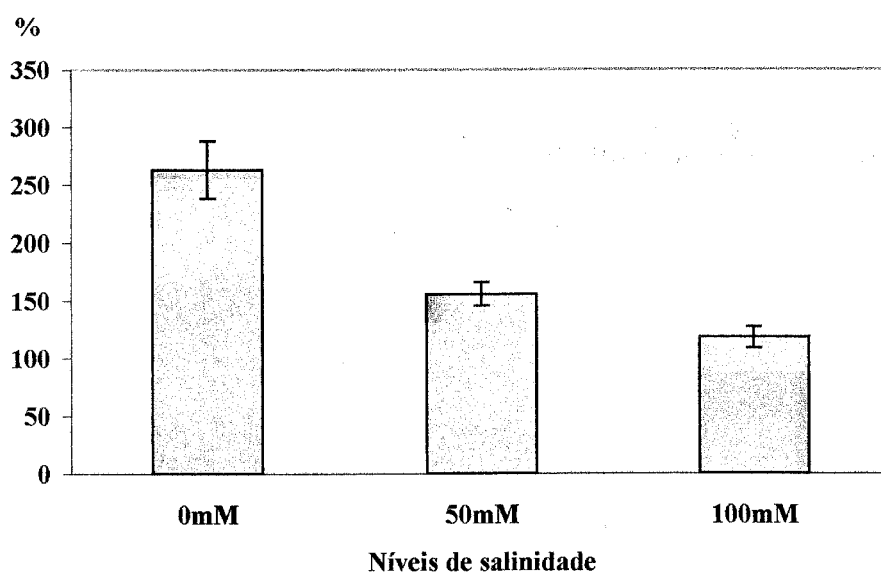


Gráfico 1 – Crescimento quantificado no tecido caloso cultivado na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura. Valores expressos como médias ± E.P.

3.3.2 – Conteúdo hídrico no tecido caloso

A quantificação do teor de água acumulado no tecido caloso mostrou que este possui elevado conteúdo hídrico (98%), daí a consistência friável com que fomos confrontados ao longo da sua manutenção. O teor de água no tecido da linha celular tolerante a 50mM de NaCl e mantido nessa condição salina não alterou significativamente em relação ao conteúdo que era encontrado no tecido caloso crescido na ausência de NaCl, o que veio a ocorrer quando o tecido caloso tolerante a 100mM de NaCl esteve exposto a este nível de salinidade. A

diferença registada no teor de água entre o tecido sujeito a 50mM e o que esteve exposto a 100mM de NaCl foi de apenas 1%, mas essa variação foi revelada pela análise de variância como sendo significativa. Apesar do nível de salinidade mais elevado ter provocado uma redução no conteúdo hídrico estatisticamente significativa, os nossos resultados demonstram que qualquer que seja a condição de salinidade aplicada o teor de água no tecido caloso diminui.

Tabela 2 – Conteúdo hídrico em tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura.

Conteúdo de água (%)		
0mM	50mM	100mM
$98 \pm 0,057^a$	$97,47 \pm 0,217^a$	$96,52 \pm 0,025^b$

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

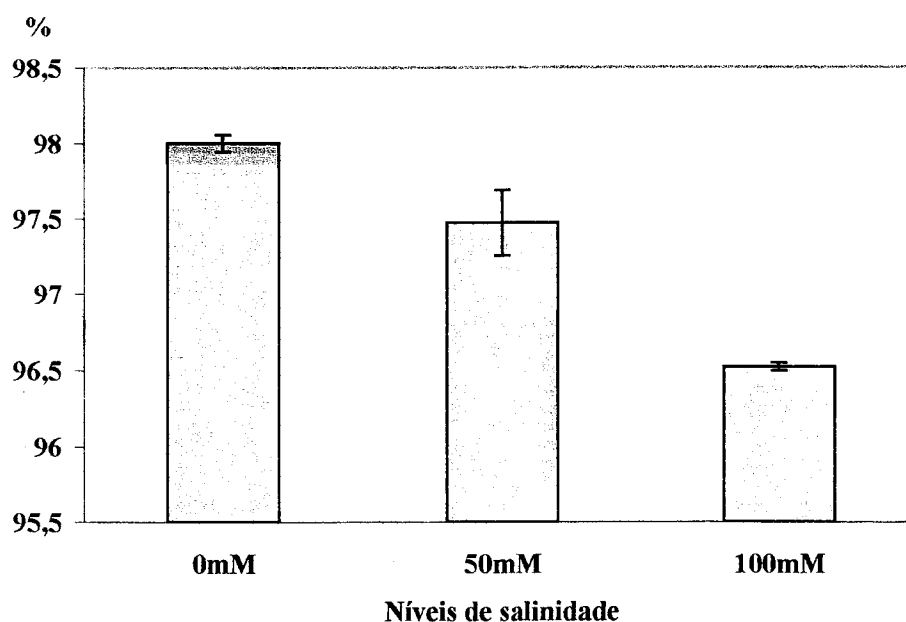


Gráfico 2 – Conteúdo hídrico quantificado no tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura. Valores expressos como médias $\pm$ E.P.

No tecido caloso de *S. tuberosum* L. cv. Désirée registou-se um decréscimo do crescimento das linhas celulares tolerantes a 50mM e a 100mM de NaCl com o aumento da salinidade no meio de cultura. Essas linhas apesar de estarem perfeitamente adaptadas para crescer em meio de cultura contendo 50mM e 100mM de NaCl respectivamente, face ao aspecto que o tecido caloso exibia como a cor verde e a compacticidade aparente, apresentaram um crescimento inferior à média registada no tecido caloso que era mantido na ausência de NaCl. Paralelamente, verificou-se que a manutenção dessas linhas celulares no meio de cultura contendo NaCl nas concentrações 50mM e 100mM provocou uma redução no teor de água, sendo essa redução significativa para o tecido caloso exposto a 100mM de NaCl. A redução do crescimento é considerado por muitos autores o principal efeito da salinidade, daí ser um critério largamente utilizado na comparação da resistência à salinidade entre as plantas (Robinson *et al.*, 1983; Hernández *et al.*, 1993; Naik & Widholm, 1993; Gossett *et al.*, 1994a; Alhagdow *et al.*, 1999; Rashid *et al.*, 1999; Rus *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2000). Do mesmo modo que no sistema *in vivo*, a resposta geral à salinidade na situação *in vitro* reside na diminuição do crescimento, sendo essa redução proporcional com o aumento da concentração salina (Smith & McComb, 1981; Rains *et al.*, 1986; Yang *et al.*, 1990b; Naik & Widholm, 1993; Gossett *et al.*, 1994b; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Rus *et al.*, 1999). Para Zhu (2001) a diminuição do crescimento é uma característica necessária para a sobrevivência da planta sob stresse salino, permitindo-lhe acumular diversos recursos para lidar com a salinidade; segundo o autor, o grau de tolerância à salinidade parece estar inversamente relacionado com o crescimento. Com efeito verificou-se que o tecido caloso adaptado ao maior nível de salinidade (100mM de NaCl) apresentou o menor valor médio de crescimento, enquanto que o maior valor foi registado para o tecido não adaptado e a crescer na ausência de NaCl. No tecido caloso de *Gossypium hirsutum* L., o maior crescimento foi também verificado para a linha celular não tolerante e mantida no meio de cultura contendo 0mM de NaCl, para decrescer nas linhas tolerantes que estavam expostas a 75mM e a 150mM de NaCl, tendo a diminuição sido significativa no tecido cultivado na presença de 150mM de NaCl (Gossett *et al.*, 1994b); no nosso estudo, verificámos que o crescimento do tecido caloso foi afectado significativamente por todas as condições de salinidade a que esteve sujeito, daí que este resultado em relação ao que fora observado no tecido caloso de *Gossypium hirsutum* seja consequência do facto do algodoeiro ser considerado uma planta tolerante à salinidade e da batateira ser referida como uma planta moderadamente tolerante (Shannon & Grieve, 1999; Katerji *et al.*, 2000).

De acordo com Zhu (2001), a diminuição do crescimento que está associada ao stresse salino pode resultar da inibição da divisão e expansão celular desencadeada pela salinidade; recentemente, Wang *et al.* (1998) verificaram que a expressão do inibidor ICK1 ('inhibitor cyclin-dependent-protein-kinase') na *Arabidopsis thaliana* foi induzida pelo ácido abscísico e, dado que a salinidade induz a acumulação desta fito-hormona (Chandler & Robertson, 1994), para Zhu (2001), o stresse salino pode inibir a divisão celular através da acumulação de ácido abscísico que, por sua vez, induz a expressão do inibidor ICK1 e este vai reduzir a actividade das proteínas cinases, importantes no ciclo celular, impedindo assim a divisão celular. A redução na dimensão das células é uma característica que é também observada nas células cultivadas em condições salinas (Binzel *et al.*, 1985, 1988); de facto, Binzel *et al.* (1985) verificaram que a diminuição do crescimento das células de *Nicotiana tabacum* em suspensão adaptadas a 428mM de NaCl foi sobretudo devido à redução no tamanho dessas células, sendo estas quatro a cinco vezes mais pequenas do que as células não adaptadas. Também Santos *et al.* (1995) detectaram reduções nas dimensões das células de tecido caloso de girassol tolerante a 300mM de NaCl relativamente às células não adaptadas. A reduzida expansão celular que está associada à adaptação das células em suspensão ou de tecido caloso a NaCl poderia ser atribuída à perda de água que se verifica nessas células (Bray *et al.*, 2000); os resultados obtidos neste trabalho referentes ao conteúdo hídrico mostraram que o teor de água contido no tecido caloso diminuiu com o aumento do nível de salinidade a que o tecido estava sujeito, verificando-se que a razão peso fresco/peso seco foi mais baixa no tecido da linha celular adaptada a 100mM. À semelhança do que foi encontrado para as linhas celulares de *S. tuberosum*, no tecido caloso de uma outra solanácea (*Lycopersicon esculentum*) o conteúdo hídrico diminuiu com o aumento de NaCl no meio de cultura, embora a perda de água tenha sido significativa no tecido mantido na concentração salina de 150 mM (Rus *et al.*, 1999); também nas células em suspensão de *Nicotiana tabacum* adaptadas a 428mM de NaCl o teor de água foi significativamente inferior ao encontrado nas células não adaptadas (Binzel *et al.*, 1985). Estes resultados confirmam que uma das respostas do tecido caloso mantido num ambiente salino é, para além do decréscimo de crescimento, a redução no conteúdo de água, que no caso presente foi significativa a elevada concentração salina (100mM).

A redução do conteúdo hídrico que foi observada no tecido caloso cultivado em meio salino é, segundo Dracup (1991), devido à elevada pressão osmótica que existe no meio de cultura salino, daí que para o autor, a tolerância salina está relacionada com a capacidade do tecido caloso para resistir à desidratação. De facto, a diminuição no conteúdo hídrico que foi detectada nas células em suspensão da planta de tabaco e nas células de tecido caloso de

tomateiro tolerantes a NaCl não comprometeu a manutenção da turgescência nessas células; Rus *et al.* (1999) verificaram que o decréscimo no teor de água induzido pela salinidade no tecido caloso esteve associado à diminuição do potencial osmótico do tecido, ajudando assim a manter a turgidez celular, e resultados semelhantes foram encontrados para as células de *Nicotiana tabacum* tolerantes a 428mM de NaCl, em que nestas células a ocorrência do ajustamento osmótico resultou num aumento significativo da turgescência relativamente às células não adaptadas (Binzel *et al.*, 1985). Face a estes resultados, a redução da expansão celular não foi devida à incapacidade das células adaptadas a elevado nível de salinidade para manterem a turgescência, para Binzel *et al.* (1985) a reduzida expansão verificada nessas células foi consequência de factores que directa ou indirectamente influenciam as propriedades da parede celular. Passados alguns anos sobre os trabalhos de Binzel *et al.* (1985, 1988) ainda não está devidamente esclarecida a ligação entre o stresse salino e a expansão celular; de acordo com Zhu (2001), é possível que a salinidade impeça a expansão celular por interferir na concentração das fito-hormonas que estão envolvidas na regulação do alongamento celular.

3.3.3 – Determinações bioquímicas

Após se terem multiplicado as linhas celulares tolerantes a 50mM e a 100mM de NaCl para a obtenção de tecido caloso em abundância, foi possível iniciar o estudo de diversos parâmetros bioquímicos que são alterados em resposta à salinidade do meio, sendo que alguns desses parâmetros estão envolvidos na tolerância das linhas celulares ao stresse salino.

Os resultados obtidos para os parâmetros analisados foram apresentados em termos de peso fresco; no entanto, tendo presente o elevado conteúdo hídrico que o tecido caloso apresenta e as alterações que poderão ocorrer no padrão de variação em consequência desse facto, os valores obtidos nas determinações realizadas foram expressos em peso fresco e em peso seco, para confirmar se o padrão de variação entre as situações estudadas era alterado pela expressão dos resultados em peso seco ou em peso fresco. Por outro lado, nos vários trabalhos que utilizaram culturas de células ou de tecido caloso tolerantes a elevados níveis de NaCl seleccionadas *in vitro* para caracterizar a nível bioquímico a tolerância salina, os resultados dos parâmetros analisados foram expressos em peso fresco (Gossett *et al.*, 1994b, 1996; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Bueno *et al.*, 1998; Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999), daí que tal facto tenha contribuído para a nossa decisão de apresentar os resultados obtidos expressos em peso fresco.

→ Clorofilas

Os níveis de clorofilas (a+b) quantificados ao fim de 35 dias de crescimento foram inferiores em cerca de 45% para o tecido caloso crescido em meio com um nível de NaCl de 50mM, para a redução ser de 48% no tecido que esteve a crescer na presença de 100mM de NaCl (Tabela 3 e Gráf. 3). Para este decréscimo no teor clorofilino contribuiu sobretudo o teor de clorofila a, que foi afectado significativamente pelas concentrações salinas de 50mM e de 100mM de NaCl, de tal modo que o seu valor decresceu 51 e 52% respectivamente, em relação ao valor registado na situação controlo; o teor de clorofila b também decresceu significativamente em face da salinidade do meio de cultura, embora surgisse menos diminuído do que o teor de clorofila a.

Tabela 3 – Teor de clorofilas a+b em tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura.

Clorofilas a+b (µg/gp.f.)		
0mM	50mM	100mM
36,33 ± 1,85 ^a	19,91 ± 0,33 ^b	18,98 ± 0,95 ^b

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

Comparando o conteúdo de clorofilas no tecido caloso mantido em condições salinas com o tecido não adaptado e crescido na ausência de sal, verificou-se que a presença de NaCl no meio de cultura provocou variação no teor de clorofilas (Tabela 3) e alterou também a razão clorofila a/clorofila b; no entanto, a variação observada de cerca de 5% entre o tecido na condição de 50mM e o tecido exposto a 100mM de NaCl não teve significado estatístico. Embora o conteúdo clorofilino fosse semelhante nas duas situações salinas estudadas, a razão clorofila a/b foi maior no tecido sujeito a 100mM de NaCl.

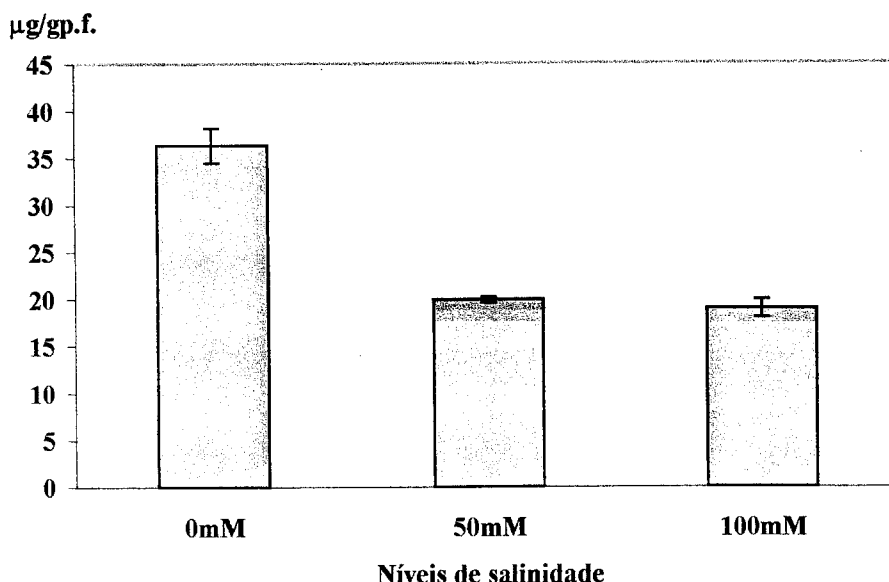


Gráfico 3 – Teor de clorofilas a+b quantificado no tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura. Valores expressos como médias $\pm$ E.P.

→ Carotenóides

A análise dos resultados, expressos com base no peso fresco, que são apresentados na Tabela 4 mostra que a exposição do tecido caloso a NaCl na concentração de 50mM provocou uma diminuição significativa no teor de carotenóides, de cerca de 17%, enquanto que ocorreu uma redução sem significado no tecido que esteve exposto a 100mM de NaCl (7%). Para completar esta análise, registou-se a ocorrência de uma diferença sem qualquer significado estatístico na quantidade de carotenóides no tecido caloso mantido no maior nível de salinidade relativamente ao tecido que se encontrava no nível de salinidade inferior (Gráf. 4).

Tabela 4 – Teor de carotenóides em tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura.

Carotenóides (µg/gp.f.)		
0mM	50mM	100mM
6,49 $\pm$ 0,11	5,41 $\pm$ 0,08*	6,05 $\pm$ 0,36

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

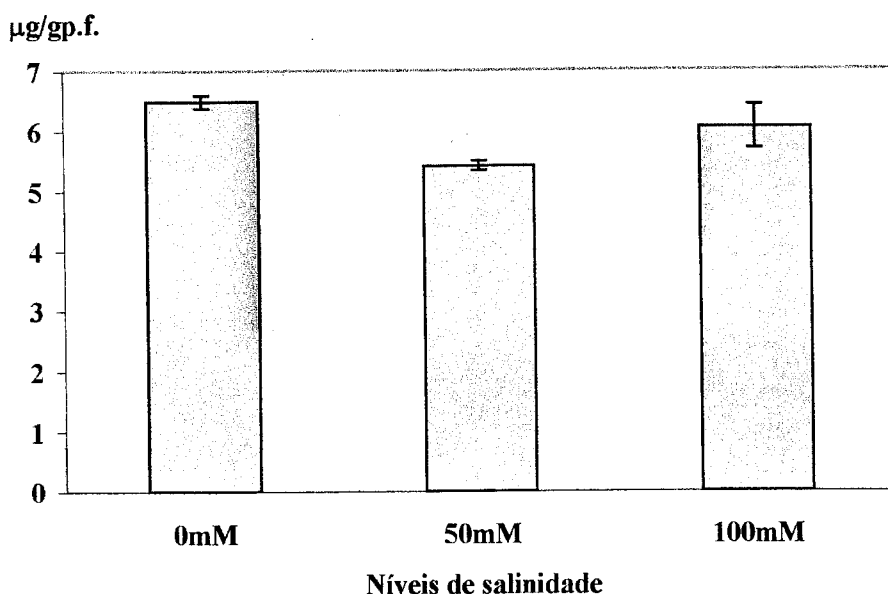


Gráfico 4 – Teor de carotenóides quantificado no tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura. Valores expressos como médias $\pm$ E.P.

Contudo, quando os resultados relativos ao teor de carotenóides foram expressos por g de peso seco verificou-se que o padrão de variação do pigmento foi alterado em relação ao que foi apresentado para os valores expressos em peso fresco (Tabela 4'); se por um lado, o conteúdo de carotenóides no tecido caloso diminuiu significativamente com o aumento da concentração de NaCl no exterior, por outro lado não foi registado no tecido caloso em contacto com o NaCl na concentração de 100mM qualquer acréscimo no teor deste pigmento em relação ao valor quantificado no nível de salinidade inferior (50mM), pelo contrário, a quantidade do pigmento foi diminuída em 19%.

Tabela 4' – Teor de carotenóides em tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura.

Carotenóides (µg/gp.s.)		
0mM	50mM	100mM
324,28 $\pm$ 5,42 ^a	214,0 $\pm$ 3,28 ^b	174,17 $\pm$ 10,58 ^c

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

→ Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica produz uma diversidade de compostos carbonil reactivos, entre os quais está o malondialdeído (MDA), que pode ser usado para avaliar a extensão do processo (Gueta-Dahan *et al.*, 1997). Sendo assim, a peroxidação lipídica foi determinada através da quantificação de MDA, à semelhança de outros trabalhos (Hernández *et al.*, 1993; Gossett *et al.*, 1994a; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Bueno *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 1999).

Tabela 5 – Teor de malondialdeído (MDA) em tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura.

MDA (nmoles/gp.f.)		
0mM	50mM	100mM
9,29 ± 0,27 ^a	10,98 ± 0,33 ^b	13,76 ± 0,46 ^c

Valores expressos como médias ± E.P. (n=6). Os valores assinalados na linha com diferentes expoentes são significativamente diferentes (P<0,05).

A quantificação do malondialdeído, produto da peroxidação lipídica, acumulado no tecido caloso mostrou que ocorreu um aumento acentuado no tecido caloso crescido em condições salinas relativamente ao valor médio quantificado na situação testemunha (0mM), com aumentos de cerca de 18% para o tecido exposto a 50mM de NaCl e de 48% para o tecido a 100mM de NaCl (Tabela 5 e Gráf. 5). Assim, verificou-se que as duas condições salinas estudadas aumentaram significativamente o nível de MDA acumulado, embora o valor quantificado no tecido caloso mantido a 100mM era superior ao do tecido na situação de 50mM em cerca de 25%, uma diferença que se revelou significativa (Tabela 5).

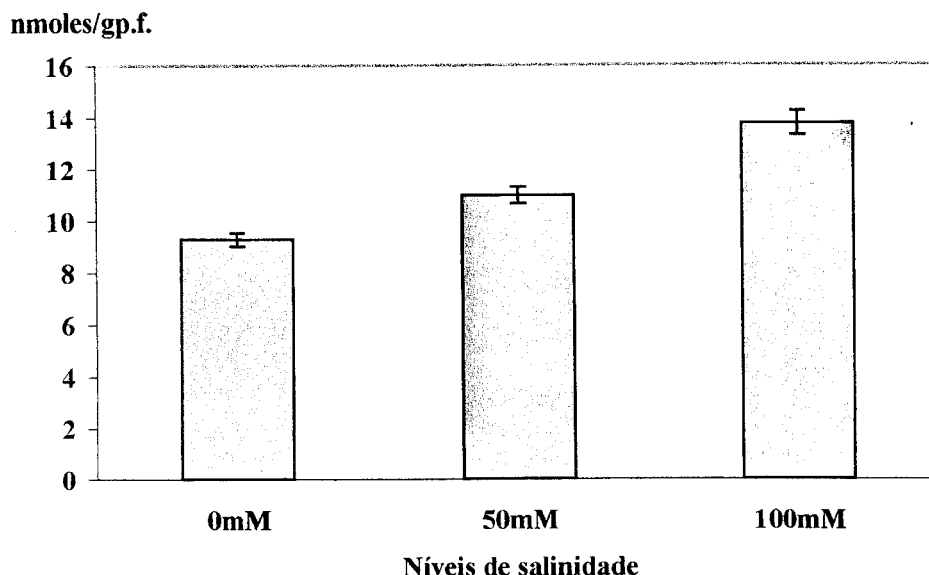


Gráfico 5 – Teor de malondialdeído (MDA) quantificado no tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura. Valores expressos como médias $\pm$ E.P.

Ao verificarmos se surgiam alterações no padrão de variação dos níveis de MDA quando eram expressos por g de peso seco, fomos confrontados com a diminuição do nível acumulado no tecido caloso com o aumento da concentração de NaCl no meio de cultura, sendo que a diferença encontrada entre o tecido controlo e o tecido sujeito a 50mM de NaCl não tinha significado, enquanto que no tecido que estava a 100mM de NaCl a peroxidação lipídica surgia afectada negativamente (Tabela 5'). Deste modo, e contrariamente aos resultados apresentados na Tabela 5, somente a exposição do tecido no nível de salinidade mais elevado provocou um decréscimo significativo da acumulação de MDA (15%), já que no tecido mantido a 50mM de NaCl o teor de MDA não diferia do da situação controlo.

Tabela 5' – Teor de malondialdeído (MDA) em tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura.

MDA (nmol/gp.s.)		
0mM	50mM	100mM
464,64 $\pm$ 13,76	434,48 $\pm$ 13,23	396,23 $\pm$ 13,39*

Valores expressos como médias $\pm$ E.P. (n=6). Valores expressos como médias $\pm$ E.P. (n=4). Os valores assinalados na linha com * são significativamente diferentes do da situação controlo (0mM) ($P < 0,05$).

►Prolina

A avaliação bioquímica do conteúdo de prolina no tecido caloso mostrou que o teor deste aminoácido aumentou nas duas condições salinas estudadas em relação à situação controle e, como se pode observar no Gráfico 6, ocorreu um aumento muito acentuado no tecido exposto a 100mM de NaCl.

Tabela 6 – Teor de prolina em tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura.

Prolina ($\mu\text{g/gp.f.}$)		
0mM	50mM	100mM
$45,65 \pm 5,08^a$	$76,81 \pm 9,12^b$	$552,67 \pm 36,20^c$

Valores expressos como médias $\pm$ E.P. (n=5). Os valores assinalados na linha com diferentes expoentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

A exposição a NaCl fez aumentar o teor médio de prolina quantificado no controle para teores 1,7 e 12 vezes superiores no tecido caloso exposto a NaCl nas concentrações de 50mM e de 100mM, respectivamente (Tabela 6). A representação gráfica dos valores obtidos na quantificação bioquímica evidencia claramente as variações detectadas nas três situações estudadas e a análise estatística confirmou que essas diferenças eram significativas (Tabela 6 e Gráf. 6).

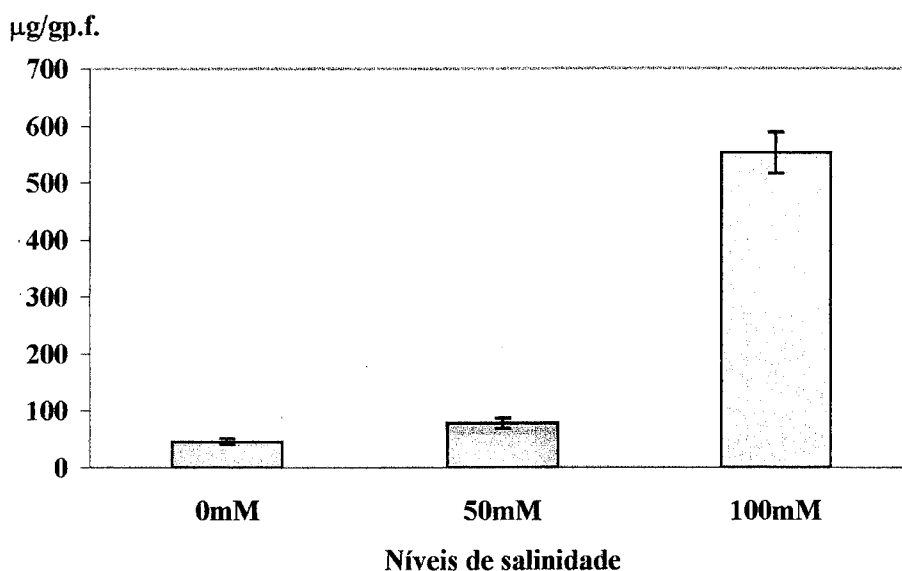


Gráfico 6 – Teor de prolina quantificado no tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura. Valores expressos como médias $\pm$ E.P.

→ Ácido ascórbico

A manutenção do tecido caloso em condições salinas levou a aumentos dos níveis de ácido ascórbico, sendo o acréscimo particularmente evidente no tecido mantido a 100mM de NaCl (Gráf. 7).

Tabela 7 – Teor de ácido ascórbico em tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura.

Ácido ascórbico (µg/gp.f.)		
0mM	50mM	100mM
117,60 ± 6,81 ^a	152,72 ± 2,79 ^b	243,35 ± 9,05 ^c

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

Através da análise da tabela 7 é possível constatar que, relativamente à situação controlo, os níveis de ácido ascórbico surgiam significativamente aumentados quer no tecido caloso mantido a 50mM, quer no exposto a 100mM de NaCl, de tal modo, que foram registados aumentos de cerca de 30% e de 107%, respectivamente. Se compararmos os valores acumulados no tecido caloso crescido em condições salinas verifica-se que o nível de NaCl mais elevado teve um efeito significativo na acumulação deste composto antioxidante, dado que o valor médio quantificado foi superior cerca de 59% do valor encontrado no nível inferior (Tabela 7 e Gráf. 7).

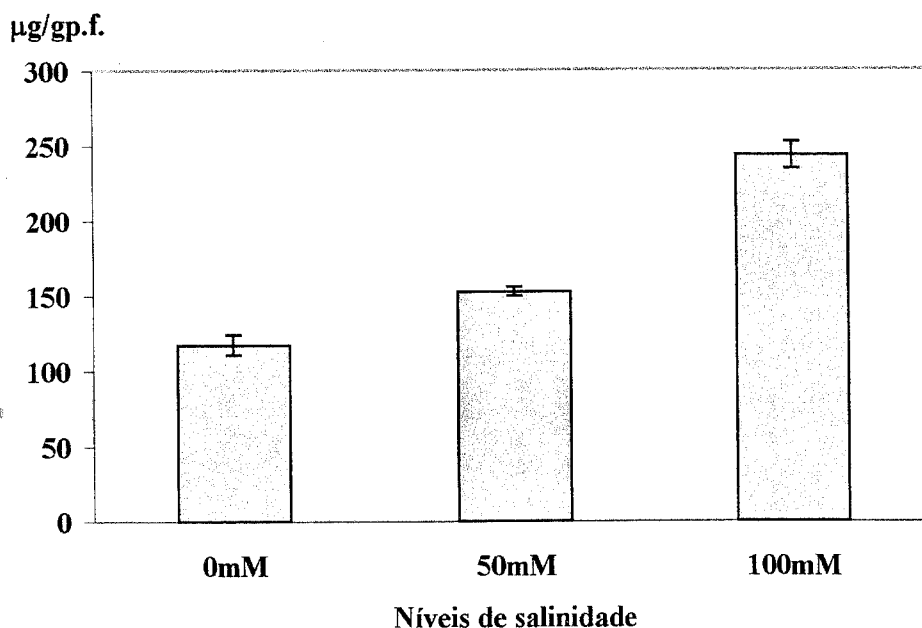


Gráfico 7 – Teor de ácido ascórbico quantificado no tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura. Valores expressos como médias $\pm$ E.P.

→Proteínas

Os níveis de proteínas solúveis e insolúveis contidos no tecido caloso que cresceu durante 35 dias na presença de diferentes concentrações de NaCl estão representados na Tabela 8 e nos Gráficos 8 e 9. Na Tabela 9 pode ver-se que o conteúdo das proteínas totais (solúveis e insolúveis) no tecido caloso aumentou significativamente com o aumento da concentração de NaCl no meio de cultura, tendo as proteínas solúveis mais contribuído para esse acréscimo na medida em que foram registados aumentos, relativamente ao valor quantificado a 0mM de NaCl, de cerca de 39% para o tecido crescido a 50mM e de 94% para o tecido a 100mM de NaCl, comparativamente aos níveis de proteínas insolúveis obtidos, que aumentaram em cerca de 32% e 53%, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 – Teor de proteínas solúveis e insolúveis em tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura.

Proteínas solúveis (mg/gp.f.)			Proteínas insolúveis (mg/gp.f.)		
0mM	50mM	100mM	0mM	50mM	100mM
1,30 ± 0,04 ^a	1,81 ± 0,04 ^b	2,52 ± 0,14 ^c	1,54 ± 0,04 ^a	2,04 ± 0,07 ^b	2,35 ± 0,04 ^c

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

A análise gráfica dos valores obtidos para as proteínas permite observar que a presença de NaCl na concentração 100mM provocou um aumento significativo da quantidade de proteínas solúveis, registando-se uma diferença da ordem dos 39% relativamente ao tecido crescido a 50mM; uma resposta semelhante à observada para as proteínas solúveis foi encontrada para as insolúveis, ou seja, o conteúdo de proteínas insolúveis surgia significativamente aumentado no tecido caloso exposto a 100mM, embora a diferença que existia entre o tecido exposto a 50mM e o que estava a 100mM fosse de apenas 15% (Gráf. 8 e Gráf. 9).

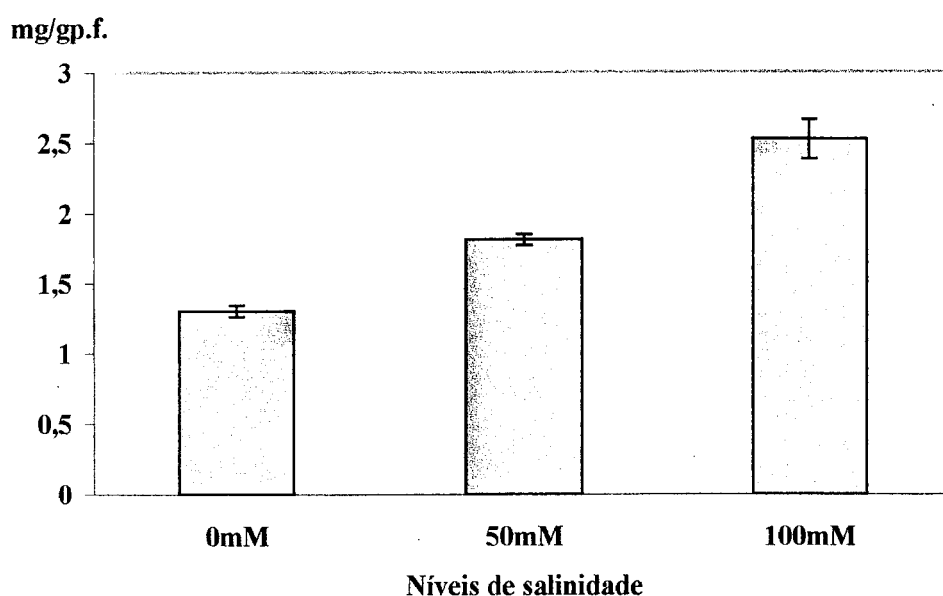


Gráfico 8 – Teor de proteínas solúveis quantificado no tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura. Valores expressos como médias ± E.P.

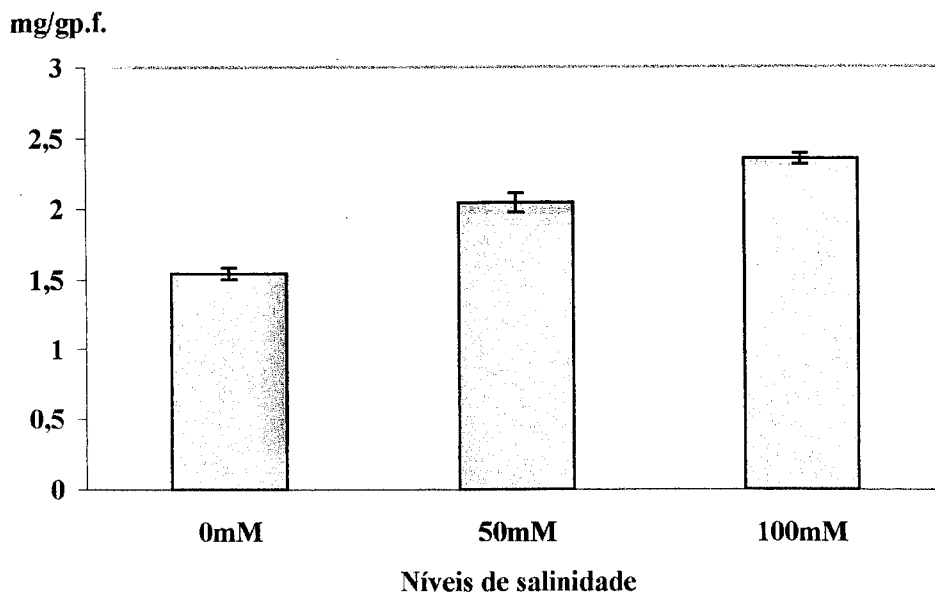


Gráfico 9 – Teor de proteínas insolúveis quantificado no tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura. Valores expressos como médias $\pm$ E.P.

O padrão de variação observado para as proteínas totais foi semelhante ao que foi descrito para as solúveis e para as insolúveis, isto é, as condições de salinidade em que o tecido caloso era mantido causaram diferenças significativas no teor das proteínas totais em relação ao que foi encontrado no tecido controle, sendo de destacar o nível de proteínas quantificado a 100mM, que foi superior ao valor registado na situação controle em cerca de 72% devido em grande parte ao elevado nível de proteínas solúveis quantificado nessa concentração salina (Tabela 9).

Tabela 9 – Proteínas totais em tecido caloso crescido na ausência de NaCl e na presença de 50 e 100mM de NaCl, após 35 dias de cultura.

Proteínas totais (mg/gp.f.)		
0mM	50mM	100mM
2,84 $\pm$ 0,06 ^a	3,86 $\pm$ 0,09 ^b	4,87 $\pm$ 0,18 ^c

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

Para além da quantificação bioquímica, estudou-se também o padrão electroforético das proteínas solúveis e insolúveis em SDS-PAGE. Conforme seria de esperar, foram encontradas algumas diferenças nos níveis das proteínas solúveis e insolúveis entre o tecido caloso controlo e o tecido que cresceu durante 35 dias em condições salinas, e os padrões electroforéticos em SDS-PAGE revelaram também a existência de novas bandas polipeptídicas, surgindo assim diferenças qualitativas, para além das quantitativas.

No padrão electroforético das proteínas solúveis verificou-se que na coluna do tecido caloso crescido na presença de NaCl a 50mM surgiram várias bandas polipeptídicas mais intensamente coradas do que as correspondentes no tecido controlo (Fig. 59 – colunas 0 e 50). Para além de duas bandas cimeiras com massas moleculares de cerca de 85,3 e 83 kDa, apareciam três bandas entre 66-45 kDa com massas moleculares de 54,6 kDa e aproximadamente com 50 e 44 kDa; com massas moleculares entre 45-31 kDa encontrámos cinco bandas de polipeptídeos mais coradas, entre as quais se destacam os polipeptídeos 42,5, 34 e 31,8 kDa que surgiram mais intensamente corados. Ainda no mesmo padrão, foi possível observar a existência de cinco bandas entre 31-21 kDa com maior intensidade de coloração do que as correspondentes na coluna 0, com pesos moleculares de cerca de 28, 26,5, 23,2, 22,1 e 21 kDa, respectivamente; entre os polipeptídeos que apresentaram no gel maior migração, ou seja, os que se encontravam entre 21 e 14 kDa, destacaram-se pelo seu maior grau de coloração duas bandas com massas moleculares de 15,3 e 14 kDa. No mesmo gel, uma banda com massa molecular de 78,4 kDa aparecia muito menos corada do que a correspondente no tecido controlo. O padrão electroforético das proteínas solúveis extraídas do tecido caloso que tinha estado a 50mM de NaCl mostrou que as alterações, relativamente à situação controlo, não eram apenas quantitativas mas também qualitativas. Com efeito, no gel das proteínas solúveis verificou-se o aparecimento de duas bandas polipeptídicas na coluna correspondente ao tecido mantido a 50mM de NaCl que não surgiam na coluna do tecido controlo; essas bandas tinham massas moleculares aproximadas de 19 e de 17 kDa.

A análise do padrão electroforético das proteínas solúveis do tecido caloso que cresceu a 100mM de NaCl mostrou que, do mesmo modo ao que foi observado no tecido exposto a 50mM de NaCl, surgiram diferenças no grau de coloração de algumas bandas polipeptídicas e foram detectadas duas novas bandas; assim, o gel das proteínas solúveis do tecido caloso exposto a NaCl na concentração 100mM mostrava um padrão de polipeptídeos semelhante ao do tecido na situação de 50mM, registando-se apenas diferenças quantitativas (Fig. 59 – coluna 100). De facto, as bandas polipeptídicas que apareciam intensamente coradas na coluna correspondente ao tecido crescido na presença de NaCl a 50mM, surgiram no padrão

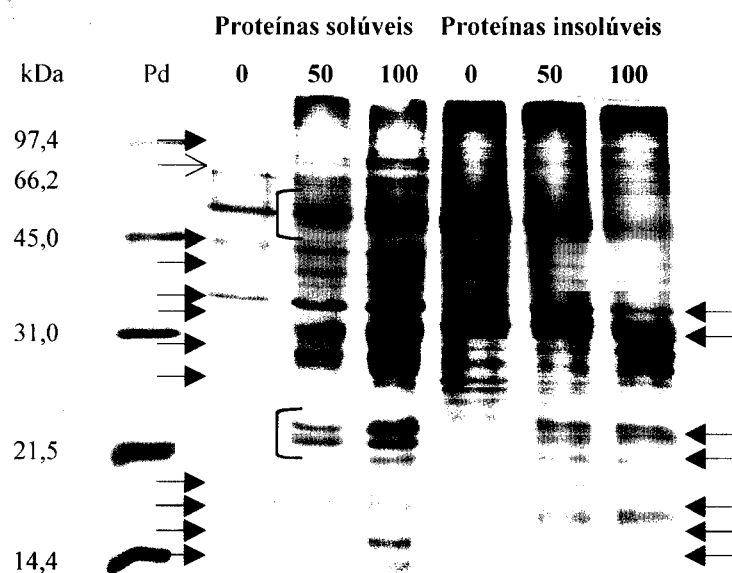


Fig. 59 – Padrão electroforético em SDS-PAGE das proteínas solúveis e insolúveis. Colunas 0, 50, 100 – proteínas extraídas do tecido caloso controlo e do tecido crescido na presença de NaCl nas concentrações de 50 e de 100mM, respectivamente.

Pd – padrões proteicos.

Nos padrões electroforéticos do tecido caloso mantido durante 35 dias em condições salinas é bem evidente que várias bandas polipeptídicas surgem com uma intensidade de coloração acentuada; as bandas que aparecem mais intensamente coradas nas colunas 50 e 100 do que as correspondentes na coluna 0 estão assinaladas com o símbolo → ou [. No entanto, no gel das proteínas solúveis foi detectada uma banda polipeptídica (assinalada com →) que surgiu menos corada na coluna 50 do que a correspondente na coluna controlo. De salientar que no gel das proteínas solúveis também aparecem duas novas bandas polipeptídicas (assinaladas com →) no tecido caloso crescido em 50mM e em 100mM de NaCl (colunas 50 e 100), com massas moleculares de cerca de 17 e 19 kDa, que se apresentam mais coradas na coluna 100. No gel das proteínas insolúveis apenas uma banda polipeptídica foi detectada *de novo* nas colunas correspondentes ao tecido crescido na presença de NaCl (colunas 50 e 100) (assinalada com →); esse polipeptídeo apresenta uma massa molecular de cerca de 16 kDa e surge mais corado no padrão electroforético do tecido caloso exposto a 100mM de NaCl. Os padrões electroforéticos mostram assim a ocorrência de diferenças quantitativas e qualitativas entre as proteínas do tecido controlo e as do tecido crescido na presença de NaCl a diferentes concentrações.

electroforético das proteínas solúveis do tecido que fora mantido a 100mM de NaCl com uma maior intensidade de coloração; também as novas bandas polipeptídicas com massas moleculares de cerca de 17 e 19 kDa apresentaram-se no padrão electroforético do tecido que estava a 100mM de NaCl com um grau de coloração mais acentuado do as correspondentes no tecido a 50mM de NaCl (Fig. 59 – coluna 50 e 100). No entanto, o polipeptídeo que aparecia menos corado no padrão correspondente à coluna 50, surgiu no tecido crescido a 100mM com um grau de coloração semelhante ao respectivo no material controlo. Leone *et al.* (1994b) verificaram que a síntese de dois polipeptídeos foi reprimida quando as células em suspensão de batateira estiveram em contacto com 5% e 10% de PEG, voltando a ser detectados após a exposição das células a 20% de PEG; para os autores a inibição transitória da síntese de certos polipeptídeos para serem sintetizados posteriormente é uma resposta vulgar durante o processo de adaptação das células a factores de stresse progressivamente mais elevados.

As diferenças detectadas nos padrões electroforéticos das proteínas solúveis das três situações estudadas, nomeadamente na maior intensidade de coloração com que diversas bandas de polipeptídeos se apresentaram nos padrões electroforéticos correspondentes ao tecido caloso nos níveis de salinidade de 50mM e de 100mM comparativamente à situação controlo, evidenciam o maior teor de proteínas solúveis que foi quantificado no tecido crescido em condições salinas, principalmente no tecido exposto a 100mM de NaCl.

No gel das proteínas insolúveis as diferenças que foram encontradas nos padrões electroforéticos entre o tecido caloso controlo e o tecido que cresceu em condições salinas consistiram na ocorrência de seis bandas polipeptídicas mais intensamente coradas na coluna correspondente ao tecido caloso crescido na presença de 50mM de NaCl, cujas massas moleculares eram próximas de 34, 32, 23,2, 22, 17 e 14 kDa, respectivamente (Fig. 59 – coluna 50). Na coluna das proteínas insolúveis do tecido que esteve exposto durante 35 dias a 100mM de NaCl, as seis bandas de polipeptídeos referidas apareciam com uma intensidade de coloração mais acentuada do que as correspondentes no tecido exposto a 50mM de NaCl, demonstrando assim os maiores teores de proteínas insolúveis que foram quantificados no tecido caloso crescido no nível de salinidade mais elevado (Fig. 59 – coluna 100). No mesmo gel, observou-se que nos padrões electroforéticos das proteínas do tecido crescido em condições salinas aparecia uma nova banda com massa molecular aproximada de 16 kDa, que não era detectada na coluna correspondente ao tecido controlo (Fig. 59 – colunas 50 e 100); esse polipeptídeo surgiu mais corado no padrão electroforético correspondente ao tecido mantido a 100mM de NaCl do que no padrão do tecido exposto a 50mM de NaCl. Verificou-

se assim que, perante a ocorrência de um teor de proteínas insolúveis mais elevado no tecido caloso crescido em condições de stresse salino do que no tecido controlo, os respectivos padrões electroforéticos mostraram que para além das alterações qualitativas, ocorreram também diferenças qualitativas.

As plantas podem adaptar-se a condições de stresse salino através de diversos mecanismos cujos níveis de complexidade são variáveis; nalguns mecanismos são utilizadas numerosas células e tecidos numa série coordenada de processos no sentido de conseguir a tolerância salina e, por isso, requerem a organização anatómica que existe na planta intacta, noutros estão envolvidos processos intrínsecos à própria célula e que, portanto, actuam ao nível celular, mas de qualquer modo, todos eles são utilizados pela planta para lidar com o stresse salino (Binzel *et al.*, 1985; Naik & Widholm, 1993). Alguns dos mecanismos que exigem a integridade funcional da planta e, como tal, actuam na planta intacta são já conhecidos (Greenway & Munns, 1980; Cheeseman, 1988; Taiz & Zeiger, 1998), todavia, nos últimos anos tem havido um interesse crescente no estudo dos mecanismos de tolerância salina que actuam ao nível da célula vegetal, daí que as técnicas de culturas *in vitro*, nomeadamente as culturas de tecido caloso ou de células em suspensão, tenham atingido elevada importância, uma vez que a sua aplicação tem permitido conhecer os processos fisiológicos e bioquímicos inerentes à célula que contribuem para a tolerância salina (Leone *et al.*, 1994a; Lutts *et al.*, 1999; Rus *et al.*, 1999). Segundo vários autores, as linhas celulares tolerantes ao sal representam o sistema experimental mais adequado para estudar os mecanismos celulares que estão envolvidos na tolerância salina (Ben-Hayyim & Kochba, 1983; Watad *et al.*, 1983; Binzel *et al.*, 1985; Gueta-Dahan *et al.*, 1997), daí que tenham sido desenvolvidos esforços no sentido de seleccionar *in vitro* linhas de diversas espécies com diferente tolerância a NaCl, de modo a poderem ser comparadas a nível morfológico e bioquímico com as linhas não tolerantes (Ben-Hayyim & Kochba, 1983; Watad *et al.*, 1983; Rains *et al.*, 1986; Binzel *et al.*, 1988; Gossett *et al.*, 1996; Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999).

Os fenómenos fisiológicos que estão associados com o stresse salino são vários, desde a diminuição do crescimento e da fotossíntese, às alterações na homeostasia iónica e na turgescência da célula, a acumulação de solutos compatíveis e o aumento na formação das EAOs nas células vegetais; no entanto, tem sido durante os últimos anos que se tem procurado estabelecer a relação entre estes fenómenos e a tolerância salina (Gossett *et al.*, 1994a,b; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Rodríguez-Rosales *et al.*, 1999; Savouré *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2000; Zhu, 2001). A relação da salinidade com o stresse oxidativo está bem documentada

na literatura, e de acordo com os trabalhos publicados, as espécies activas de oxigénio estão envolvidas nos danos causados pela salinidade (Hernández *et al.*, 1993, 1995; Gossett *et al.*, 1994a,b; Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Bueno *et al.*, 1998; Meneguzzo *et al.*, 1998; Zhu, 2001). Essas espécies são conhecidas por desequilibrar os sistemas redox da célula em favor de formas oxidadas e por reagir com a maioria das moléculas orgânicas, como proteínas e clorofilas, levando à desnaturação de proteínas e à inactivação de enzimas (Jiménez *et al.*, 1997; Scandalios, 1997; Wang *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2000); a intervenção das EAOs passa também pela reacção com os ácidos gordos polinsaturados para causar a peroxidação dos lípidos, quer na membrana citoplasmática, quer nas membranas dos organelos celulares. Em consequência da peroxidação lipídica da membrana plasmática ocorre a perda de conteúdos celulares, a desidratação rápida e, eventualmente, a morte celular, enquanto que a peroxidação das membranas intracelulares vai afectar a actividade respiratória na mitocôndria, levar à perda de pigmentos e à diminuição da capacidade de fixação de dióxido de carbono nos cloroplastos (Scandalios, 1993). Segundo Bartosz (1997), as espécies activas de oxigénio estão presentes nas células em quantidades demasiado baixas para serem detectadas directamente pelos métodos analíticos disponíveis, mesmo em situações de stresse oxidativo, daí que o processo mais utilizado para avaliar o stresse oxidativo é a peroxidação lipídica, dado este ser um processo induzido pelas EAOs; sendo assim, o nível de peroxidação lipídica é geralmente estimado através da quantificação bioquímica dos produtos resultantes desse processo oxidativo, como por exemplo do malondialdeído. Nesta perspectiva, foi nosso objectivo comparar o nível de peroxidação lipídica nas linhas celulares de *S. tuberosum* que estavam a crescer a 50mM e a 100mM de NaCl com a linha não adaptada a crescer na ausência de NaCl. Os resultados, quando expressos por g de peso fresco, mostraram que o nível de peroxidação lipídica foi superior no tecido caloso exposto a condições salinas do que no tecido crescido na ausência de NaCl, tendo sido no tecido adaptado a 100mM de NaCl que se registou a maior acumulação de malondialdeído. Também Gueta-Dahan *et al.* (1997) registaram os maiores níveis de MDA (resultados expressos por g de peso fresco) na linha celular de *Citrus* tolerante a 100mM de NaCl, ocorrendo os menores valores na linha não adaptada mantida a 0mM de NaCl. A possibilidade de aumentar a peroxidação lipídica em tecido caloso de *Lycopersicon esculentum* tolerante a 50mM de NaCl foi referida por Rodríguez-Rosales *et al.* (1999), que detectaram a maior actividade de lipoxigenase, enzima responsável pela formação de hidroperóxidos lipídicos, nesse tecido comparativamente ao controlo. À semelhança dos estudos realizados em culturas *in vitro*, na literatura são encontradas referências a trabalhos feitos no sistema *in vivo* que demonstraram que a

exposição das plantas a NaCl induziu a acumulação nas folhas de produtos resultantes da peroxidação lipídica, verificando-se que os níveis desses produtos aumentavam com o aumento da salinidade no meio, como aconteceu na planta de *Nicotiana plumbaginifolia* (Savouré *et al.*, 1999), na ervilheira (Hernández *et al.*, 1993, 1995; Gómez *et al.*, 1999) e no algodoeiro (Gossett *et al.*, 1994a).

Associado ao incremento dos níveis de MDA, Hernández *et al.* (1993, 1995, 1999) registaram uma diminuição do teor de clorofilas, sendo essa redução mais acentuada no tratamento salino mais elevado, e o estudo ultraestrutural realizado nas folhas mostrou a desorganização das membranas celulares, bem como da estrutura dos tilacóides nos cloroplastos. No presente trabalho não feito o estudo ultraestrutural do tecido caloso crescido em condições salinas, no entanto, verificou-se que paralelamente ao aumento do conteúdo de MDA no tecido, o teor de clorofilas, sobretudo de clorofila a, diminuía. Embora tenhamos encontrado a menor quantidade de clorofilas no tecido crescido na presença de NaCl na concentração de 100mM, o valor quantificado não diferiu daquele que foi obtido no nível de salinidade inferior, onde os teores de MDA eram significativamente menores aos registados no tecido a 100mM. Para além desse facto, verificou-se que os níveis de carotenóides, quando expressos por g de peso fresco, eram mais baixos no tecido mantido a 50mM de NaCl, enquanto que os valores quantificados no tecido exposto a 100mM eram semelhantes aos do controlo. Estes resultados levam-nos a admitir que no tecido caloso sujeito a elevado nível de salinidade provavelmente algum mecanismo de protecção estaria a actuar, justificando assim os níveis de pigmentos obtidos.

As células vegetais desenvolveram um eficiente sistema de defesa antioxidante para manter as EAOs a um baixo nível nas células, e assim se protegerem dos efeitos tóxicos por elas induzidos, que inclui os compostos antioxidantes como o ácido ascórbico, a glutathione, o α -tocoferol e os carotenóides, os quais podem reagir directamente com as EAOs, para além das várias enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase, a peroxidase do ascorbato e a glutathione redutase (Alscher *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). Este sistema antioxidante desempenha uma importante função na tolerância salina, tal como foi demonstrado por Gueta-Dahan *et al.* (1997) nas linhas celulares de *Citrus* adaptadas a elevados níveis de salinidade, e também por Gossett *et al.* (1996) e por Rodríguez-Rosales *et al.* (1999) no tecido caloso de algodoeiro tolerante a 150mM e no tecido de *Lycopersicon esculentum* tolerante a 50mM de NaCl, respectivamente. Rodríguez-Rosales *et al.* (1999) concluíram que o tecido caloso tolerante a NaCl apresentava maior formação de hidroperóxidos lipídicos, mas também uma maior actividade antioxidante; do mesmo modo, a

maior peroxidação lipídica verificada nas linhas de *Citrus* tolerantes a 100mM e a 200mM de NaCl esteve relacionada com a maior actividade da peroxidase do ascorbato, parecendo ser a enzima determinante para a aquisição da tolerância salina por parte dessas linhas (Gueta-Dahan *et al.*, 1997). Nos estudos comparativos da tolerância salina entre cultivares da planta de algodoeiro e entre culturas de tecido caloso obtidas a partir dessas plantas, Gossett *et al.* (1994a,b) verificaram que a maior tolerância salina exibida quer pela cultivar referida como sendo menos sensível à salinidade, quer pela respectiva cultura de tecido caloso, foi devida à maior capacidade para eliminar as EAOs geradas em consequência do elevado tratamento salino; essa capacidade resultou não só da maior actividade das enzimas antioxidantes, mas sobretudo dos elevados níveis de ácido ascórbico e de glutathione obtidos. Para Gossett *et al.* (1994a) os elevados teores desses compostos antioxidantes poderá explicar o menor nível de peroxidação lipídica observado nas plantas mais resistentes ao sal comparativamente às mais sensíveis, mas mesmo assim os níveis de MDA acumulados foram sempre superiores aos das plantas controlo após o tratamento salino. Resultados semelhantes foram descritos para as ervilheiras tolerantes a NaCl (Hernández *et al.*, 1995); nestas plantas a peroxidação lipídica verificada ocorrer esteve associada a um aumento de mais de 100% do teor de ácido ascórbico. As linhas celulares de batateira obtidas no nosso trabalho adaptadas para crescerem a concentrações salinas de 50mM e 100mM, mostraram um acréscimo no conteúdo de ácido ascórbico total com o aumento do nível de salinidade; esse aumento foi significativo quer para o tecido caloso da linha tolerante a 50mM de NaCl, quer para o da linha adaptada a 100mM de NaCl, embora neste último tenhamos assistido a um aumento de mais de 100% relativamente ao valor quantificado no controlo. Também na linha celular de algodoeiro tolerante a 150mM a quantidade de ácido ascórbico total foi muito superior à encontrada na linha controlo (Gossett *et al.*, 1996). De acordo com Meneguzzo *et al.* (1998), o maior conteúdo de ácido ascórbico que ocorre no material vegetal exposto a condições salinas indica um aumento da exigência por esse composto para a remoção das EAOs induzidas pela salinidade e, para os autores, o maior aumento no teor de ácido ascórbico que é verificado ocorrer em material vegetal menos sensível ao NaCl contribui para a sua tolerância salina. O ácido ascórbico é considerado ser o principal antioxidante que está directamente envolvido na eliminação das EAOs, para além de actuar como substrato na redução do H_2O_2 em H_2O catalizada pela enzima peroxidase do ascorbato (Conklin, 1998; Noctor & Foyer, 1998; Bray *et al.*, 2000), daí que os seus níveis normalmente aumentem em condições que desencadeiam o stresse oxidativo (Smirnoff, 1995; Dat *et al.*, 2000; Davey *et al.*, 2000). Os estudos realizados em diferentes espécies demonstraram que a salinidade é um factor de stresse

oxidativo (Bartosz, 1997; Hernández *et al.*, 1999; Dat *et al.*, 2000), e o trabalho presente mostra o aumento dos níveis de ácido ascórbico em tecido caloso de batateira exposto a condições salinas, em que esse aumento está relacionado com o grau de tolerância salina exibido pelas culturas de tecido caloso.

Apesar dos carotenóides fazerem parte do mecanismo não-enzimático antioxidante, e estarem assim envolvidos na protecção das células dos danos oxidativos (Scandalios, 1993; Smirnoff, 1995; Foyer & Noctor, 2000), no estudo realizado verificaram-se alterações dos níveis de carotenóides no tecido caloso mantido a 50mM e a 100mM de NaCl. Contudo, a resposta do tecido nessas condições foi variável dependendo se o conteúdo de carotenóides foi expresso em termos de peso fresco ou de peso seco; no primeiro caso, não houve diferenças no teor quantificado entre o controlo e o tecido exposto a 100mM, tendo diminuído no tecido tolerante a 50mM de NaCl, o que sugere que os carotenóides poderão ter contribuído para a protecção das membranas da peroxidação lipídica, face ao aumento acentuado dos níveis de MDA no tecido caloso que estava a 100mM de NaCl. Quando os valores quantificados foram expressos em peso seco, a quantidade de carotenóides no tecido caloso surgia significativamente diminuída com o aumento do nível de salinidade. Esta diferença de resultados indica que o maior conteúdo de carotenóides encontrado no tecido caloso adaptado a 100mM de NaCl quando os valores da quantificação bioquímica foram expressos em termos de peso fresco é provavelmente devido à redução significativa do teor de água no tecido crescido a esse nível de salinidade. Outros estudos mostraram o decréscimo dos níveis de carotenóides em plantas sujeitas a situações de défice hídrico intenso, tratamento com o herbicida paraquato ou baixas temperaturas, tendo essa diminuição contribuído para a menor protecção antioxidante e, portanto, para os danos oxidativos verificados (Wise & Naylor, 1987; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 1998).

A acumulação de prolina aumentou significativamente no tecido caloso das linhas tolerantes a 50mM e a 100mM de NaCl, embora o tecido tolerante a 100mM de NaCl tenha apresentado um incremento notável no nível de prolina. A acumulação de prolina é um fenómeno bem conhecido em linhas celulares expostas a condições salinas e de secura e frequentemente atribui-se a este aminoácido uma função de soluto compatível, estando assim envolvido no ajustamento osmótico e, consequentemente, na tolerância salina (Watad *et al.*, 1983; Rains *et al.*, 1986; Leone *et al.*, 1994a; Bajji *et al.*, 1998). Na linha celular de *Nicotiana tabacum* tolerante a 100mM de NaCl, Watad *et al.* (1983) encontraram níveis de prolina 8 vezes superiores aos do controlo; também Leone *et al.* (1994a) verificaram que as células em suspensão de *Solanum tuberosum* adaptadas ao PEG acumularam elevada quantidade de

prolina, tendo os autores referido que o elevado conteúdo em prolina terá conferido a tolerância dessas células a 200mM de NaCl. Os resultados obtidos no trabalho presente mostram a existência de uma correlação entre o conteúdo de prolina e a tolerância salina, verificando-se um acréscimo dos níveis de prolina com o aumento da tolerância do tecido caloso a NaCl. Respostas idênticas foram referidas para as linhas celulares tolerantes a NaCl da planta de batateira cv. Kennebec e da planta de tabaco, que acumularam mais prolina com o aumento da concentração de NaCl no exterior (Watad *et al.*, 1983; Singh *et al.*, 1985; van Swaaij *et al.*, 1986). Estes resultados sugerem para a prolina outras funções para além de soluto compatível. Watad *et al.* (1983) concluíram que a acumulação do aminoácido acompanha a adaptação das células a um meio salino e van Swaaij *et al.* (1986) referiram que a prolina actua como um composto protector durante o período de stresse salino. De acordo com Leone *et al.* (1994a), o elevado conteúdo de prolina encontrado nas células de *S. tuberosum* sujeitas a stresse osmótico está associado ao ajustamento osmótico e à protecção de estruturas celulares dos danos causados pela salinidade. A acção da prolina na eliminação das espécies activas de oxigénio, nomeadamente do radical hidroxilo considerada a espécie de oxigénio mais reactiva, contribui para a estabilização das membranas celulares durante o stresse salino (Samaras *et al.*, 1995 e referências; Grillo *et al.*, 1996). Este facto poderá explicar o elevado teor de prolina encontrado no tecido caloso mantido a 100mM de NaCl, onde foram quantificados os maiores níveis de MDA; assim, face ao stresse oxidativo evidente no tecido caloso crescido a 100mM de NaCl é possível aceitar o envolvimento do aminoácido na remoção das EAOs, impedindo estes radicais de danificarem os pigmentos e as estruturas membranares. Perante a acção antioxidante da prolina, Bohnert *et al.* (1995) e Zhu (2001) sugeriram a intervenção do aminoácido na tolerância ao stresse salino. Deste modo, podemos concluir que a acumulação de prolina no tecido caloso sujeito a condições salinas está relacionada com a aquisição da tolerância salina.

O aumento do conteúdo de prolina nas linhas celulares expostas a NaCl poderia dever-se a uma redução na incorporação deste aminoácido na fracção proteica, motivada pela diminuição da síntese proteica, ou estar associado ao aumento de degradação de proteínas que ocorre em situações de stresse (Greenway & Munns, 1980; Ramagopal, 1987; Tsugane *et al.*, 1999). Contudo, verificou-se o aumento significativo dos níveis de proteínas solúveis e insolúveis no tecido caloso exposto a condições de stresse salino, em que esses níveis surgiam mais elevados no tecido crescido na presença de 100mM de NaCl. Sendo assim, o aumento do teor de prolina deverá corresponder a um incremento na sua síntese, o que está de acordo com as observações de Okuma *et al.* (2000), que verificaram que a biossíntese de prolina aumentou

nas células cultivadas em meio salino. O tecido caloso de *S. tuberosum* exposto a NaCl na concentração 100mM apresentou níveis proteicos mais elevados que o tecido exposto a concentração salina mais moderada, sendo assim é possível associar o maior conteúdo de proteínas totais ao aumento da tolerância salina. O incremento dos níveis de proteínas solúveis e insolúveis no tecido caloso com o aumento de salinidade no meio poderá ser interpretado como sendo devido ao aumento de síntese de alguns polipeptídeos, uma resposta que pôde ser confirmada através da visualização dos padrões electroforéticos das proteínas solúveis e insolúveis em SDS-PAGE. Verificou-se que a síntese da maioria dos polipeptídeos constitutivos não foi inibida pela manutenção do tecido caloso nas concentrações de NaCl 50mM e 100mM, apenas um polipeptídeo surgiu diminuído no tecido caloso mantido a 50mM de NaCl. No entanto, foi possível identificar um conjunto de polipeptídeos cuja síntese aumentou no tecido caloso em condições salinas. Assim, o gel das proteínas solúveis mostrou que 17 bandas polipeptídicas apareciam mais intensamente coradas no tecido caloso exposto a NaCl relativamente ao tecido crescido na ausência de sal, tendo sido no tecido crescido na presença de NaCl a 100mM que esses polipeptídeos surgiram com uma coloração mais intensa. Entre essas bandas, merecem referência os polipeptídeos com massas moleculares de 22,1, 23,2, 32 e 34 kDa por se apresentarem muito mais corados do que os correspondentes no material controlo, uma situação que nos leva a admitir que essas proteínas podem estar envolvidas na adaptação do tecido à salinidade. A análise dos padrões electroforéticos das proteínas insolúveis indicava a ocorrência de algumas alterações quantitativas no tecido crescido na presença de NaCl; assim, o gel das proteínas insolúveis mostrou que surgia estimulada a síntese de polipeptídeos com massas moleculares de cerca de 34, 32, 23,2, 22, 17 e 14 kDa no tecido caloso crescido na presença de NaCl nas concentrações 50mM e 100mM, embora neste último as bandas correspondentes a esses polipeptídeos surgissem com maior intensidade de coloração, o que se traduziu no aumento do nível de proteínas insolúveis no tecido exposto a esse nível de salinidade. Alguns dos polipeptídeos que surgiam mais intensamente corados tinham massas moleculares que coincidem com as proteínas CDSP ('chloroplastic drought-induced stress protein') detectadas por Pruvot *et al.* (1996) em plantas de *Solanum tuberosum* sujeitas a condições de secura. Em resposta ao défice hídrico essas proteínas, com pesos moleculares de 32 e 34 kDa, eram sintetizadas em maior abundância nos cloroplastos, estando a CDSP 32 provavelmente envolvida na osmoregulação do estroma (Eymery & Rey, 1999), e a CDSP 34 associada à manutenção da integridade da lamela dos tilacóides durante a desidratação (Gillet *et al.*, 1998; Eymery & Rey, 1999). Embora a síntese dessas proteínas surja associada a uma condição de secura, Pruvot *et al.* (1996) observaram

que a exposição das plantas *S. tuberosum* a NaCl também provocou a acumulação da CDSP 32 e da CDSP 34, verificando-se que a síntese destas proteínas foi maior no tratamento salino mais elevado (300mM) comparativamente ao tratamento inferior (150mM). Por outro lado, Broin *et al.* (2000) verificaram que além da secura, outros factores que provocam stresse oxidativo induziram a acumulação da CDSP 32 em batateira, tendo os autores concluído que esta proteína protege as estruturas dos cloroplastos dos efeitos tóxicos das espécies activas de oxigénio, nomeadamente da peroxidação lipídica. Face a estes conhecimentos, parece ser plausível admitir que os polipeptídeos com massas moleculares de cerca de 32 e 34 kDa que surgiram aumentados no tecido caloso exposto a condições salinas correspondem às proteínas CDSP 32 e CDSP 34, daí estarem provavelmente relacionados com a preservação das estruturas celulares durante a exposição do tecido a stresse salino.

A manutenção do tecido caloso na presença de NaCl a 50mM e a 100mM provocou, para além de alterações quantitativas, o aparecimento de bandas polipeptídicas que não eram detectadas no padrão electroforético do tecido controlo. Enquanto que no gel das proteínas solúveis verificou-se o aparecimento de duas novas bandas polipeptídicas (19 e 17 kDa), que apareciam mais intensamente coradas no tecido mantido a 100mM de NaCl, no gel das proteínas insolúveis foi detectado *de novo* um polipeptídeo de cerca de 16 kDa. Curiosamente, Leone *et al.* (1994b) detectaram além da ocorrência de 17 polipeptídeos que surgiram aumentados no padrão electroforético de uma linha celular adaptada a 20% de PEG, um novo polipeptídeo com massa molecular de 14,8 kDa que não foi identificado na linha não adaptada.

Geralmente verifica-se que as novas proteínas que são sintetizadas em resposta a condições ambientais alteradas são referidas como 'proteínas de stresse', embora apenas algumas destas proteínas estejam envolvidas em processos fisiológicos ou metabólicos (Ericson & Alfinito, 1984; Singh *et al.*, 1985; Leone *et al.*, 1994b). Segundo Singh *et al.* (1985), a maioria dessas proteínas aparece como uma resposta imediata à situação adversa e apenas algumas estão associadas com a adaptação das células à nova condição ambiental; Zhu (2001) refere que várias 'proteínas de stresse' sintetizadas em resposta ao stresse salino com função desconhecida actuam provavelmente na remoção das EAOs ou protegem as estruturas celulares de danos oxidativos. Uma das proteínas mais bem conhecidas que surgem em resposta ao stresse salino e que estão envolvidas na adaptação das células ao NaCl é a designada osmotina (Ericson & Alfinito, 1984; Singh *et al.*, 1985, 1987, 1989; Leone *et al.*, 1994b; Bray *et al.*, 2000). A osmotina é uma proteína de 26 kDa que é acumulada nas linhas celulares de *Nicotiana tabacum* adaptadas para crescerem a elevados níveis de salinidade.

Embora a síntese desta proteína surja associada a uma situação de salinidade, ela foi também induzida pela exposição das células de *Solanum tuberosum* em suspensão ao polietilenoglicol, daí que ela esteja associada não só com a tolerância salina, mas também com a tolerância das células a condições de stresse osmótico (Leone *et al.*, 1994a,b). As massas moleculares dos polipeptídeos que surgiram *de novo* no tecido caloso adaptado a concentrações salinas de 50mM e de 100mM não coincidem com a da osmotina, no entanto, a utilização de anticorpos policlonais para a osmotina permitiu o reconhecimento de um polipeptídeo com peso molecular de 24 kDa que foi constitutivamente expresso na linha celular não adaptada ao PEG e substancialmente acumulado nas linhas celulares adaptadas ao PEG ou nas linhas não adaptadas expostas a NaCl (Leone *et al.*, 1994a). Atendendo a este facto, é possível admitir que as bandas polipeptídicas com massas moleculares aproximadas de 28, 26,5 e 23,2 kDa, cujas intensidades de coloração aumentaram com a maior tolerância salina exibida pelo tecido caloso de batateira, estejam relacionadas com a osmotina. Apesar destas considerações, os resultados obtidos mostram que as condições salinas provocaram o aumento no tecido caloso da síntese de diversos polipeptídeos e activaram a síntese de outros que não eram expressos no tecido crescido na ausência de NaCl, de tal modo que os níveis proteicos no tecido caloso crescido na presença de NaCl 50mM e 100mM aumentaram significativamente. Respostas idênticas foram descritas para as linhas celulares de *N. tabacum* adaptadas a NaCl (Ericson & Alfinito, 1984; Singh *et al.*, 1985), para o tecido caloso tratado com os agroquímicos Decis e Ridomil (Fidalgo, 1995; Fidalgo *et al.*, 1997) e para a linha celular adaptada a PEG 20% de *S. tuberosum* (Leone *et al.*, 1994a,b). Nesses trabalhos, as alterações quantitativas e qualitativas observadas surgiram em consequência das situações adversas impostas e estiveram associadas à adaptação das células para crescerem na presença de elevadas concentrações de NaCl ou de PEG (Ericson & Alfinito, 1984; Singh *et al.*, 1985; Leone *et al.*, 1994a,b), ou na adaptação do tecido à presença de Decis no meio de cultura (Fidalgo *et al.*, 1997). De acordo com Leone *et al.* (1994b), o facto da síntese de determinados polipeptídeos aumentar e desses polipeptídeos se acumularem progressivamente com o crescente aumento dos níveis de stresse, sugere que as células de *S. tuberosum* são capazes de se adaptarem a diferentes condições de stresse através de alterações na expressão genética. Considerando estes conhecimentos, admitimos que a adaptação do tecido caloso de batateira a condições de stresse salino esteve associada com o aumento dos níveis de alguns polipeptídeos e com o aparecimento de novos polipeptídeos, sendo estas alterações mais evidentes no tecido exposto a salinidade mais elevada.

Os resultados obtidos mostraram que é possível, através das culturas *in vitro*, isolar linhas celulares de *S. tuberosum* tolerantes à presença de NaCl nas concentrações 50mM e 100mM. A manutenção das linhas seleccionadas na presença das duas concentrações salinas teve repercussões no crescimento e conteúdo hídrico do tecido caloso dessas linhas, de tal modo que, o crescimento do tecido sujeito à salinidade decresceu, verificando-se que a condição salina de 100mM levou à maior diminuição do crescimento e, também, a uma redução do teor de água no tecido. Paralelamente, através do estudo de alguns parâmetros bioquímicos constatou-se que a presença de NaCl no meio de cultura estimulou a peroxidação lipídica, que foi mais evidente no tecido crescido a 100mM de NaCl. Os níveis de clorofilas sofreram um decréscimo em relação aos observados no tecido controlo, embora os valores quantificados no tecido adaptado a 50mM não tivessem divergido dos encontrados no tecido tolerante a 100mM de NaCl; por sua vez, o conteúdo de carotenóides, que no tecido caloso mantido a 100mM de NaCl não foi afectado, decresceu no tecido tolerante a 50mM. Em contrapartida, os teores de prolina e de ácido ascórbico surgiram aumentados no tecido exposto a condições salinas; no entanto, comparando a linha tolerante a 50mM com a tolerante a 100mM de NaCl, verifica-se que os níveis do aminoácido e do antioxidante na segunda linha foram consideravelmente superiores aos encontrados na primeira, daí admitirmos que a maior acumulação desses compostos resulte na aquisição de tolerância a níveis superiores de NaCl.

Também a quantidade de proteínas (solúveis e insolúveis) teve um aumento considerável em ambas as linhas, com maior destaque para a linha tolerante a 100mM; de salientar, que os maiores teores de proteínas encontrados no tecido caloso das linhas tolerantes são justificados pelo aumento da síntese de alguns polipeptídeos, nomeadamente das proteínas 32 e 34 kDa, que haviam sido já detectadas por Pruvot *et al.* (1996) na batateira sujeita a condições de secura e de salinidade, e também pelo aparecimento de outros que não eram detectados no padrão electroforético da situação controlo. Vários autores referem a existência de uma correlação entre o aumento da síntese de determinadas proteínas e o grau de adaptação à salinidade, o que sugere alterações na expressão genética após a adaptação a NaCl (Ericson & Alfinito, 1984; Singh *et al.*, 1985; Leone *et al.*, 1994b; Bueno *et al.*, 1998). É provável que o aumento dos níveis de prolina e de ácido ascórbico induzido pelo NaCl no tecido caloso crescido em condições salinas, resulte do aumento da transcrição de genes envolvidos na síntese desses compostos, à semelhança do que foi referido por Gossett *et al.* (1994b; 1996) e por Bueno *et al.* (1998).

Os resultados sugerem, assim, que a tolerância à salinidade envolveu nas células do tecido caloso de batateira alterações de vários tipos; face aos decréscimos no crescimento e no teor

de água, que estiveram associados ao aumento da peroxidação lipídica e diminuição do teor de pigmentos, nomeadamente de clorofilas, assistimos a um aumento acentuado dos níveis proteicos, e dos níveis de prolina e de ácido ascórbico.

4 – CONCLUSÕES

Neste trabalho foi nosso objectivo induzir a produção de tecido caloso de *S. tuberosum* a partir da cultura de explantes foliares, de broto e de tubérculo e, através da cultura estabelecida de tecido caloso proveniente de fragmentos foliares de batateira, seleccionar linhas celulares tolerantes a diferentes níveis de salinidade. Uma vez obtidas as linhas tolerantes a concentrações crescentes de NaCl (50, 100, 150 e 200mM de NaCl), procurou-se estudar certos aspectos do comportamento de tecido caloso crescido em condições de salinas. Para esse efeito, utilizaram-se culturas de tecido caloso controlo e tolerantes a níveis de NaCl de 50mM e de 100mM, em que a resposta do tecido caloso crescido na presença de NaCl foi avaliada a nível bioquímico e comparada com a resposta do tecido caloso crescido na ausência de NaCl.

No que se refere à indução e estabelecimento de tecido caloso, verificou-se que a indução e o crescimento das culturas de tecido caloso foram mais rápidas quando os explantes foram obtidos de broto e mais demoradas para os explantes provenientes de tubérculo dormente, confirmando assim que a produção de tecido caloso depende do estado fisiológico do órgão dador do explante. O nosso estudo mostrou que a produção de tecido caloso foi também dependente das condições de cultura usadas, tendo sido determinante a composição do meio nutritivo, sobretudo nos reguladores de crescimento utilizados; assim, o meio de cultura mais eficaz para a indução de tecido caloso foi aquele que usou apenas o picloram como regulador de crescimento e este resultado estendeu-se aos diferentes explantes utilizados para a formação de tecido caloso. Para além disso, verificámos que o meio nutritivo mais adequado para a indução de tecido caloso foi o mais conveniente para o crescimento da cultura, já que a manutenção do tecido no meio de cultura contendo a auxina picloram possibilitou a obtenção de tecido caloso em abundância, nomeadamente daquele que fora induzido a partir de discos de tubérculo. Contudo, a permanência do tecido caloso nesse meio não permitiu o seu reverdecimento, daí que a transferência para meio de manutenção contendo diversos fitorreguladores combinados tenha sido bem sucedida.

Utilizando uma cultura estabelecida de tecido caloso proveniente do mesófilo da planta de batateira e sujeitando porções de tecido retiradas dessa cultura a stresse salino foi possível seleccionar linhas celulares tolerantes a 50, 100, 150 e 200mM de NaCl. No entanto, entre os dois métodos que foram usados para a selecção *in vitro* de linhas tolerantes, aquele que se revelou mais eficaz foi o da selecção gradual, por ter permitido a obtenção mais rápida de tecido caloso adaptado a elevados níveis de salinidade sem se registarem perdas de material

por mortalidade, embora por selecção directa tenha sido possível seleccionar linhas tolerantes a partir de uma única exposição do tecido a diferentes situações salinas, de tal modo, que no final tínhamos tecido caloso a crescer na presença de NaCl nas concentrações 50, 100, 150 e 200mM.

O tecido caloso das linhas tolerantes a 50mM e a 100mM de NaCl apresentou uma redução de crescimento relativamente ao controlo, tendo essa diminuição sido mais acentuada no tecido mantido na concentração salina mais elevada. O nível de NaCl mais elevado provocou no tecido caloso uma redução do conteúdo hídrico, enquanto que o teor de água acumulado no tecido exposto a salinidade moderada não diferiu do da situação testemunho.

O estudo de alguns parâmetros bioquímicos mostrou que a manutenção do tecido caloso em condições salinas teve repercussões na formação de espécies activas de oxigénio, que se manifestou por um aumento significativo dos níveis acumulados de malondialdeído, e portanto da peroxidação lipídica, e por um decréscimo do conteúdo de pigmentos, nomeadamente de clorofilas. Apesar da peroxidação lipídica surgir mais aumentada no tecido caloso exposto a 100mM de NaCl do que no tecido a 50mM, o conteúdo clorofilino encontrado na linha tolerante a 100mM não variou do da linha adaptada a 50mM, tendo mesmo a razão clorofila a/b sido maior no tecido mantido a 100mM de NaCl; de referir, que neste último, não se observou uma alteração significativa no teor de carotenóides em relação ao que foi registado no tecido controlo, tendo surgido afectado negativamente no tecido crescido na presença de 50mM de NaCl. Os resultados obtidos levam-nos a concluir que as membranas celulares foram afectadas negativamente pelo crescimento do tecido caloso em condições de stresse salino, sobretudo pela concentração salina mais elevada.

Com efeito, o stresse salino induzido pelo NaCl levou a um aumento dos níveis de ácido ascórbico no tecido caloso, em que esse aumento foi muito acentuado no tecido tolerante a 100mM comparativamente ao aumento verificado no tecido tolerante a 50mM de NaCl. Comportamento semelhante foi observado para a prolina; de facto, a acumulação do aminoácido foi superior no tecido caloso sob stresse salino do que no tecido crescido na ausência de sal, verificando-se que o tecido exposto a 100mM acumulou bastante mais prolina do que o sujeito a 50mM.

A síntese proteica foi estimulada no tecido caloso das linhas tolerantes a concentrações de NaCl de 50mM e de 100mM, de tal modo, que as proteínas solúveis e insolúveis surgiram significativamente aumentadas. Os padrões electroforéticos mostraram que em resposta à

presença de NaCl no meio de cultura ocorreram alterações quantitativas e qualitativas, sendo essas alterações mais pronunciadas no tecido caloso exposto a 100mM de NaCl.

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho permite-nos afirmar que o tecido caloso proveniente de uma planta moderadamente tolerante ao sal, como é a batateira, pode adaptar-se e crescer em condições de elevada salinidade. No entanto, verifica-se que para além da redução de crescimento acompanhada pela diminuição da quantidade de água no tecido caloso, o stresse salino teve repercussões negativas na estabilidade das membranas celulares e no teor de pigmentos, justificando o facto de ser considerado uma forma de stresse oxidativo. Porém, o nosso estudo igualmente mostrou que o tecido caloso das linhas seleccionadas *in vitro* teve capacidade para se adaptar a diferentes situações salinas, através do aumento dos níveis de ácido ascórbico e de prolina, verificando-se que o grau de tolerância salina exibido esteve relacionado com a acumulação desses compostos no tecido caloso. Podemos assim concluir, que o aumento da quantidade de ácido ascórbico e de prolina induzido pelo NaCl contribuiu para a aquisição da tolerância salina; contudo, considerámos ser necessário aprofundar o estudo do sistema antioxidante, nomeadamente para determinar o possível envolvimento das enzimas antioxidantes na tolerância ao stresse salino. Esse estudo irá esclarecer a importância da relação entre a actividade antioxidante e o desenvolvimento da tolerância ao NaCl.

Outro aspecto de grande interesse seria averiguar se as proteínas que surgiram aumentadas e *de novo* no tecido caloso crescido na presença de NaCl estão envolvidas no processo de adaptação ao NaCl e, se estiveram, tentar determinar as suas funções.

As linhas celulares tolerantes a NaCl obtidas neste trabalho constituíram um sistema experimental útil para avaliar a nível bioquímico algumas das respostas ao stresse salino; assim, considerámos ser adequado a utilização deste sistema como modelo experimental para desenvolver o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na tolerância salina.

5 – BIBLIOGRAFIA

- Abd-Alla, M.H.; T.D. Vuong e J.E. Harper, 1998. Genotypic differences in dinitrogen fixation response to NaCl stress in intact and grafted soybean. *Crop Science*, 38: 72–77.
- Ahloowalia, B.S., 1982. Plant regeneration from callus culture in potato. *Euphytica*, 31: 755–759.
- Alhagdow, M.M.; N.N. Barthakur e D.J. Donnelly, 1999. Salinity stress and sodium-potassium interactions in micropropagated potatoes. *Potato Research*, 42: 73–78.
- Allakhverdiev, S.I.; A. Sakamoto; Y. Nishiyama; M. Inaba e N. Murata, 2000. Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp.. *Plant Physiology*, 123: 1047–1056.
- Alscher, R.G.; J.L. Donahue e C.L. Cramer, 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*, 100: 224–233.
- Ancora, G. e A. Sonnino, 1987. In vitro induction of mutation in potato. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 3. Y.P.S. Bajaj, Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 408–424.
- Anônimo, 2000. Tendências mundiais do sector da batata. *Frutas, Legumes e Flores*, 55: 51–54.
- Anstis, P.J.P. e D.H. Northcote, 1973. The initiation, growth, and characteristics of a tissue culture from potato tubers. *Journal of Experimental Botany*, 24(79): 425–441.
- Apse, M.P.; G.S. Aharon; W.A. Snedden e E. Blumwald, 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis*. *Science*, 285: 1256–1258.
- Awad, A.S.; D.G. Edwards e L.C. Campbell, 1990. Phosphorus enhancement of salt tolerance of tomato. *Crop Science*, 30: 123–128.
- Bajaj, Y.P.S., 1987. Biotechnology and 21st century potato. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 3. Y.P.S. Bajaj, Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 3–22.
- Bajji, M.; J.-M. Kinet e S. Lutts, 1998. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Science*, 137: 131–142.
- Bar-Zvi, D. e A. Gilad, 1999. Studies of salt stress- and water stress-regulated genes: the stress-regulated *Asr1* gene encodes a DNA-binding protein. In *Plant Responses to Environmental Stress*. M.F. Smallwood, C.M. Calvert e D.J. Bowles, Eds. Bios, Scientific Publishers Ltd, Oxford: 179–184.

- Barkla, B.J.; L. Zingarelli; E. Blumwald e J.A.C. Smith, 1995. Tonoplast Na^+/H^+ antiport activity and its energization by the vacuolar H^+ -ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiology*, 109: 549–556.
- Bartosz, G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19(1): 47–64.
- Belchior, A.N., 2000. Tendências na produção da batata. *Frutas, Legumes e Flores*, 55: 55–58.
- Ben-Hayyim, G. e J. Kochba, 1983. Aspects of salt tolerance in a NaCl-selected stable cell line of *Citrus sinensis*. *Plant Physiology*, 72: 685–690.
- Ben-Hayyim, G.; D. Holland e Y. Eshdat, 1999. Salt-induced proteins related to oxidative stress: PHGPX and other proteins of the Halliwell-Asada cycle. In *Plant Responses to Environmental Stress*. M.F. Smallwood, C.M. Calvert e D.J. Bowles, Eds. Bios, Scientific Publishers Ltd, Oxford: 185–189.
- Ben-Hayyim, G.; P. Spiegel-Roy e H. Neumann, 1985. Relation between ion accumulation of salt-sensitive and isolated stable salt-tolerant cell lines of *Citrus aurantium*. *Plant Physiology*, 78: 144–148.
- Bethke, P.C. e M.C. Drew, 1992. Stomatal and nonstomatal components to inhibition of photosynthesis in leaves of *Capsicum annuum* during progressive exposure to NaCl salinity. *Plant Physiology*, 99: 219–226.
- Binzel, M.L.; P.M. Hasegawa; A.K. Handa e R.A. Bressan, 1985. Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiology*, 79: 118–125.
- Binzel, M.L.; F.D. Hess; R.A. Bressan e P.M. Hasegawa, 1988. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiology*, 86: 607–614.
- Blom-Zandstra, M., 2000. Sodium transport and distribution in sweet pepper during and after salt stress. *Proceedings of the XXV International Horticultural Congress, ISHS—Acta Horticulturae*, 511: 205–211.
- Bohnert, H.J.; D.E. Nelson e R.G. Jensen, 1995. Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell*, 7: 1099–1111.
- Bohnert, H.J. e R.G. Jensen, 1996. Metabolic engineering for increased salt tolerance—the next step. *Australian Journal of Plant Physiology*, 23: 661–667.
- Bolte, S.; K. Schiene e K.J. Dietz, 2000. Characterization of a small GTP-binding protein of the rab 5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Molecular Biology*, 42: 923–936.
- Boursier, P. e A. Läuchli, 1990. Growth responses and mineral nutrient relations of salt-stressed sorghum. *Crop Science*, 30: 1226–1233.

- Bowler, C.; M.V. Montagu e D. Inzé, 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 83–116.
- Bowler, C.; W.V. Camp; M.V. Montagu e D. Inzé, 1994. Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(3): 199–218.
- Bray, E.A.; J. B.-Serres e E. Weretilnyk, 2000. Responses to abiotic stresses. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. B.B. Buchanan, W. Gruissem e R.L. Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland: 1158–1203.
- Bressan, R.A.; P.M. Hasegawa e J.M. Pardo, 1998. Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends in Plant Science*, 3: 411–412.
- Broin, M.; S. Cuiné; G. Peltier e P. Rey, 1999. Involvement of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. *FEBS Letters*, 467: 245–248.
- Bueno, P.; A. Piqueras; J. Kurepa; A. Savouré; N. Verbruggen; M. Van Montagu e D. Inzé, 1998. Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Science*, 138: 27–34.
- Casano, L.M.; M. Martín; J.M. Zapata e B. Sabater, 1999. Leaf age- and paraquat concentration-dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress. *Plant Science*, 149: 13–22.
- Carputo, D.; T. Cardì; T. Chiari; G. Ferraiolo e L. Frusciante, 1995. Tissue culture response in various wild and cultivated *Solanum* germplasm accessions for exploitation in potato breeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 41: 151–158.
- Carvalho, J.M. e M.L. Guimarães, 1976. Isolation of a callus from potato roots. *Boletim da Soc. Brot.*, 50: 145–165.
- Chandler, P.M. e M. Robertson, 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 113–141.
- Chapman, H.W., 1955. Potato tissue cultures. *American Potato Journal*, 32: 207–210.
- Chartzoulakis, K.S. e G. Klapaki, 2000. Effects of NaCl salinity on growth and yield of two pepper cultivars. *Proceedings of the XXV International Horticultural Congress, ISHS—Acta Horticulturae*, 511: 143–148.
- Cheeseman, J.M., 1988. Mechanisms of salinity tolerance in plants. *Plant Physiology*, 87: 547–550.
- Conklin, P.L., 1998. Vitamin C: a new pathway for an old antioxidant. *Trends in Plant Science*, 3: 329–330.

- Cramer, G.R.; A. Läuchli e V.S. Polito, 1985. Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress?. *Plant Physiology*, 79: 207–211.
- Dat, J.; S. Vandenabeele; E. Vranová; M. Van Montagu; D. Inzé e F. Van Breusegem, 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences*, 57: 779–795.
- Davey, M.W.; M. Van Montagu; D. Inzé; M. Sanmartin; A. Kanellis; N. Smirnoff; I.J.J. Benzie; J.J. Strain; D. Favell e J. Fletcher, 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 825–860.
- Davies, W.J. e J. Zhang, 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42: 55–76.
- Delfine, S.; A. Alvino; M.C. Villani; G. Santarelli; F. Loreto e M. Centritto, 2000. Agronomic and physiological aspects of salinity stress on a field-grown tomato crop. *Proceedings of the 3rd IS on Irrigation Horticultural Crops, ISHS—Acta Horticulturae*, 537: 647–649.
- Delgado, I.C. e A.J. Sánchez-Raya, 1999. Physiological response of sunflower seedlings to salinity and potassium supply. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30: 773–783.
- DiCosmo, F. e M. Misawa, 1995. Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances*, 13: 425–453.
- Dixon, R.A., 1985. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In *Plant cell culture, a practical approach*. R.A. Dixon, Eds. IRL Press Limited, Oxford, England: 1–20.
- Downton, W.J.S.; W.J.R. Grant e S.P. Robinson, 1985. Photosynthetic and stomatal responses of spinach leaves to salt stress. *Plant Physiology*, 77: 85–88.
- Dracup, M., 1991. Increasing salt tolerance of plants through cell culture requires greater understanding of tolerance mechanisms. *Australian Journal of Plant Physiology*, 18: 1–15.
- Draper & Hadley, 1990 – citado por Wang, J.; H. Zhang e R.D. Allen, 1999. Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiology*, 40(7): 725–732.
- Droillard, M. e A. Paulin, 1990. Isozymes of superoxide dismutase in mitochondria and peroxisomes isolated from petals of carnation (*Dianthus caryophyllus*) during senescence. *Plant Physiology*, 94: 1187–1192.

- Ducreux, G.; L. Rossignol e M. Rossignol, 1986. La pomme de terre. *La Recherche*, 17: 192–203.
- Epstein, E.; J.D. Norlyn; D.W. Rush; R.W. Kingsbury; D.B. Kelley; G.A. Cunningham e A.F. Wrona, 1980. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science*, 210: 399–404.
- Ericson, M.C. e S.H. Alfinito, 1984. Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture. *Plant Physiology*, 74: 506–509.
- Esna-Ashari, M. e T.A. Villiers, 1998. Plant regeneration from tuber discs of potato (*Solanum tuberosum* L.) using 6-benzylaminopurine (BAP). *Potato Research*, 41: 371–382.
- Espinoza, N.O. e J.H. Dodds, 1985. Adventitious shoot formation on cultured potato roots. *Plant Science*, 41: 121–124.
- Espinoza, N.O.; R. Estrada; D. S.-Rodriguez; P. Tovar; R. Lizarraga e J.H. Dodds, 1986. The potato: a model crop plant for tissue culture. *Outlook on Agriculture*, 15: 21–26.
- Eymery, F. e P. Rey, 1999. Immunocytolocalization of CDSP 32 and CDSP 34, two chloroplastic drought-induced stress proteins in *Solanum tuberosum* plants. *Plant Physiology Biochemistry*, 37(4): 305–312.
- Fidalgo, F., 1995. Tratamentos de batateiras com agroquímicos. Estudos bioquímicos e ultraestruturais de plantas crescidas no campo. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto. 212 pp.
- Fidalgo, F.; I. Santos e R. Salema, 1997. Callus tissue of *Solanum tuberosum* L. cultured in the presence of the pyrethroid deltamethrin. *Ann. appl. Biol.*, 131: 171–178.
- Flowers, T.J.; P.F. Troke e A.R. Yeo, 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Reviews Plant Physiology*, 28: 89–121.
- Fourcroy, P., 1999. Iron and oxidative stress in plants. In *Plant Responses to Environmental Stress*. M.F. Smallwood, C.M. Calvert e D.J. Bowles, Eds. Bios, Scientific Publishers Ltd, Oxford: 51–57.
- Foyer, C.H.; H. L.-Delgado; J.F. Dat e I.M. Scott, 1997. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, 100: 241–254.
- Foyer, C.H. e G. Noctor, 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*, 146: 359–388.
- Frommer, W.B.; U. Ludewig e D. Rentsch, 1999. Taking transgenic plants with a pinch of salt. *Science*, 285: 1222–1223.
- Fukuda, H.; M. Ito; M. Sugiyama e A. Komamine, 1994. Mechanisms of the proliferation and differentiation of plant cells in cell culture systems. *Int. J. Dev. Biol.*, 38: 287–299.

- Garbarino, J. e F.M. DuPont, 1988. NaCl induces a Na^+/H^+ antiport in tonoplast vesicles from barley roots. *Plant Physiology*, 86: 231–236.
- Gillet, B.; A. Beyly; G. Peltier e P. Rey, 1998. Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination. *The Plant Journal*, 16(2): 257–262.
- Gómez, J.M.; J.A. Hernández; A. Jiménez; L.A. Del Río e F. Sevilla, 1999. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radical Research*, 31: 11–18.
- Gonzales, R.A. e J.M. Widholm, 1985. Selection of plant cells for desirable characteristics: inhibitor resistance. In *Plant cell culture, a practical approach*. R.A. Dixon, Eds. IRL Press Limited, Oxford, England: 67–78.
- Gossett, D.R.; E.P. Millhollon e M.C. Lucas, 1994a. Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science*, 34: 706–714.
- Gossett, D.R.; E.P. Millhollon; M.C. Lucas; S.W. Banks e M.-M. Marney, 1994b. The effects of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt-tolerant and salt-sensitive cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports*, 13: 498–503.
- Gossett, D.R.; S.W. Banks; E.P. Millhollon e M.C. Lucas, 1996. Antioxidant response to NaCl stress in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine, and exogenous glutathione. *Plant Physiology*, 112: 803–809.
- Greenway, H. e R. Munns, 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Reviews Plant Physiology*, 31: 149–190.
- Grillo, S.; A. Costa; M. Tucci; M.R. Amatruda; F. Consiglio; L. Vigh e A. Leone, 1996. Regulation of gene expression during cellular adaptation to water stress. In *Physical Stresses in Plants. Genes and Their Products for Tolerance*. S. Grillo e A. Leone, Eds. Springer, Berlin: 163–169.
- Gueta-Dahan, Y.; Z. Yaniv; B.A. Zilinskas e G. Ben-Hayyim, 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in Citrus. *Planta*, 203: 460–469.
- Hagen *et al.*, 1990 – citado por Hagen, S.R.; P. Muneta; D. LeTourneau e J. Brown, 1991. Effect of temperature on the starch content of potato callus tissue. *American Potato Journal*, 68: 191–195.

- Hagen, S.R. e P. Muneta, 1993. Effect of temperature on carbohydrate content, ADP glucose pyrophosphorylase, and ATP- and PPI-dependent phosphofructokinase activity of potato tuber callus tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32: 115–121.
- Hagen, S.R.; P. Muneta; D. LeTourneau e J. Brown, 1991. Effect of temperature on the starch content of potato callus tissue. *American Potato Journal*, 68: 191–195.
- Hagen, S.R.; S. Harrison; P. Muneta e D. LeTourneau, 1993. Methods to increase the starch content of potato tuber callus tissue. *Potato Research*, 36: 293–299.
- Hartmann, H.T.; D.E. Kester e F.T. Davies, 1990. Principles of tissue culture for micropropagation. In *Plant Propagation. Principles and Practices*. 5ª Ed. Prentice-Hall, Inc., New Jersey: 459–495.
- Hawkins, H.-J. e S.H. Lips, 1997. Cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. as a model system for N and salinity response. Effect of salinity on NO_3^- uptake and PM-ATPase activity. *Journal Plant Physiology*, 150: 103–109.
- Hernández, J.A.; A. Campillo; A. Jiménez; J.J. Alarcón e F. Sevilla, 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytologist*, 141: 241–251.
- Hernández, J.A.; A. Jiménez; P. Mullineaux e F. Sevilla, 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment*, 23: 853–862.
- Hernández, J.A.; E. Olmos; F.J. Corpas; F. Sevilla e L.A. Del Río, 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science*, 105: 151–167.
- Hernández, J.A.; F.J. Corpas; M. Gómez; L.A. Del Río e F. Sevilla, 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 89: 103–110.
- Hernandez, S.; C. Deleu e F. Larher, 2000. Accumulation de proline dans les tissus foliaires de tomate en réponse à la salinité. *Sciences de la vie*, 323: 551–557.
- Hilal, M.; A.M. Zenoff; G. Ponessa; H. Moreno e E.M. Massa, 1998. Saline stress alters the temporal patterns of xylem differentiation and alternative oxidase expression in developing soybean roots. *Plant Physiology*, 90: 1444–1456.
- Hodgins, R.R. e R.B. van Huystee, 1986. Rapid simultaneous estimation of protoporphyrin and Mg-porphyrins in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 125: 311–326.
- Holmberg, N. e L. Bülow, 1998. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science*, 3: 61–66.

- Hoshida, H.; Y. Tanaka; T. Hibino; Y. Hayashi; A. Tanaka e T. Takabe, 2000. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpresses chloroplast glutamine synthetase. *Plant Molecular Biology*, 43: 103–111.
- Hurkman, W.J. e C.K. Tanaka, 1987. The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiology*, 83: 517–524.
- Hurkman, W.J.; C.S. Fornari e C.K. Tanaka, 1989. A comparison of the effect of salt on polypeptides and translatable mRNAs in roots of a salt-tolerant and a salt-sensitive cultivar of barley. *Plant Physiology*, 90: 1444–1456.
- Hussey, G., 1980. *In Vitro* propagation. *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*: 51–61.
- Hussey, G. e N.J. Stacey, 1981. *In Vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany*, 48: 787–796.
- Iannelli, M.A.; F. Van Breusegem; M. Van Montagu; D. Inzé e A. Massacci, 1999. Tolerance to low temperature and paraquat-mediated oxidative stress in two maize genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 50: 523–532.
- Imlay, J.A. e S. Linn, 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240: 1302–1309.
- Iturbe-Ormaetxe, I.; P.R. Escuredo; C. A.-Igor e M. Becana, 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiology*, 116: 173–181.
- Jiménez, A.; J.A. Hernández; A.R. Barceló; L.M. Sandalio; L.A. Del Río e F. Sevilla, 1998. Mitochondrial and peroxisomal ascorbate peroxidase of pea leaves. *Physiologia Plantarum*, 104: 687–692.
- İnci, F.; H.A. Öktem e M. Yücel, 1998. Effect of water deficit conditions on superoxide dismutase isoenzyme activities in wheat. *Cereal Research Communications*, 26(3): 297–304.
- Jacobsen, E., 1987. Genetic diversity in protoplast- and cell-derived plants of potato. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 3. Y.P.S. Bajaj, Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 358–374.
- Jaiswal, V.S. e P. Narayan, 1985. Plantlet regeneration from hypocotyl callus of *Solanum torvum* Swartz. *Journal of Plant Physiology*, 119: 381–383.
- Jarret, R.L.; P.M. Hasegawa e H.T. Erickson, 1980. Factors affecting shoot initiation from tuber discs of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, 49: 177–184.

- Jiménez, A.; J.A. Hernández; L.A. Del Río e F. Sevilla, 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, 114: 275–284.
- Jolivet, Y.; J.C. Pireaux e P. Dizengremel, 1990. Changes in properties of barley leaf mitochondria isolated from NaCl-treated plants. *Plant Physiology*, 94: 641–646.
- Kasuga, M.; Q. Liu; S. Miura; K.Y. Shinozaki e K. Shinozaki, 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology*, 17: 287–291.
- Katerji, N.; J.W. Van Hoorn; A. Hamdy e M. Mastrorilli, 2000. Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. *Agricultural Water Management*, 43: 99–109.
- Katsuhara, M. e T. Kawasaki, 1996. Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley roots. *Plant Cell Physiology*, 37(2): 169–173.
- Kerepesi, I. e G. Galiba, 2000. Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop Science*, 40: 482–487.
- Khavari-Nejad, R.A. e Y. Mostofi, 1998. Effects of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides, and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars. *Photosynthetica*, 35(1): 151–154.
- Kiegle, E.; C.A. Moore; J. Haseloff; M.A. Tester e M.R. Knight, 2000. Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *The Plant Journal*, 23(2): 267–278.
- Kinraide, T.B., 1999. Interactions among Ca^{2+} , Na^{+} and K^{+} in salinity toxicity: quantitative resolution of multiple toxic and ameliorative effects. *Journal of Experimental Botany*, 50(338): 1495–1505.
- Knight, H. e M.R. Knight, 1999. Calcium signalling in plants responding to stress. In *Plant Responses to Environmental Stress*. M.F. Smallwood, C.M. Calvert e D.J. Bowles, Eds. Bios, Scientific Publishers Ltd, Oxford: 1–8.
- Kuźniak, E. e H. Urbanek, 2000. The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22: 195–203.
- Kwon, T.R.; P.J.C. Harris e W.F. Bourne, 2000. Salt-induced reduction of growth in – Brassica rapa- L. *Proceedings of the XXV International Horticultural Congress, ISHS—Acta Horticulturae*, 511: 157–162.
- Lam, S.-L., 1977. Plantlet formation from potato tuber discs *in vitro*. *Am. Potato Journal*, 54: 465–468.

- Larkin, P.J. e W.R. Scowcroft, 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60: 197–214.
- LaRosa, P.C.; A.K. Handa; P.M. Hasegawa e R.A. Bressan, 1985. Absciscic acid accelerates adaptation of cultured tobacco cells to salt. *Plant Physiology*, 79: 138–142.
- LaRosa, P.C.; D. Rhodes; J.C. Rhodes; R.A. Bressan e L.N. Csonka, 1991. Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered Δ -pyrroline-5-carboxylate reductase. *Plant Physiology*, 96: 245–250.
- LaRosa, P.C.; P.M. Hasegawa e R.A. Bressan, 1984. Photoautotrophic potato cells: transition from heterotrophic to autotrophic growth. *Physiologia Plantarum*, 61: 279–286.
- Lazcano-Ferrat, I. e C.J. Lovatt, 1997. Effect of salinity on arginine biosynthesis in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. acutifolius* A. gray. *Crop Science*, 37: 469–475.
- Leone, A.; A. Costa; M. Tucci e S. Grillo, 1994a. Adaptation versus shock response to polyethylene glycol-induced low water potential in cultured potato cells. *Physiologia Plantarum*, 92: 21–30.
- Leone, A.; A. Costa; M. Tucci e S. Grillo, 1994b. Comparative analysis of short- and long-term changes in gene expression caused by low water potential in potato (*Solanum tuberosum*) cell-suspension cultures. *Plant Physiology*, 106: 703–712.
- Levy, D.; E. Fogelman e Y. Ytzhak, 1988. The effect of water salinity on potatoes (*Solanum tuberosum* L.): physiological indices and yielding capacity. *Potato Research*, 31: 601–610.
- Levy, D.; E. Fogelman e Y. Ytzhak, 1993. Influence of water and soil salinity on emergence and early development of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars and effect of physiological age of seed tubers. *Potato Research*, 36: 335–340.
- Liaaen-Jensen, S. e A. Jensen, 1971. Quantitative determination of carotenoids in photosynthetic tissues. In *Methods in Enzymology*, Vol. XXIII — *Photosynthesis*, Part A. A. San Pietro, Eds. Academic Press, New York, London: 586–601.
- Lin, C.C. e C.H. Kao, 2000. Effect of NaCl stress on H_2O_2 metabolism in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 30: 151–155.
- Lin, H.; S.S. Salus e K.S. Schumaker, 1997. Salt sensitivity and the activities of the H^+ -ATPases in cotton seedlings. *Crop Science*, 37: 190–197.
- Lingle, S.E.; R.P. Wiedenfeld e J.E. Irvine, 2000. Sugarcane response to saline irrigation water. *Journal of Plant Nutrition*, 23(4): 469–486.

- Lovelli, S.; A.R. Rivelli; I. Nardiello; M. Perniola e E. Tarantino, 2000. Growth, leaf ion concentration, stomatal behaviour and photosynthesis of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) irrigated with saline water. *Proceedings of the 3rd IS on Irrigation Horticultural Crops, ISHS—Acta Horticulturae*, 537: 679–681.
- Lowry, O.; N. Rosebrough; A. Farr e R. Randall, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265–275.
- Lutts, S.; J.M. Kinet e J. Bouharmont, 1999. Improvement of rice callus regeneration in the presence of NaCl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57: 3–11.
- Maas & Hoffman, 1977 – citado por Zhang, Y. e D.J. Donnelly, 1997. In vitro bioassays for salinity tolerance screening of potato. *Potato Research*, 40: 285–295.
- Maathuis, F.J.M. e A. Amtmann, 1999. K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios. *Annals of Botany*, 84: 123–133.
- Mackay, G.R., 1996. An agenda for future potato research. *Potato Research*, 39: 387–394.
- Marcum, K.B., 1999. Salinity tolerance mechanisms of grasses in the subfamily Chloridoideae. *Crop Science*, 39: 1153–1160.
- Markhart, A.H. e B. Smit, 1990. Measurement of root hydraulic conductance. *HortScience*, 25(3): 282–287.
- Marschner, H., 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. 2^a Ed. Academic Press, Inc., London.
- McNulty, I.B., 1985. Rapid osmotic adjustment by a succulent halophyte to saline shock. *Plant Physiology*, 78: 100–103.
- Melchers *et al.*, 1978 – citado por Bajaj, Y.P.S., 1987. Biotechnology and 21st century potato. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 3. Y.P.S. Bajaj, Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 3–22.
- Meneguzzo, S.; C.L.M. Sgherri; F. N.-Izzo e R. Izzo, 1998. Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in NaCl-treated wheat. *Physiologia Plantarum*, 104: 735–740.
- Mizoguchi, T.; Y. Yoshiba; K.Y.-Shinozaki e K. Shinozaki, 1996. Water stress-induced genes in *Arabidopsis thaliana*. In *Physical Stresses in Plants. Genes and Their Products for Tolerance*. S. Grillo e A. Leone, Eds. Springer, Berlin: 153–161.
- Moons, A.; E. Prinsen; G. Bauw e M.V. Montagu, 1997. Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *The Plant Cell*, 9: 2243–2259.
- Muneta, P.; S. Hagen; D. LeTourneau e J. Brown, 1990. Effect of temperature on the sugar content of potato callus tissue. *American Potato Journal*, 67: 209–215.

- Munns, R. e A. Termaat, 1986. Whole plant responses to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 143–160.
- Murashige, T. e F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.
- Nadler, A. e B. Heuer, 1995. Effect of saline irrigation and water deficit on tuber quality. *Potato Research*, 38: 119–123.
- Naik, P.S. e J.M. Widholm, 1993. Comparison of tissue culture and whole plant responses to salinity in potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33: 273–280.
- Neill, S.; R. Desikan; A. Clarke e J. Hancock, 1999. H₂O₂ signalling in plant cells. In *Plant Responses to Environmental Stress*. M.F. Smallwood, C.M. Calvert e D.J. Bowles, Eds. Bios, Scientific Publishers Ltd, Oxford: 59–64.
- Neumann, P.M.; E. Van Volkenburgh e R.E. Cleland, 1988. Salinity stress inhibits bean leaf expansion by reducing turgor, not wall extensibility. *Plant Physiology*, 88: 233–237.
- Nitsch, J.P. e C. Nitsch, 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85–87.
- Niu, X.; R.A. Bressan; P.M. Hasegawa e J.M. Pardo, 1995. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*, 109: 735–742.
- Noctor, G. e C.H. Foyer, 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249–279.
- Ochatt, S.J.; P.L. Marconi; S. Radice; P.A. Arnozis e O.H. Caso, 1999. *In vitro* recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55: 1–8.
- Okuma, E.; K. Soeda; M. Tada e Y. Murata, 2000. Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 46(1): 257–263.
- Oliveira, M., 1990. *Física dos solos. Alguns aspectos de interesse agronómico*. Série Didáctica, 3. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Paris, N.; C.M. Stanley; R.L. Jones e J.C. Rogers, 1996. Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell*, 85: 563–572.
- Peñuelas, J.; R. Isla; I. Filella e J.L. Araus, 1997. Visible and near-infrared reflectance assessment of salinity effects on barley. *Crop Science*, 37: 198–202.
- Perez-Alfocea *et al.*, 1994 – citado por Rus, A.M.; M. Panoff; F. Perez-Alfocea e M.C. Bolarin, 1999. NaCl responses in tomato calli and whole plants. *Journal of Plant Physiology*, 155: 727–733.

- Perl, A.; R. P.-Treves; S. Galili; D. Aviv; E. Shalgi; S. Malkin e E. Galun, 1993. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu,Zn superoxide dismutases. *Theor Appl Genet*, 85: 568–576.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83: 346–356.
- Plaut, Z. e E. Federman, 1991. Acclimation of CO₂ assimilation in cotton leaves to water stress and salinity. *Plant Physiology*, 97: 515–522.
- Polidoros, A.N. e J.G. Scandalios, 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum*, 106: 112–120.
- Prasad, T., 1997. Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. *Plant Physiology*, 114: 1369–1376.
- Pruvot, G.; J. Massimino; G. Peltier e P. Rey, 1996. Effects of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced proteins in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*, 97: 123–131.
- Qian, Y.L.; M.C. Engelke e M.J.V. Foster, 2000. Salinity effects on zoysiagrass cultivars and experimental lines. *Crop Science*, 40: 488–492.
- Quraishi, A., 1985. Tissue culture studies as a means for exploring variability in potato. *Pakistan Journal Agricultural Research*, 6(1): 20–22.
- Quraishi, A.; I. John; L. R.-Bancilhon e R. Nozeran, 1987. Effect of the origin of explant on callus initiation and differentiation in potato. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 3. Y.P.S. Bajaj, Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 243–255.
- Rains, D.W.; S.S. Croughan e T.P. Croughan, 1986. Isolation and characterization of mutant cell lines and plants: salt tolerance. In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 3. I.K. Vasil, Eds. Academic Press, Inc: 537–547.
- Ramagopal, S., 1987. Salinity stress induced tissue-specific proteins in barley seedlings. *Plant Physiology*, 84: 324–331.
- Rashid, A.; R.H. Qureshi; P.A. Hollington e R.G. Wyn Jones, 1999. Comparative responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to salinity at the seedling stage. *Journal Agronomy & Crop Science*, 182: 199–207.
- Raviv, A.; R.A. Avenido; L.F. Tisalona; O.P. Damasco; E.M.T. Mendoza; Y. Pinkas e S. Zilkah, 1998. Callus and somatic embryogenesis of *Persea* species. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 4: 196–206.

- Raychaudhuri, S.S. e X.W. Deng, 2000. The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *The Botanical Review*, 66: 89–98.
- Rietveld, R.C.; P.M. Hasegawa e R.A. Bressan, 1987. Genetic variability in tuber derived potato plants. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 3. Y.P.S. Bajaj, Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 392–407.
- Robinson, S.P.; W.J.S. Downton e J.A. Millhouse, 1983. Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed spinach. *Plant Physiology*, 73: 238–242.
- Rodriguez, P.; J. Dell'Amico; D. Morales; M.J.S. Blanco e J.J. Alarcón, 1997. Effects of salinity on growth, shoot water relations and root hydraulic conductivity in tomato plants. *Journal of Agricultural Science*, 128: 439–444.
- Rodríguez-Rosales, M.P.; L. Kerkeb; P. Bueno e J.P. Donaire, 1999. Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H⁺-ATPase and antioxidant enzyme activities of tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill) calli. *Plant Science*, 143: 143–150.
- Roosens, N.H.; R. Willem; Y. Li; I. Verbruggen; M. Biesemans e M. Jacobs, 1999. Proline metabolism in the wild-type and in a salt-tolerant mutant of *Nicotiana plumbaginifolia* studied by ¹³C-nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiology*, 121: 1281–1290.
- Rus, A.M.; M. Panoff; F. Perez-Alfocea e M.C. Bolarin, 1999. NaCl responses in tomato calli and whole plants. *Journal of Plant Physiology*, 155: 727–733.
- Sabbah & Tal, 1990 – citado por Ochatt, S.J.; P.L. Marconi; S. Radice; P.A. Arnozis e O.H. Caso, 1999. *In vitro* recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55: 1–8.
- Sabbah, S. e M. Tal, 1995. Salt tolerance in *Solanum kurzianum* and *S. tuberosum* cvs Alpha and Russet Burbank. *Potato Research*, 38: 319–330.
- Sacher, R.F. e R.C. Staples, 1985. Inositol and sugars in adaptation of tomato to salt. *Plant Physiology*, 77: 206–210.
- Samaras, Y.; R.A. Bressan; L.N. Csonka; M.G. G.-Ríos; M.P. D'Urzo e D. Rhodes, 1995. Proline accumulation during drought and salinity. In *Environment and Plant Metabolism. Flexibility and acclimation*. N. Smirnov, Eds. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford: 161–187.
- Sanders, D. e P. Bethke, 2000. Membrane Transport. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. B.B. Buchanan, W. Gruissem e R.L. Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland: 110–158.

- Santos, J.Q., 1991. *Fertilização. Fundamentos da utilização dos adubos e correctivos*. Pub. Europa- América.
- Santos, M.C., 1997. Estudo de alguns mecanismos de regulação osmótica e da expressão da glutamina sintetase em células de *Helianthus annuus* L. sujeitas a stress salino: selecção de células tolerantes a NaCl. Tese de Doutoramento. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro. 168 pp.
- Saruyama, H. e M. Tanida, 1995. Effect of chilling on activated oxygen-scavenging enzymes in low temperature-sensitive and -tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 109: 105–113.
- Savouré, A.; D. Thorin; M. Davey; X.-J. Hua; S. Mauro; M. Van Montagu; D. Inzé e N. Verbruggen, 1999. NaCl and CuSO₄ treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L.. *Plant, Cell and Environment*, 22: 387–396.
- Scandalios, J.G., 1990. Targeting, import, and processing of nuclear gene-encoded proteins into mitochondria and peroxisomes. In *Isozymes: Structure, Function, and Use in Biology and Medicine*. Eds. Wiley-Liss, Inc.: 515–544.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101: 7–12.
- Scandalios, J.G., 1997. Molecular genetics of superoxide dismutases in plants. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 527–568.
- Scandalios, J.G.; L. Guan e A.N. Polidoros, 1997. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 343–406.
- Schachtman, D. e W. Liu, 1999. Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends in Plant Science*, 4: 281–287.
- Seemann, J.R. e T.D. Sharkey, 1986. Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and metabolite pool sizes in *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant Physiology*, 82: 555–560.
- Shannon, M.C. e C.M. Grieve, 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulturae*, 78: 5–38.
- Shannon, M.C.; J.D. Rhoades; J.H. Draper; S.C. Scardaci e M.D. Spyres, 1998. Assessment of salt tolerance in rice cultivars in response to salinity problems in California. *Crop Science*, 38: 394–398.

- Shaw, R.; J.L. Varns; K.A. Miller e E.A. Talley, 1976. Potato tuber callus. Validation as biochemical tool. *Plant Physiology*, 58: 464–467.
- Simmonds, N.W., 1995. Potatoes. In *Evolution of Crop Plants*. 2ª Ed. J. Smart e N.W. Simmonds, Eds. Longman Scientific & Technical, England: 466–471.
- Singh, N.K.; A.K. Handa; P.M. Hasegawa e R.A. Bressan, 1985. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiology*, 79: 126–137.
- Singh, N.K.; C.A. Bracker; P.M. Hasegawa; A.K. Handa; S. Buckel; M.A. Hermodson; Ed Pfankoch; F.E. Regnier e R.A. Bressan, 1987. Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiology*, 85: 529–536.
- Singh, N.K.; D.E. Nelson; D. Kuhn; P.M. Hasegawa e R.A. Bressan, 1989. Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potencial. *Plant Physiology*, 79: 126–137.
- Skriver, K. e J. Mundy, 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Cell*, 2: 503–512.
- Smirnoff, N., 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. In *Environment and Plant Metabolism. Flexibility and acclimation*. N. Smirnoff, Eds. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford: 217–243.
- Smith, M.K. e J.A. McComb, 1981. Effect of NaCl on the growth of whole plants and their corresponding callus cultures. *Australian Journal of Plant Physiology*, 8: 267–275.
- Somal, T.L.C. e P.A.J. Yapa, 1998. Accumulation of proline in cowpea under nutrient, drought, and saline stresses. *Journal of Plant Nutrition*, 21(11): 2465–2473.
- Spychalla, J.P. e S.L. Desborough, 1990. Superoxide dismutase, catalase, and α -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiology*, 94: 1214–1218.
- Struik, P.C.; M.F. Askew; A. Sonnino; D.K.L. Mackerron e V. Umaerus, 1997. Forty years of potato research: highlights, achievements and prospects. *Potato Research*, 40: 5–18.
- Subbarao, G.V.; C. Johansen; J.V.K. Rao e M.K. Jana, 1990. Salinity tolerance in F₁ hybrids of pigeonpea and a tolerant wild relative. *Crop Science*, 30: 785–788.
- Taiz, L. e E. Zeiger, 1998. *Plant Physiology*. 2ª Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Massachusetts.
- Tanaka, K.; S. Takio; I. Yamamoto e T. Satoh, 1996. Purification of the cytosolic CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD) of *Marchantia paleacea* var. *diptera* and its resemblance to CuZn-SOD from chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 37(4): 523–529.

- Teixeira, D.M.C.; J.E. Pinto e M. Pasqual, 1989. *Influência da idade da plântula sobre a minituberização in vitro da batata (Solanum tuberosum L. cv. Bintje)*. Ciência e Prática, 13(1). Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais: 103–111.
- Termaat, A.; J.B. Passioura e R. Munns, 1985. Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl-affected wheat and barley. *Plant Physiology*, 77: 869–872.
- Tsang, W.T.; C. Bowler; D. Hérouart; W.V. Camp; R. Villarroel; C. Genetello; M.V. Montagu e D. Inzé, 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell*, 3: 783–792.
- Tsugane, K.; K. Kobayashi; Y. Niwa; Y. Ohba; K. Wada e H. Kobayashi, 1999. A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *The Plant Cell*, 11: 1195–1206.
- van Der Plas, L.H.W. e M.J. Wagner, 1984. Influence of osmotic stress on the respiration of potato tuber callus. *Physiologia Plantarum*, 62: 398–403.
- van Swaaij, A.C.; E. Jacobsen; J.A.K.W. Kiel e W.J. Feenstra, 1986. Selection, characterization and regeneration of hydroxyproline-resistant cell lines of *Solanum tuberosum*: tolerance to NaCl and freezing stress. *Physiologia Plantarum*, 68: 359–366.
- Vayda, M.E. e W.R. Belknap, 1992. The emergence of transgenic potatoes as commercial products and tools for basic science. *Transgenic Research*, 1: 149–163.
- Wang, L-W.; A.M. Showalter e I.A. Ungar, 1997. Effect of salinity on growth, ion content, and cell wall chemistry in *Atriplex prostrata* (Chenopodiaceae). *American Journal of Botany*, 84(9): 1247–1255.
- Wang, H.; Q. Qi; P. Schorr; A.J. Cutler; W.L. Crosby e L.C. Fowke, 1998. ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *The Plant Journal*, 15(4): 501–510.
- Wang, J.; H. Zhang e R.D. Allen, 1999. Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiology*, 40(7): 725–732.
- Wang, P.-j. e C.-y. Hu, 1985. Potato tissue culture and its applications in agriculture. In *Potato Physiology*. P.H. Li, Eds. Academic Press, Inc., New York, London: 503–577.
- Wang, P.-j. e L.-C. Huang, 1975. Callus cultures from potato tissues and the exclusion of potato virus X from plants regenerated from stem tips. *Canadian Journal of Botany*, 53(22): 2565–2567.

- Wang, W.C.; X.M. Shang; M. Yücel e H.T. Nguyen, 1993. Selection of cultured wheat cells for tolerance to high temperature stress. *Crop Science*, 33: 315–320.
- Watad, A-E.A.; L. Reinhold e H.R. Lerner, 1983. Comparison between a stable NaCl-selected *Nicotiana* cell line and the wild type. K^+ , Na^+ , and proline pools as a function of salinity. *Plant Physiology*, 73: 624–629.
- Watad, A-E.A.; M. Reuveni; R.A. Bressan e P.M. Hasegawa, 1991. Enhanced net K^+ uptake capacity of NaCl-adapted cells. *Plant Physiology*, 95: 1265–1269.
- White, P.J., 1999. The molecular mechanism of sodium influx to root cells. *Trends in Plant Science*, 4: 245–246.
- Willekens, H.; S. Chamnongpol; M. Davey; M. Schraudner; C. Langebartels; M.V. Montagu; D. Inzé e W.V. Camp, 1997. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C_3 plants. *The Embo Journal*, 16(16): 4806–4816.
- Widholm, J.M., 1987. Potato improvement through in vitro selection for increased levels of free amino acids. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 3. Y.P.S. Bajaj, Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 268–280.
- Winicov, I., 1993. Enhanced gene expression in salt tolerance of alfalfa cell lines and regenerated plants. In *Control of Plant Gene Expression*. CRC Press: 301–310.
- Winicov, I., 1998. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. *Annals of Botany*, 82: 703–710.
- Wise, R.R. e A.W. Naylor, 1987. Chilling-enhanced photooxidation. *Plant Physiology*, 83: 278–282.
- Yang, Y.W.; R.J. Newton e F.R. Miller, 1990a. Salinity tolerance in *Sorghum*. I. Whole plant response to sodium chloride in *S. bicolor* and *S. halepense*. *Crop Science*, 30: 775–781.
- Yang, Y.W.; R.J. Newton e F.R. Miller, 1990b. Salinity tolerance in *Sorghum*. II. Cell culture response to sodium chloride in *S. bicolor* and *S. halepense*. *Crop Science*, 30: 781–785.
- Yeo & Aitchison, 1973 – citado por Fidalgo, F., 1995. Tratamentos de batateiras com agroquímicos. Estudos bioquímicos e ultraestruturais de plantas crescidas no campo. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto. 212 pp.
- Yu, Q. e Z. Rengel, 1999. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. *Plant Science*, 142: 1–11.
- Zhang, Y. e D.J. Donnelly, 1997. In vitro bioassays for salinity tolerance screening of potato. *Potato Research*, 40: 285–95.

- Zhao, K.; R. Munns e R.W. King, 1991. Absciscic acid levels in NaCl-treated barley, cotton and saltbush. *Australian Journal of Plant Physiology*, 18: 17–24.
- Zhu, D. e G. Scandalios, 1994. Differential accumulation of manganese-superoxide dismutase transcripts in maize in response to absciscic acid and high osmoticum. *Plant Physiology*, 106: 173–178.
- Zhu, J.-K., 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*, 6: 66–71.
- Ziska, L.H.; J.R. Seemann e T.M. DeJong, 1990. Salinity induced limitations on photosynthesis in *Prunus salicina*, a deciduous tree species. *Plant Physiology*, 93: 864–70.