Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar
(*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat**

Roberta Magalhães Chagas

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ciências. Área de Concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.**

PIRACICABA

2007

Roberta Magalhães Chagas

Bióloga

**Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar
(*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat**

Orientadora:

Prof^a. Dra. **HELAINÉ CARRER**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de Concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.**

PIRACICABA

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Chagas, Roberta Magalhães

Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar
(*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat / Roberta Magalhães Chagas. - -
Piracicaba, 2007.
82 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Fotossíntese 3. Herbicidas 4. Superóxido dismutase I. Título

CDD 633.61

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

**“Talvez possamos um dia nos arrepender do que fizemos...
Mas o arrependimento é sinal de que não tivemos medo de tentar...
E daí se as coisas não deram certo como deveriam...
E daí se não era bem o que queríamos?
E nossa vida segue... para tentarmos e errarmos muitas vezes...
Isso é viver e aprender.”**
Oscar Wilde

Aos meus queridíssimos pais, Jeová Filho e Vlândia Magalhães

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Joaquim Albenísio G. Silveira, meu mestre, no verdadeiro sentido da palavra. Sem o seu apoio este trabalho não teria se concretizado. Obrigada pelos conselhos e contribuições cruciais para este trabalho e para minha formação acadêmica. Sempre lhe serei grata.

À Profa. Dra. Helaine Carrer, pela orientação, confiança e apoio para a realização deste trabalho, pelas sugestões e críticas ao mesmo.

Ao Prof. Dr. Victor Vitorello, pela co-orientação e pronta disponibilização de seu laboratório e casa de vegetação para desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Rafael Ribeiro, do IAC, pela inestimável ajuda com as análises de fluorescência da clorofila, bem como na análise dos resultados obtidos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos Josemir e Christine, da UFC, pelo auxílio nas atividades enzimáticas.

À CTC pela concessão dos toletes de cana-de-açúcar, e ao grupo de plantas daninhas, coordenado pelo Prof. Christoffoletti, pela aplicação do herbicida em estudo.

Aos mestres do Programa de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de plantas, pela contribuição de conhecimentos em minha formação de mestre.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, em especial, ao amigo Adriano e aos demais colegas, Carlos, Fátima, Eduardo, Valesca, Danila, Simone e Keini, pela amigável convivência.

Por fim, mas superiormente importante, à Daniel Becker, pelo apoio incondicional e maravilhosa companhia durante esses anos. À minha avozinha, por suas orações diárias, e à meus queridos pais, pelo suporte e afeto, mesmo à distância.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 A cana-de-açúcar	16
2.2 Ação do Paraquat em plantas	17
2.3 A fluorescência da clorofila <i>a</i>	19
2.4 O estresse oxidativo em plantas	21
2.5 Algumas enzimas antioxidantes	24
2.5.1 Superóxido dismutase (SOD)	25
2.5.2 Ascorbato Peroxidase (APX)	25
2.6 Proteínas induzidas sob condições de estresse	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Estratégia experimental e delineamento estatístico	28
3.2 Material vegetal	28
3.3 Condução do experimento	28
3.4 Análise da fluorescência da clorofila <i>a</i>	29
3.5 Concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	30
3.6 Conteúdo de clorofilas	31
3.7 Extração e determinação das concentrações de proteínas solúveis e insolúveis	31
3.8 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	32
3.8.1 Revelação do gel com nitrato de prata e coomassie blue	33
3.9 Atividade de superóxido dismutase	34
3.9.1 Atividade de SOD por espectrofotometria	34
3.9.2 Atividade de SOD em gel	34
3.10 Atividade de ascorbato peroxidase	35
3.11 Extração de proteínas totais para eletroforese bidimensional	35

3.12 Focalização isoeletrica (IEF) e SDS-PAGE	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Efeitos do tratamento sobre a fluorescência da clorofila <i>a</i>	39
4.2 Efeitos do tratamento sobre indicadores bioquímicos de resposta ao estresse oxidativo.....	47
4.2.1 Peroxidação de lipídeos	49
4.2.2 Conteúdo de clorofilas totais, <i>a</i> e <i>b</i>	51
4.2.3 Concentração de proteínas solúveis e insolúveis	53
4.2.4 SDS-PAGE 12,5% de proteínas solúveis e insolúveis	55
4.2.5 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)	56
4.2.6 Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase (APX)	60
4.3 Efeitos do tratamento sobre a expressão de proteínas totais por géis 2-D	61
5 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS	81

RESUMO

Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat

Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos fisiológicos do herbicida Paraquat, indutor de estresse oxidativo, em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). A escolha desta espécie como modelo fisiológico deste estudo deveu-se a sua importância econômica para o país, em especial para o Estado de São Paulo. O Paraquat (PQ) é um herbicida de contato que atua especificamente no Fotossistema II bloqueando o fluxo de elétrons e impedindo a redução do NADPH,ceptor final de elétrons. Como consequência, há a formação de radicais instáveis, reativos com a molécula de oxigênio (EROs), os quais causam danos em membranas, proteínas e ácidos nucleicos. A hipótese central foi a de que a atividade de peroxidase de ascorbato é mais sensível ao PQ do que a atividade de superóxido dismutase, nas mesmas condições. O experimento principal consistiu da aplicação, via pulverização foliar, de diferentes doses de PQ (0, 2, 4, 6 e 8 mM de Metil Violágeno, agente ativo), que permaneceu em contato por 24 e 48 horas. Após 18 horas de exposição, observou-se sintomas visuais de toxicidade e uma redução significativa da atividade fotossintética, medida através de parâmetros relacionados com a fluorescência da clorofila *a*. O nível de peroxidação de lipídeos, indicado pela concentração de TBARS, foi aumentado, indicando danos nas membranas causados pela geração de EROs. Um resultado importante foi o aumento da atividade específica de SOD (Superóxido Dismutase), primeira enzima de defesa contra EROs. Esse aumento foi gradativo com o aumento da dose e do tempo de exposição ao PQ. A isoforma mais evidente foi a SOD Cu/Zn, visualizada por atividade em gel nativo. Esta isoforma está presente preferencialmente em cloroplastos, organela alvo da ação do PQ. É importante ressaltar que mesmo em doses quase letais, a atividade desta enzima manteve-se em níveis semelhantes ao controle. Entretanto, a atividade de APX (Ascorbato Peroxidase), enzima que faz a remoção de radicais H_2O_2 , gerados pela SOD, foi reduzida abruptamente a partir de 4 mM PQ, apesar de ter sido observado um aumento na dose inicial (2 mM). Este fato sugere que os danos oxidativos em cana-de-açúcar tratadas com PQ podem ser causados pelo excesso de radicais H_2O_2 . Diferente da SOD, a APX é considerada bastante susceptível a certos tipos de estresse ambiental, logo perdendo sua atividade. Analisou-se também a expressão de proteínas por SDS-PAGE e eletroforese 2-D. Em ambos resultados, foram observados diminuição na expressão de algumas proteínas ocasionada pelo tratamento com PQ. Contudo, não foi possível detectar claramente a indução de peptídeos nesse caso, provavelmente devido ao alto grau de degradação das estruturas celulares. O aumento da atividade de SOD em cloroplastos de folhas de cana-de-açúcar tratadas com PQ, deve ser mais estudado, pois esta pode ser uma enzima alvo para programas de melhoramento genético visando obtenção de plantas com resistência ao PQ e a outros herbicidas com modo de ação no sistema fotossintético.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Estresse oxidativo; Paraquat; Fotossíntese.

ABSTRACT

Changes in photosynthesis and oxidative responses in sugarcane plants (*Saccharum officinarum* L.) treated with Paraquat

This work had the objective to analyze physiological effects of Paraquat herbicide, an oxidative stress inductor, in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants. The choice to use this species as a physiological model for this study was due its recognized economical importance for our country, in special to the State of Sao Paulo. Paraquat (PQ) is a contact herbicide that acts specifically on Photosystem II by blocking the normal electron flux and the reduction reaction of NADPH, the electron acceptor molecule. As consequence, there is formation of instable radicals and highly reactive oxygen species (ROS), which cause damage to membranes, proteins and nucleic acids. The central hypothesis was that ascorbate peroxidase activity is more sensitive to PQ than the activity of superoxide dismutase in the same conditions. The main experiment consisted on the sprayed of different concentrations of PQ (0, 2, 4, 6 e 8 mM of Metil Viologen) that stayed in leaf contact for 24 and 46 hours. After 18 hours, it was observed visible symptoms of toxicity and the photosynthetic activity decreased, measured by chlorophyll *a* fluorescence. Also, the level of lipids peroxidation measured by the increase concentration of TBARS formation, indicate damage to cell membrane caused by the generation of ROS. An important result was the increase of SOD specific activity (superoxide dismutase) first enzyme related to defense against ROS. This gradation increase was correspondent to the exhibition period to PQ. The most evident SOD isoform by native PAGE was the SOD Cu/Zn. This isoform is located preferentially in chloroplasts, organelle target to the action of PQ. It is important to remark that even in almost lethal concentrations of PQ the chloroplast SOD activity still remains expressed being responsible for the removal of H_2O_2 generated by SOD, which was reduced abruptly after 4 mM treatment. Although, it has been observed increase with the initial dose (2 mM). This fact suggests that the oxidative damages in sugarcane treated with PQ can be caused by excess of H_2O_2 . Differently of SOD, this enzyme is considered to be fragile to certain kinds of environmental adversities, losing its activity. Also the protein expression was analyzed by SDS-PAGE and 2-D electrophoresis. In both analyses, it was observed decrease of some protein expression caused by PQ. However, it was not possible to clearly detect peptides induction in this case, probably due to the elevated level of degradation of cell structures. The increase of chloroplast SOD activity in sugarcane leaves treated with PQ should be detailed investigated since it can be a molecular target for breeding programs with the goal to obtain plants with an acquired resistance to PQ or others herbicides with model action in the photochemical system.

Keywords: Sugarcane; Oxidative stress; Paraquat; Photosynthesis

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Esquema ilustrativo da cadeia de elétrons entre os Fotossistemas II e I, no cloroplasto e o local de ação do herbicida Paraquat	19
Figura 2 – Vista parcial do stand experimental, montado em casa-de-vegetação, com as mudas de cana-de-açúcar aos 30 dias após plantio	29
Figura 3 – Esquema da sequência de extração de proteínas totais de folhas de plântulas de cana-de-açúcar para corrida eletroforética uni e bidimensional sob condições desnaturantes	37
Figura 4 – A-Medidas da fluorescência basal (Fo) e máxima (Fm) da clorofila e B-eficiência quântica potencial do PSII.....	39
Figura 5 – Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR)	41
Figura 6 – Eficiência quântica efetiva do FSII (ϕ PSII).....	43
Figura 7 – A- Excesso relativo de energia no aparato fotoquímico (EXC) e B-coeficiente de extinção não fotoquímica (<i>quenching</i>) de energia (qN)	44
Figura 8 – Relação entre o coeficiente de extinção não fotoquímica da fluorescência (qN) e o aumento do excesso relativo de energia (EXC)	46
Figura 9 –Aspecto visual de folhas de cana-de-açúcar condição controle e tratadas com 4mM de Metil Violageno durante um período de 24 horas	48
Figura 10 –Determinação da concentração de espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	49
Figura 11 – Determinações do conteúdo de clorofilas totais (A), clorofila a (B), clorofila b (C) e razão clorofila a/b (D)	51
Figura 12 – Concentração de proteínas, fração solúvel (A) e fração insolúvel (B)	53
Figura 13 – Eletroforese desnaturante em mini-gel de poliacrilamida 12,5 % da fração de proteínas solúveis (A e C) e insolúveis (B e D) de folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 24 horas (A e B) e 48 horas (C e D) de aplicação.....	54
Figura 14 – Atividade da enzima Superóxido Dismutase em folhas de plantas de cana-	

de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 24 horas e 48 horas de aplicação.....	56
Figura 15 – Revelação diferencial da atividade em gel nativo 12,5% da enzima Superóxido Dismutase folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 24 horas de aplicação.....	57
Figura 16 –Atividade em gel nativo 12,5% da enzima Superóxido Dismutase folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 24 horas e 48 horas de aplicação.....	58
Figura 17 – Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase em folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 24 horas e 48 horas de aplicação.....	60
Figura 18 – Eletroforese bidimensional de folhas de cana-de-açúcar, condição controle e condição tratada com 4mM Metil Violágeno após período de 24 horas de aplicação	62
Figura 19 –: Imagem do programa ImageMaster 2-D Platinum, software para análise das imagens obtidas por meio do escaneamento dos géis. Os pontos vermelhos representam os spots detectados pelo programa em cada gel.....	62
Figura 20 – Imagem do programa ImageMaster 2-D Platinum, mostrando uma identificação numérica para cada spot dos respectivos tratamentos	63
Figura 21 – Imagem do programa ImageMaster 2-D Platinum. Os pontos vermelhos representam os spots presentes somente em um gel e os verdes são aqueles spots comuns aos dois géis, ou seja, que foram relacionados por meio do ‘ <i>match</i> ’, uma ferramenta de sobreposição de géis pelo programa..	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação dos <i>spots</i> do gel 2-D da amostra não-tratado (Controle), identificados pelo programa ImageMaster 2-D Platinum, conforme mostrado na figura 20, mostrando seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MW), intensidade percentual normalizada (%Intens) e volume percentual normalizado (%Vol)	82
Tabela 2- Relação dos <i>spots</i> do gel 2-D da amostra tratada com PQ 4mM, identificados pelo programa ImageMaster 2-D Platinum, conforme mostrado na figura 20, mostrando seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MW), intensidade percentual normalizada (%Intens) e volume percentual normalizado (%Vol)	83

LISTA DE ABREVIATURAS

APX	Ascorbato Peroxidase
ATP	Adenosina 5-trifosfato
CAT	Catalase
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propane sulfonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EST	Expressed sequence tag
ETR	Taxa aparente de transporte de elétrons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
EXC	Excesso relativo de elétrons
Fm	Fluorescência máxima após adaptação ao escuro (unid. rel.)
Fm'	Fluorescência máxima na presença de luz (unid. rel.)
Fo	Fluorescência basal após adaptação ao escuro (unid. rel.)
Fo'	Fluorescência basal após excitação do fotossistema I (unid. rel.)
Fv	Fluorescência variável após adaptação ao escuro (unid. rel.)
Fv/Fm	Eficiência quântica potencial do fotossistema II
MF	Matéria fresca
NADPH	Dinucleotídeo adenina fosfato nicotinamida (reduzido)
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
PQ	Paraquat
PSI/ PSII	Fotossistema I /II
Q _A	Quinona A
qN	Coeficiente de extinção não-fotoquímica da fluorescência
qP	Coeficiente de extinção fotoquímica da fluorescência
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	2-thiobarbituric acid
TCA	Trichloroacetic acid
Tris	Tris-hidróxiaminometano
ΦPSII	Eficiência quântica efetiva do fotossistema II

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), além da significativa importância socioeconômica para o sistema agroindustrial do Estado de São Paulo e do Brasil, tem adquirido considerável destaque no âmbito científico e tecnológico com os resultados do seqüenciamento de EST's e da categorização de milhares de genes (Projeto SUCEST/FAPESP), cujas funções já estão em estudo. Além de estudos de genômica funcional, a identificação de proteínas e suas propriedades, ou seja, a análise proteômica, é um fator importante para a obtenção de variedades e híbridos com características agronômicas mais favoráveis.

O uso de herbicidas em culturas comercialmente importantes como a cana-de-açúcar, é uma prática bastante comum para minimizar perdas de safra por infestação de ervas daninhas. Entretanto, o uso inadvertido ou excessivo de tais agroquímicos pode causar danos irreparáveis na cultura em questão. Dentre os compostos atualmente mais usados para este fim na cultura da cana-de-açúcar, podemos citar: Velpar-K[®], Ametryn[®] e o Paraquat ou Gramoxone[®] (SINDAG, 2001). Este último em menor escala devido sua alta toxicidade para saúde humana e seu rápido poder destruidor em plantas, sendo também bastante difundido como um agente dessecante, facilitando a colheita.

Um dos danos causados por determinados fatores de estresse, tanto de natureza biótica ou abiótica, é a produção de radicais livres, essencialmente, as espécies reativas de oxigênio (EROS). Estes radicais são responsáveis por danos, muitas vezes irreversíveis, em componentes celulares, caracterizando o chamado estresse oxidativo. O Paraquat, por exemplo, provoca a geração de AOS no cloroplasto e ocasiona danos estruturais em DNA, proteínas, lipídios e pigmentos (BENAVIDES et al., 2000; EKMEKCI ; TERZIOGLU, 2005). As plantas dispõem de diferentes estratégias de proteção contra os danos celulares e a possível morte causada pelo excesso de radicais livres.

O sistema de defesa antioxidativo enzimático das plantas inclui diversas enzimas antioxidantes nos diferentes compartimentos celulares. Dentre as principais enzimas podemos citar as dismutases de superóxido e as peroxidases de ascorbato, que atuam conjuntamente removendo radicais superóxidos e peróxidos, respectivamente. Além de um aparato enzimático, a alteração e/ou regulação de vias biossintéticas de proteínas constitui outra importante estratégia de defesa.

Nas plantas, o Paraquat atua rapidamente, por contato, causando forte toxicidade após algumas horas de aplicação. Esse herbicida, pertencente ao grupo químico dos bipyridílios, que age como inibidores do fotossistema I. O mecanismo de ação dá-se por meio do bloqueio do fluxo de elétrons da fotossíntese, impedindo a redução do NADP^+ à NADPH_2 . Dessa forma, ocorre um acúmulo de elétrons e de radicais tóxicos no cloroplasto, causando sérios danos no metabolismo celular. Esses radicais são instáveis e rapidamente sofrem auto-oxidação, onde são produzidos radicais superóxidos, hidroxila, peróxido e oxigênio singlete. Estes, por sua vez, são altamente reativos com os lipídeos das membranas celulares, promovendo sua peroxidação. Com a degradação das membranas, há um vazamento do suco celular e a morte do tecido (VARGAS et al., 1999). Portanto, a expressão induzida de proteínas envolvidas com a desintoxicação desses radicais e de outros derivados parece ser uma estratégia importante na atenuação dos efeitos deletérios de tais produtos.

Atualmente, grande parte das pesquisas com plantas tem dedicado esforços à procura e ao desenvolvimento de novas variedades resistentes a estresses ambientais, quer seja de natureza biótica ou abiótica. No entanto, a habilidade de sobreviver em tais condições de estresse requer múltiplas adaptações das plantas. Tais adaptações evolucionárias envolvem um grupo complexo de parâmetros, que ainda não foram totalmente descobertos. É nesse ponto onde se ressalta a importância de estudos que focalizem nas respostas fisiológicas, metabólicas e moleculares das plantas às diferentes formas de estresse. Com o avanço das técnicas bioquímicas e moleculares nas últimas décadas estes estudos se intensificaram, fornecendo maiores informações sobre a fisiologia dos cultivares utilizados e auxiliando programas de melhoramento genético de diversas espécies agrícolas.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo analisar possíveis alterações no metabolismo fotossintético, bem como a expressão de enzimas relacionadas com a defesa oxidativa em plantas de cana-de-açúcar tratadas com o herbicida Paraquat.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) é uma planta pertencente ao gênero das gramíneas (*Poaceae*), juntamente com os gêneros *Zea* e *Sorghum*. Seis espécies de *Saccharum* são, atualmente, reconhecidas: *S. officinarum*, *S. sinensi*, *S. barberi*, *S. edule*, *S. spontaneum* e *S. robustum*. O centro de origem deste gênero é a região leste da Indonésia e Nova Guiné (DANIELS; ROACH, 1987). Hoje, disseminado em todo o mundo, este gênero foi introduzido no Brasil em 1553, e desde então estabeleceu-se nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste, principalmente.

Historicamente a cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, cultivada desde a época da colonização. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área plantada de 5,9 milhões de hectares. Na safra de 2004/05 foram produzidas cerca de 415,7 milhões de toneladas, e na safra 2005/06 a produção foi de 463,8 milhões de toneladas, o que representou um crescimento de 5,1% em relação à safra anterior. O Estado de São Paulo lidera a produção do país, onde foram produzidos 60,8% do total nacional. A produção de álcool foi de aproximadamente 17 bilhões de litros e o açúcar algo ao redor de 27 milhões de toneladas (CNA, 2006).

A partir da industrialização desta cultura obtém-se produtos como: o açúcar, nas suas mais variadas formas e tipos, o álcool (anidro e hidratado), o vinhoto e o bagaço. A cana-de-açúcar é, portanto, o principal tipo de biomassa energética, base para todo o agronegócio sucroalcooleiro, que, com as exportações de açúcar, colaboram com o equilíbrio da balança comercial. Além disso, o setor sucroalcooleiro, representado por 350 indústrias de açúcar e álcool no país, é responsável pela geração de aproximadamente 1.000.000 empregos diretos e indiretos (MAPA, 2006).

Os 10 principais produtores são responsáveis por 74% da produção mundial de açúcar, e o Brasil ocupa um papel de liderança, tanto na produção como na exportação de açúcar. Esse potencial competitivo do Brasil se deve a produtividade e rendimento industrial, pesquisas sobre novas variedades, utilização de novas técnicas agrícolas e solos férteis, condições que garantem ao país os menores custos de produção do mundo.

O interesse no uso do etanol como combustível tem-se revigorado ultimamente devido ao aumento dos preços do petróleo e a necessidade de redução de emissão de gases causadores do

efeito estufa. Principalmente após a ratificação do protocolo de Kyoto, vários países estão voluntariamente aderindo metas de redução de gases, entre os quais se destacam Inglaterra, Alemanha, Holanda, Japão. Daí a importância cada vez maior do álcool como combustível, e o Brasil ganha destaque nesse novo mercado já que as vantagens competitivas brasileiras do binômio cana/açúcar também se aplicam à cana/etanol.

Entretanto, um dos maiores problemas no cultivo da cana-de-açúcar é a interferência das plantas daninhas que infestam campos de plantio, competindo com a cultura por luz, nutrientes, água e espaço, provocando sérias perdas na produtividade (VICTORIA FILHO; CHRISTOFFOLETI, 2004). Além disso, a infestação de plantas daninhas provoca um decréscimo na longevidade do canavial, queda na qualidade industrial da matéria-prima e dificuldades na colheita e transporte da cana-de-açúcar (PROCÓPIO et al., 2003). Portanto, um manejo adequado de ervas indesejáveis nesta cultura é de fundamental importância para o setor agrícola, e este controle é realizado, principalmente, pelo uso de herbicidas. Dentre os defensivos agrícolas, os herbicidas correspondem a 56% do volume comercializado no Brasil, sendo a cana-de-açúcar a segunda cultura em consumo deste insumo no país, ficando atrás apenas da soja (PROCÓPIO et al., 2003)

Atualmente a cultura da cana-de-açúcar está alicerçada em variedades que são híbridos obtidos por um criterioso trabalho de seleção e melhoramento genético entre espécies conhecidas, obtendo características desejáveis conforme regiões e situações específicas. A escolha da variedade é considerada um fator de produção e desenvolvimento tecnológico de maior importância em uma usina sucroalcooleira (MATSUOKA, 2000). No presente trabalho adotou-se como modelo experimental a variedade SP 80-3280, desenvolvida pelo Centro de Tecnologia Canavieira (Piracicaba-SP) e amplamente comercializada como sendo uma variedade robusta, produtiva e tolerante às condições adversas de solo e clima. Também, esta variedade foi a escolhida para realização do projeto SUCEST, que disponibilizou 290 mil sequências de DNA desta espécie (VETTORE et al., 2001)

2.2 Ação do Paraquat em plantas

O Paraquat, cujo princípio ativo é o metil violágeno, é um dos herbicidas mais amplamente utilizados no mundo, aplicado no controle de ervas daninhas anuais e perenes em uma grande variedade de culturas, incluindo cereais, oleaginosas, frutas e hortaliças (SCHIMIDT

et al., 1994). É considerado não-seletivo e de amplo espectro, o que significa que ele mata uma ampla gama de gramíneas anuais e ervas daninhas de folhas largas. É importante ressaltar que o Paraquat, pertencente à família dos herbicidas “Bipyridylum”, age muito rapidamente, atingindo diretamente o sistema fotossintético da planta (EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005)

O Paraquat é considerado o herbicida mais tóxico à saúde humana nos últimos 60 anos, e, paradoxalmente, é o terceiro mais usado no mundo. É usado rotineiramente em mais de 50 culturas em 120 países (CHEE et al., 1993). Tal fato pode ser atribuído ao seu custo menor quando comparado com formulações mais modernas e mais seletivas de outros herbicidas. Por razões de envenenamento, o uso deste herbicida foi proibido em 13 países, e o último país não mais usá-lo foi a Malásia em 2002.

No Brasil, dentre os compostos atualmente mais usados para o controle de ervas daninhas na cultura da cana-de-açúcar estão os comerciais Velpar-K[®], Ametryn[®] e Paraquat ou Gramoxone[®] (SMITH, 1997; SINDAG, 2001), sendo este último bastante difundido, também, como um agente dessecante, promovendo ressecamento e abscisão de folhas, facilitando a colheita (AGOSTINETTO et al., 2001; MAGALHÃES et al., 2002).

O mecanismo de ação deste herbicida dá-se por meio do bloqueio do fluxo de elétrons na cadeia transportadora da fotossíntese, impedindo a redução do NADP^+ à NADPH_2 no fotossistema I (Figura 1). Dessa forma, ocorre um acúmulo de elétrons e de radicais tóxicos no cloroplasto, causando sérios danos no metabolismo celular. Esses radicais são instáveis e rapidamente sofrem auto-oxidação, onde são produzidos radicais superóxidos, hidroxila, peróxido e oxigênio singlete, os quais constituem as espécies reativas de oxigênio, que, quando em excesso, são prejudiciais ao metabolismo celular como um todo.

Figura 1- Esquema ilustrativo da cadeia de elétrons entre os Fotossistemas II e I, no cloroplasto e o local de ação do herbicida Paraquat (www. molecadv.com)

2.3 A fluorescência da clorofila *a*

Como já é sabido, a captura e armazenamento de energia luminosa pelas folhas de plantas superiores é mediada por uma intrincada associação entre complexos de pigmentos captores de luz e um transporte sequencial de elétrons do fotossistema II (PSII) para o fotossistema I (PSI) (Figura 1). A eficiência da utilização da luz por cada fotossistema regula as reações de fixação de CO_2 e geração de ATP pelas reações luminosas.

A energia luminosa absorvida no PSII excita as moléculas de clorofilas ali presentes, que passam para um estado instável e rapidamente liberam parte de sua energia ao meio como calor, sem a emissão de fóton. Entretanto, a clorofila excitada pode também perder energia por fluorescência, reemitindo fótons e, assim, retornando ao estado basal. Outra parte da energia pode ser utilizada pelas reações fotoquímicas ou ainda ser transferida fracamente para o PSI, pelo contato entre moléculas de clorofilas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A emissão de fluorescência fornece informações sobre os processos fotoquímicos do PSII. Sob condição de baixa luz, ao redor de 95% dos fótons absorvidos são usados na fotoquímica, 4,5% são transformados em calor e 0,5% são re-emitidos como luz fluorescente. Se todos os centros de reação do PSII estiverem fechados por um bloqueio da fotossíntese, 95-97% da energia pode ser dissipada como calor e 2,5-5,0% via fluorescência (BOLHÀR-NORDENKAMPF; OQUIST, 1993).

A relação inversa entre fluorescência e atividade fotossintética foi primeiramente observada e descrita por Kautsky e pode ser usada para estudar a atividade fotossintética potencial das folhas e para detectar os efeitos de estresses em plantas. Um sinal típico de indução da fluorescência em luz contínua é conhecido como "Efeito Kautsky", onde após um pico ou um máximo de fluorescência, acontece uma atenuação (o denominado "quenching"). Normalmente a extensão do "quenching" é expressa por coeficientes que variam de 0 a 1, indicando a proporção atenuada da fluorescência máxima (KRAUSE ; WEIS, 1991). A fluorescência basal ou mínima (**F_o**) é a fluorescência medida quando todos os centros de reação estão abertos. A fluorescência máxima (**F_m**) é a fluorescência quando todos os centros de reação estão fechados. A fluorescência variável (**F_v**) é determinada pelo estado do centro de reação (aberto ou fechado), e é definida como a diferença entre **F_m** e **F_o**, ou seja, **F_v = F_m - F_o**. O estado dos centros de reação é influenciado por fatores ambientais de origem biótica e abiótica.

A medida da fluorescência das clorofilas do PSII, entretanto, é muito variável pois é extremamente influenciada pelo estado fisiológico do vegetal, podendo, assim, ser utilizada como técnica para monitoramento de coberturas vegetais ou para prever a fixação fotossintética de CO₂ (RODRIGUES, 1998). A capacidade fotossintética, entretanto, diminui em proporção ao tamanho e severidade do dano sofrido pela planta. Dependendo do tipo de dano, pode haver recuperação da capacidade fotossintética em poucas horas ou dias ou mesmo a morte do tecido.

Em plantas sob condições de estresse, a menor eficiência fotossintética pode ser causada pela: 1) menor dissipação de energia através do transporte de elétrons, ocasionando um declínio na eficiência quântica potencial do PSII, indicada pelo menor **F_v/F_m**, e taxa de transporte de elétrons (**ETR**), sendo usualmente associados ao aumento na extinção não-fotoquímica da fluorescência (**q_N**) e no "pool" de zeaxantina (HAVAUX; NIYOGI, 1999); 2) início dos processos de fotoinibição quando a capacidade de fotoproteção é excedida, sendo indicado pelo declínio na relação **F_v/F_m**, acompanhado pelo aumento de **F_o**, devido à redução excessiva da cadeia de transporte de elétrons (OSMOND, 1994).

Em situações como descrito acima, a taxa de geração de oxigênio tóxico excedem a capacidade dos mecanismos de desintoxicação do PSI (ASADA, 1994). Parte dos elétrons envolvidos nos processos fotoquímicos são utilizados em outros processos que não a fixação de carbono. Em condições onde a fixação de carbono é limitada (ex.: baixa temperatura e fechamento estomático), drenos alternativos de elétrons, como a fotorrespiração, excetuando-se plantas com

metabolismo C4, e a redução de oxigênio molecular (durante a reação de Mehler) podem aumentar suas atividades (FRACHEBOUD, 2001).

Segundo Krause e Weis (1991), a presença de condições ambientais estressantes levam ao decréscimo característico na eficiência quântica potencial do PSII, podendo ser detectada pela queda na relação F_v/F_m , conforme já mencionado. Paralela à queda da fotossíntese devido à menor eficiência fotoquímica, pode ocorrer redução na atividade de algumas enzimas do ciclo de Calvin e mudanças nas rotas bioquímicas, como acúmulo de aminoácidos e ácidos orgânicos (WRIGHT et al., 1995).

Contudo, as plantas possuem um sistema de defesa antioxidativo composto de várias enzimas e biomoléculas (ex: ácido ascórbico, α - tocoferol e carotenóides) responsável pela remoção de radicais tóxicos acumulados devido alterações metabólicas, inclusive danos no aparato fotossintético (FOYER et al., 1994).

2.4 O estresse oxidativo em plantas

As plantas, dada sua característica de seres sésseis, estão expostas a uma grande variedade de estresses ambientais que alteram seu metabolismo e desenvolvimento, exibindo uma grande variedade de respostas nos níveis molecular e celular (FLOWERS et al., 2000; ZHU, 2002). Algumas dessas respostas são desencadeadas por sinais de estresse ambiental primário, enquanto que outras podem resultar de estresses secundários ou de sinais secundários. Entre os fatores de estresse abióticos mais estudados estão: seca, alta salinidade, temperaturas extremas (tanto altas como baixas), metais pesados, radiação ultra-violeta, privação de nutrientes, alta luminosidade, defensivos químicos e hipóxia.

Ainda que algumas mudanças sejam claramente adaptativas, outras são simplesmente consequências da injúria causada pelo estresse (XIONG et al., 2002; ZHU, 2002). As respostas ao estresse podem ser consideradas como desvios da norma metabólica, onde a norma é um estado metabólico expresso sob a condição não estressante. Nem todas as alterações metabólicas são prejudiciais, e um grande desafio para o bioquímico é distinguir entre as repostas que representam sintomas acidentais ou injuriosos da condição estressante, e as repostas que são verdadeiramente adaptativas, que favorecem o crescimento contínuo durante o estresse ou na recuperação.

Uma alteração metabólica importante para as plantas quando em condições de estresse, é o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (APEL ; HIRT, 2004; FOYER ;

NOCTOR, 2005). A geração de espécies reativas de oxigênio constitui uma resposta primária da planta ao estresse de natureza biótica e abiótica, caracterizando um dano oxidativo (CHANDRU et al., 2003; ASADA, 2006). Entretanto, algumas das reações de produção de EROs estão envolvidas no metabolismo normal do vegetal, como fotossíntese e respiração (NOCTOR ; FOYER, 1998; MITTLER, 2002; VRANOVÁ et al., 2002).

Contudo, enquanto que em condições normais de crescimento, essas espécies químicas mantêm-se em pequeno nível, em condições estressantes há um rompimento da homeostase celular, provocando o aumento na produção de EROs. Embora esse aumento seja uma ameaça à célula, essas espécies podem também agir como sinalizadores para a ativação da resposta ao estresse e vias de defesa do vegetal (MITTLER, 2002; NEILL et al., 2002). Portanto, as EROs podem ser vistas como indicadores celulares de estresse e como mensageiros secundários envolvidos na via de transdução de sinais na resposta ao estresse (MITTLER, 2002).

Dentre alguns dos fatores ambientais que podem gerar a produção de EROs e, consequentemente, um estresse oxidativo nas plantas estão: as radiações ultra-violetas, seca, encharcamento, salinidade, temperaturas extremas, alta luminosidade, metais pesados e defensivos agrícolas, como herbicidas (BOWLER et al., 1994; AZEVEDO et al., 1998). Além disso, dano físico e mecânico, bem como o estresse biótico por ataque de patógenos podem ser fatores geradores de EROs (LAMB ; DIXON, 1997).

As principais formas de EROs são: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e oxigênio *singlet* (1O_2). Os radicais superóxido e peróxido, em geral, não são tóxicos, porém, quando em excesso e na presença de metais de transição, são convertidos em radicais hidroxilas altamente danosos via Reação de Fenton (CHANDRU et al., 2003), conforme será descrito posteriormente.

O oxigênio molecular (O_2) é pouco reativo, mas tem capacidade de originar estados intermediários excitados e altamente reativos durante sua redução até H_2O (SCANDALIOS, 1993). Estas espécies reativas, quando incompletamente reduzidas podem causar danos a organelas celulares, provocar a oxidação de moléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, acarretando redução no crescimento, colapso no metabolismo celular e desencadear o processo de morte celular programada (CAVALCANTI, 2002; MITTLER, 2002; NEILL et al., 2002). Além de ocasionar mutações no DNA celular (EPE, 1991)

As etapas subseqüentes de redução de um elétron não são dependentes de energia e podem ocorrer espontaneamente ou necessitam de doadores apropriados de e^-/H^+ (elétrons/ prótons). Na célula, íons metálicos de transição (Fe^{2+} , Cu^+) e semiquinonas podem agir como doadores de e^- (BLOKHINA et al., 2003). A aceitação do excesso de energia pela molécula de O_2 pode levar adicionalmente a formação do oxigênio *singlet* (1O_2), uma molécula altamente reativa se comparado ao O_2 (VRANOVÁ et al., 2002; OP DEN CAMP et al., 2003). O 1O_2 pode durar até aproximadamente 4-6 μs na água e 100 μs em ambientes não-polares. O oxigênio singlet pode então transferir sua energia de excitação para outras moléculas biológicas ou reagir com elas, formando então endoperóxidos ou hidroperóxidos.

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é um radical livre moderadamente reativo, com uma meia-vida de aproximadamente 2-4 μs . No entanto, o superóxido não pode atravessar as membranas biológicas e é prontamente dismutado a H_2O_2 . Caso essa tal reação não aconteça, o radical superóxido pode reduzir quinonas e complexos metálicos de transição de Fe^{3+} e Cu^{2+} , afetando, portanto a atividade de metalo enzimas. Os radicais hidroperoxilas ($HO_2^{\bullet}$) que são formados a partir do $O_2^{\bullet-}$ por protonação em soluções aquosas pode atravessar as membranas biológicas e subtrair átomos de hidrogênio de ácidos graxos polinsaturados e hidroperóxidos de lipídeos, começando então, a auto-oxidação de lipídeos (NEILL et al., 2002).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é moderadamente reativo, possui uma relativa longa vida celular e pode atravessar distâncias consideráveis de seu local de produção (VRANOVÁ et al., 2002). O H_2O_2 tem capacidade de difundir-se livremente através das aquaporinas (HENZLER ; STEUDLE, 2000). Dessa forma, as EROs produzidas nos cloroplastos e nas mitocôndrias, por exemplo, podem afetar outros compartimentos celulares. Tais características fazem deste radical também um importante sinalizador intracelular, tendo um papel central em várias vias de sinalização (como por exemplo, a da Resposta Hipersensitiva), que levam, principalmente, a tolerância cruzada (FOYER ; NOCTOR, 2003). Entre os processos induzidos pelo peróxido de hidrogênio estão: formação de ligações transversas na parede celular, fechamento estomático, expressão de genes relacionados a uma grande variedade de respostas ambientais, biogênese de peroxissomos, etc. Além disso, o H_2O_2 pode também inativar enzimas, como as superóxidos dismutases (Cu/Zn e Fe SODs) e diversas enzimas do ciclo de Calvin (BOWLER et al., 1994), induzir enzimas como as catalases e peroxidases, provocar danos aos ácidos nucléicos e proteínas e realizar a peroxidação de lipídeos (NEILL et al., 2002).

A mais reativa das EROs é o radical hidroxila que formado a partir do H_2O_2 pelas chamadas reações de Haber-Weiss ou de Fenton, pela utilização de catalisadores metálicos como o Fe^{2+} (HALLIWELL ; GUTTERRIDGE, 1989; CHANDRU et al., 2003). O radical $\text{OH}^\bullet$ pode reagir potencialmente com todas as moléculas biológicas. Como as células não possuem mecanismos enzimáticos para eliminar essa espécie altamente reativa, a sua produção em excesso leva, por fim, a morte da célula (VAN BRESEUGEN et al., 2001; VRANOVÁ et al., 2002).

Apesar da possibilidade de utilização pelas plantas do nível de EROs para a monitoração de seu estado intracelular de estresse, este nível deve ser mantido sob um fino controle por causa dos efeitos devastadores de um acúmulo dessas espécies (ASADA, 1999; DAT et al., 2000; MOLLER, 2001; MITTLER, 2002). Para que isto seja evitado as plantas possuem sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos muito eficientes, que permitem a eliminação dessas espécies ativas e a proteção contra os danos oxidativos. A partição entre estes dois sistemas sob condições de estresse pode ser regulada pela concentração de O_2 no sistema (BLOKHINA et al., 2003).

A distinta localização subcelular e propriedades bioquímicas das enzimas antioxidantes, seus diferentes padrões de indução no nível de enzima e expressão gênica, e a grande quantidade de eliminadores não-enzimáticos tornam o sistema antioxidante uma unidade muito flexível e versátil que pode controlar o acúmulo e a detoxificação temporal e espacial das EROs (VRANOVÁ et al., 2002; DEL RIO et al., 2002). Segundo Henriques et al. (2001), a célula apresenta algumas maneiras de proteção contra os efeitos deletérios das EROs: a prevenção, evitando a formação de radicais livres; a interceptação, por meio da ação neutralizadora de enzimas antioxidantes, ou por moléculas de baixa massa molecular, como vitaminas C e E, carotenóides, etc; e reparo, que minimizam os efeitos. Antioxidantes como o ácido ascórbico (AsA, vitamina C), glutathiona (GSH), α - tocoferol e carotenóides ocorrem em altas concentrações nas plantas (INZÉ ; MONTAGU, 1995; SLESACK et al., 2002).

2.5 Algumas enzimas antioxidantes

O sistema de defesa antioxidativo enzimático das plantas inclui diversas enzimas antioxidantes nos diferentes compartimentos celulares. Dentre as principais enzimas podemos citar as dismutases de superóxido (SOD; EC 1.15.1.1), as peroxidases de ascorbato (APX; EC 1.11.1.1) e as catalases (CAT; 1.11.1.6) que juntamente com outras enzimas do ciclo ascorbato-

glutationa promovem a eliminação das EROs (HERNÁNDEZ et al., 2001; CAVALCANTI et al., 2004). O grau do estresse oxidativo em uma célula é determinado pela quantidade de superóxido, H_2O_2 e radicais hidroxilas. Portanto, o balanço das atividades da SOD, APX e CAT é crucial na supressão dos níveis tóxicos de EROs na célula (APEL ; HIRT, 2004). Nos últimos anos, um grande número de estudos tem focalizado no balanço dessas atividades, nas diferentes organelas celulares

2.5.1 Superóxido Dismutase

Segundo Alscher e colaboradores. (2002), dentro da célula, as SODs constituem a primeira linha de defesa contra EROs. Estas proteínas pertencem ao grupo de metalo-enzimas que protegem as células dos radicais superóxidos, catalisando a dismutação do $O_2 \bullet^-$ em O_2 e H_2O_2 (WU et al., 1999; VAN BREUSEGEM et al., 2001). O radical $O_2 \bullet^-$ é produzido em qualquer localização intracelular onde exista um transporte de elétrons, e, portanto, a ativação do O_2 pode ocorrer em diferentes compartimentos celulares (ELSTNER, 1991), incluindo mitocôndria, cloroplastos, microsossomos, glioxissomos, peroxissomos, apoplasto e no citosol. Portanto, não é surpresa o fato das SODs estarem presentes em praticamente todas as regiões da célula. Além disso, foi provado que as membranas biológicas são impermeáveis a moléculas de $O_2 \bullet^-$ carregadas, daí a importância da presença destas dismutases onde há a sua presença. As SODs são classificadas, de acordo com o seu metal cofator, em três grupos: FeSOD, presente nos cloroplastos; MnSOD, presentes nas mitocôndrias e peroxissomas; e as Cu/Zn-SODs, presentes nos cloroplastos, peroxissomos, no citosol e possivelmente no espaço extracelular (ALSCHER et al., 2002; CAVALCANTI, 2002). Recentemente foi publicado a presença da isoforma FeSOD em cloroplastos de milho (IANELLI et al., 1999). O número e o tipo de isoformas de SOD é variável entre as espécies vegetais, bem como a abundância relativa de cada isoforma. (ASADA, 1999)

2.5.2 Ascorbato Peroxidase

As APXs são consideradas as enzimas mais importantes na eliminação de H_2O_2 no citosol e nos cloroplastos (INZÉ ; MONTAGU, 1995). Esta enzima utiliza o ascorbato como seu doador de elétrons específicos para reduzir H_2O_2 a água, constituindo parte do ciclo conhecido como ciclo da ascorbato-glutationa ou ciclo Halliwell-Asada (INZÉ ; MONTAGU, 1995; SHIGEOKA et al., 2002). De acordo com del Rio et al., (1998) e Polle (2001), este ciclo é uma via eficiente de

células de planta que dispõem de H_2O_2 em determinados compartimentos onde este metabólito é produzido e não existe catalase presente, como por exemplo, no cloroplasto (MITTLER, 2002). Este ciclo faz uso dos antioxidantes não enzimáticos como o ascorbato e a glutathione em uma série de reações catalisadas por quatro enzimas antioxidativas, e está bem demonstrado em cloroplastos, citosol e mitocôndrias de nódulos radiculares (FOYER; MULLINEAUX, 1994; POLLE, 2001), e em peroxissomos e mitocôndrias purificadas de folhas de ervilha (JIMÉNEZ et al., 1997). As isoenzimas de APX são distribuídas em pelo menos quatro compartimentos celulares distintos: no estroma e ligadas à membrana dos tilacóides dos cloroplastos; ligada à membrana (mAPX) nos microcorpos, incluindo glioxissomos e peroxissomos; e no citosol (cAPX) (SHIGEOKA et al., 2002). Há ainda uma isoforma de APX ligada a membrana mitocondrial (mitAPX) (LEONARDIS et al., 2000). Todas estas isoenzimas têm uma alta especificidade pelo ascorbato como doador de elétrons.

2.6 Proteínas induzidas sob condições de estresse

Conforme já mencionado anteriormente, uma alteração metabólica importante em plantas sob estresses é a produção de espécies ativas de oxigênio, que podem atuar como sinalizadores e interagir com outras moléculas desencadeando uma resposta contra o agente estressor. A ativação de cascatas de expressão gênica, bem como a síntese de novas proteínas, efetoras dessa resposta, constituem importantes alterações bioquímicas provocadas por um estresse

Um grande interesse vem sendo gerado na resposta das plantas ao estresse abiótico, principalmente devido às possíveis aplicações em programas de melhoramento genético de espécies cultivadas. Plantas transgênicas tolerantes aos mais variados estresses abióticos vêm sendo produzidas ultimamente (WANG et al., 2003). Esse sucesso vem sendo obtido pelo aumento nos níveis celulares de proteínas que controlam as quantidades de osmólitos, com funções de transporte (H^+ ATPases e H^+ /PPi ases) ou ativação de genes (fatores de transcrição ou componentes de sinalização) (ZHU, 2001).

O corrente entendimento das respostas das plantas ao estresse parece ser ainda incompleto dado o grande número de genes/proteínas envolvidas na percepção do estresse, transdução do sinal e síntese de moléculas efetoras que catalisam reações para adaptação a regimes de estresse tanto em termos de prevenção ou reparo de danos. Isso é extremamente importante, portanto, para

a obtenção de informações futuras a respeito da mudança na expressão gênica responsável a estresses.

A síntese de diversas proteínas localizadas tanto em diferentes órgãos da planta como em diferentes locais na célula (ex: citosol, frações de membrana, cloroplastos ou espaços intercelulares) pode ser induzida ou reprimida por estresse ambiental, seja de natureza biótica ou abiótica. Na maioria dos casos, a função desses polipeptídios é ainda desconhecida. (YEN et al., 1994; CHEN ; PLANT, 1999; PRZYMUSINKI et al., 2004).

Análises genômicas em plantas tolerantes revelaram a existência de possíveis efetores que diretamente modulam a percepção e resposta do estresse ou atenuam os seus efeitos, ou a moléculas que estão envolvidas na percepção do estresse, transdução de sinal ou modulação da função do efector (ZHU, 2001; CHINNUSAMY et al., 2004). Como exemplos desses efetores da tolerância ao estresse estão enzimas-chave relacionadas com homeostase osmótica e remoção de espécies ativas de oxigênio (MAESTRI et al., 2002).

Apesar da lacuna existente a respeito da falta de informação no funcionamento da maioria dos genes/proteínas de estresse, pesquisas empregando proteínas de função conhecida (choline oxidase, P5CS - Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, BADH - betaine-aldehyde dehydrogenase, etc) bem como aquelas com função pouco conhecidas (LEA - late embryogenesis abundant, HSPs-heat shock proteins, osmotin-like etc) têm fornecido uma contribuição importante no planejamento de estratégias para melhorar a tolerância ao estresse por meio da tecnologia dos transgênicos. (GROVER et al., 1999). Este fato justifica a necessidade constante de identificação, isolamento e caracterização de um número crescente de proteínas induzidas por estresse ambiental.

Os trabalhos recentes sobre a importância desses genes/proteínas na concessão da tolerância ao estresse estão embasados em dois princípios: (a) Proteínas de estresse são sintetizadas no momento em que ocorre uma repressão geral da maquinaria protéica biossintética constitutiva e (b) Existe um nível marcante de conservação na estrutura e outros aspectos de genes/proteínas de estresse. Conforme já discutido acima, o papel destes na tolerância ao estresse vem sendo experimentalmente verificado em instâncias seletivas nos últimos anos.

Visando a obtenção de informações esclarecedoras sobre os mecanismos de defesa antioxidantes em plantas, a busca por proteínas envolvidas nesse processo, bem como sua

identificação e função desempenhada, será de grande importância, juntamente com o estudo da expressão de genes candidatos, para a elucidação desses mecanismos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estratégia experimental e delineamento estatístico

O propósito deste trabalho foi observar alterações fisiológicas e no padrão das atividades de enzimas antioxidantes, bem como na expressão de proteínas, em folhas de plântulas de cana-de-açúcar, submetidas à diferentes concentrações de Praquat, cujo princípio ativo é o Metil Violágeno, e coletadas em tempos distintos. Para tanto, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em fatorial 5 x 3 (5 tratamentos x 3 repetições), sendo cada repetição, composta, em média, de 4 plântulas (4 vasos contendo 1 kg substrato cada). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

3.2 Material Vegetal

Mudas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), variedade SP 80-3280, provenientes de toletes com gemas meristemáticas, foram crescidas em substrato completo Plantamax®, da Eucatex, sob condições de casa-de-vegetação. Os toletes foram gentilmente cedidos pelo Centro de Tecnologia Canaveira (CTC), localizado em Piracicaba-SP.

3.3 Condução do experimento

Os toletes, recém-coletados, foram colocados para germinar individualmente, em vasos de 15 cm de diâmetro, durante 30 dias ou até a completa expansão do segundo par de folíolos. Durante esse período foi feito um monitoramento diário de temperatura e umidade do ar, as quais apresentaram valores médios de $29,1\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,8$ e $81,1\text{ \%} \pm 6,0$ respectivamente. No referido estágio de desenvolvimento (Figura 2) foi aplicado o herbicida Paraquat, via pulverização foliar. A aplicação foi feita com um pulverizador costal, pressurizado a CO_2 , com pressão de 30 lb/pol², com consumo de 200 L/ha de calda. Foram aplicadas diferentes concentrações (0, 2, 4, 6 e 8 mM) de Metil Violágeno.

Após períodos de 24 e 48 horas de contato, as folhas foram, respectivamente, coletadas, pesadas, congeladas em N₂ líquido já na forma de pó, e armazenadas em freezer -80°C para posteriores análises.

Figura 2- Vista parcial do stand experimental, montado em casa-de-vegetação, com as mudas de cana-de-açúcar aos 30 dias após plantio

3.4 Análise da fluorescência da clorofila *a*

As avaliações da fluorescência da clorofila *a* das plantas de cana-de-açúcar após 18 horas de tratamento com Paraquat foram realizadas em fluorômetro “Portable Chlorophyll Fluorometer” (PAM 2000, Hinz Walz, Alemanha) equipado com uma unidade de controle de disparo de pulsos saturantes. As análises foram feitas seguindo a metodologia descrita por Schreiber et al. (1986) e Genty et al. (1989), avaliando a emissão da fluorescência da clorofila *a* pela superfície superior das folhas. Os parâmetros foram obtidos em duas intensidades de PAR, média e alta, com intensidades médias de 100 e 325 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fótons, respectivamente. Os dados de todas as medidas e o monitoramento contínuo durante as análises foram analisados em planilhas e gráficos por meio do programa Excel® 2003, considerando-se os resultados da média de três leituras para cada parâmetro mensurado.

Antes do início das análises, as plantas foram mantidas no escuro por um período de 30 minutos para completa oxidação dos componentes do sistema de transporte de elétrons; a seguir, os seguintes parâmetros foram determinados: **Fo**, **Fm**, **qN**, **φ PSII**, **Fv/Fm**, **EXC** e **ETR**.

Os parâmetros foram obtidos da leitura direta e calculados de acordo com as seguintes fórmulas (BILGER et al., 1995; WALZ, 1993) :

$$Fv/Fm = (Fm - Fo) / Fm$$

$$\phi PSII = qP \times Fv' / Fm' = qP \times (Fm' - Fo') / Fm'$$

$$qP: Fm' - Fs / Fm' - Fo$$

$$qN: (Fm - Fm') / Fm'$$

$$ETR = \phi PSII \times 0,5 \times 0,84 \times PAR$$

$$EXC = (Fv/Fm - \Delta F / Fm') / Fv/Fm$$

em que :

Fo: fluorescência mínima obtida com todos os centros de reação do PSII abertos enquanto a membrana do tilacóide está no estado não energizado, isto é, adaptado ao escuro ($qP=1$ e $qN=0$);

Fm: fluorescência máxima obtida quando todos os centros de reação do PSII estão fechados (oxidados), isto é, no estado adaptado ao escuro ($qP=0$ e $qN=0$);

Fv = (**Fm**-**Fo**): fluorescência variável máxima obtida em folhas adaptadas ao escuro;

Fs: fluorescência no “steady-state” (equilíbrio) ($qP > 0$);

Fo': fluorescência mínima obtida em folhas após a iluminação actínica;

Fm': fluorescência máxima obtida em folhas adaptadas à luz;

Fv': fluorescência variável máxima obtida em folhas adaptadas à luz.

qP: "quenching" fotoquímico ou atenuação fotoquímica da fotossíntese;

qN: "quenching" não fotoquímico ou atenuação não-fotoquímica da fotossíntese;

φPSII : eficiência quântica efetiva do transporte de elétrons pelo PSII;

EXC : excesso relativo de elétrons na parte fotoquímica

3.5 Concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação de lipídios foi mensurada a partir da quantidade de malonaldeído (MDA) do extrato de folhas, através de reação específica deste, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), onde,

na reação, foi gerado um cromóforo de cor avermelhada. O método utilizado foi descrito inicialmente por Heath e Packer (1968) e adaptado por Peixoto (1998). Para a determinação, foi reservado 1 g de tecido fresco, macerados em almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido, adicionados 2 mL da solução de TCA a 1 % (p/v) e, em seguida, a mistura foi macerada continuamente por mais 2 minutos. A mistura foi, então, acondicionada em tubos tipo eppendorf de 2 mL e centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado.

Para o ensaio, os extratos foram diluídos, quando necessário, sendo alíquota de 500 μ L transferidas para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 2 mL de reagente contendo TBA 0,5 % (p/v) dissolvido em TCA 20 % (p/v). Os tubos foram hermeticamente fechados e a mistura de reação incubada em banho-maria a 95 °C, por 1 hora, sendo resfriada, em seguida, em banho de gelo. Quando necessário, as amostras foram centrifugadas a temperatura ambiente (25 °C) por 10 minutos a 9.000 x g, em centrífuga de bancada. As leituras foram realizadas a 25 °C nas absorvâncias de 532 e 660 nm, respectivamente (esta, relativo à reação não específica). A segunda leitura foi subtraída da primeira para obtenção da leitura específica e a quantidade do complexo MDA-TBA formado foi calculado através do coeficiente de extinção molar de 155 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (HEATH; PACKER, 1968). Os resultados foram expressos em $\text{nmol g}^{-1} \text{MF}$.

3.6 Conteúdo de Clorofilas

A extração do pigmento foi feita com Acetona 80%, considerando-se a seguinte proporção: 500 mg de tecido fresco para 5 mL de solução de Acetona 80%. Após centrifugação 5000 x g, por 10 min, o sobrenadante foi coletado e lido em espectrofotometro a 663 e 645nm, correspondente aos picos de absorção das clorofilas *a* e *b*, respectivamente. Para quantificar as clorofilas *a*, *b* e total, segundo Arnon (1949), foram feitos os seguintes cálculos: Clorofila *a* = $(12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) \times V/1000W$; Clorofila *b* = $(22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) \times V/1000W$; Clorofila total = $(20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}) \times V/1000W$. Sendo, A= absorvância dos extratos no comprimento de onda determinado; V= volume final do extrato clorofila-acetona e W= matéria fresca em gramas do material vegetal utilizado.

3.7 Extração e determinação das concentrações de proteínas solúveis e proteínas insolúveis totais

As folhas foram maceradas em almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, a uma quantidade de 1g de folhas, foi adicionado 2 mL de Acetona 80% e macerado por mais 5 minutos. Após centrifugação a 6000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado, adicionou-se 2,0 mL de tampão Tris 40 mM pH 7,8 contendo Manitol 350 mM, EDTA 2 mM e PVPP3 % (p/v), macerando por mais 5 minutos. O macerado foi transferido para Eppendorfs de 2mL e centrifugados a 10.000 g, por 20 minutos, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante, considerado a fração de proteínas solúveis totais, foi coletado e armazenado à temperatura de -20 °C, para determinações posteriores.

Para extração da fração de proteínas insolúveis totais, o precipitado retornou para o almofariz e foi novamente macerado com 2,0 mL de solução de Lise contendo Uréia 8M, Tiouréia 1M, CHAPS 2%, DTT 50mM, por um período de 5 minutos. O macerado retornou, então, para os tubos tipo eppendorfs de 2 mL que foram centrifugados a 10000 g por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante, considerado a fração de proteínas insolúveis totais, foi coletado e armazenado à temperatura de -20 °C, para determinações posteriores

A determinação do conteúdo de proteínas solúveis totais, na primeira fração protéica, foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). O método é baseado na mudança da coloração do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 quando ligado a proteínas. Os extratos congelados foram lentamente descongelados em banho de gelo (± 4 °C). As amostras foram diluídas no próprio tampão de extração, na proporção de 1:10 (v/v). Aliquotas de 100 μ L do extrato diluído foram transferidas para tubos de ensaio e 2 mL do reagente de Bradford (105,26 mg de Coomassie brilliant blue G-250 + 50 mL de etanol 95 % + 100 mL ác. fosfórico orto-xaroposo 85 % + q.s.p. H₂O p/ 1000 mL) foram adicionados ao meio de reação.

Após leve agitação, os tubos foram incubados a 25 °C por 15 minutos e então realizada leitura da reação a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas totais foi obtida pela comparação das leituras, com as obtidas em curva padrão onde a proteína utilizada foi a Albumina Sérica Bovina. A concentração de proteínas solúveis foi expressa em mg de proteína g⁻¹ MF.

3.8 Eletroforese desnaturante de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese das amostras foi realizada segundo metodologia desenvolvida por Laemmli (1970), com modificações. O método se sustenta na idéia de que as proteínas podem ser separadas

pela massa molecular, através da indução do deslocamento pela aplicação de um campo elétrico (LEHNINGER et al., 1995). A preparação do gel e a corrida eletroforética foram conduzidas no sistema MiniVE (Amersham Biosciences), com placas de 8 cm x 9 cm e espaçadores com 1,0 mm de espessura. O gel de aplicação foi preparado com 5,0 % de acrilamida (p/v) em tampão tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo SDS 0,1 % (p/v) e polimerizado com 0,15 % de persulfato de amônio (p/v) e TEMED 0,1 % (v/v). O gel de separação foi preparado com 12,5 % de acrilamida (p/v) em tampão tris-HCl 3,0 M, pH 8,8, contendo SDS 0,1 % (p/v), sendo polimerizado com persulfato de amônio 0,15 % (p/v) e TEMED 0,05 % (v/v).

A concentração de proteínas totais nos extratos foi determinada segundo o método de Bradford (1976), obedecendo aos mesmos procedimentos descritos no item de determinação da concentração de proteínas solúveis totais (item 3.7). O extrato total das amostras foi diluído no tampão de lise de modo que, ao final da diluição, todos os extratos tivessem a mesma razão mg de proteína mL⁻¹. As amostras foram preparadas para corrida adicionando azul de bromofenol a 0,4 % (p/v) em alíquota retirada da diluição do extrato bruto. A corrida foi realizada com amperagem constante de 20 mA para cada gel, e transcorreu por um período de aproximadamente 1 hora.

3.8.1 Revelação do gel com Nitrato de Prata e Coomassie blue

As bandas protéicas foram visualizadas pela revelação do gel com nitrato de prata, segundo metodologia descrita por Blum et al. (1987). O método tem por objetivo impregnar as proteínas localizadas na superfície do gel, com íons prata fornecidos pelo nitrato de prata. Depois da corrida, o gel foi retirado cuidadosamente da placa de vidro e mergulhado em solução de etanol 40 % (v/v) e ácido acético 10 % (v/v) para fixação da posição das proteínas no gel. Em seguida, foi lavado em solução de etanol a 30 % (v/v), por 2 ciclos de 20 minutos, e tratado com tiosulfato de sódio 0,02 % (p/v), por 1 minuto. O gel foi então enxaguado em H₂O deionizada, por 3 ciclos de 20 segundos, e impregnado com solução de nitrato de prata 0,2 % (p/v) e formaldeído 0,02 % (v/v), por 20 minutos. Após visualização das bandas, o gel foi lavado com H₂O deionizada, por 20 segundos, e a reação interrompida pelo tratamento do gel com solução de glicina a 0,5 % (p/v), durante 5 minutos, e mais 3 ciclos de 20 minutos de lavagem em H₂O deionizada.

A revelação dos géis também foi feita por meio de uma solução corante (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,025%, contendo Metanol 40% e Ácido Acético 7%). Após corrida eletroforética, os

géis foram imersos na solução de corante por, no mínimo, 2 horas. Em seguida, foram transferidos para uma solução descorante (Metanol 50% e Ácido Acético 25% em água). Após um período de 20 minutos sob agitação branda, a solução descorante foi trocada e assim sucessivamente até a descoloração completa do gel e visualização nítida das bandas.

3.9 Atividade de superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)

3.9.1 Atividade de SOD por espectrofotometria

Esta atividade enzimática foi determinada segundo metodologia adaptada de Peixoto (1999) a partir de Del Longo et al. (1993) e Gianopolitis e Ries (1977). Por esse método, é determinada a inibição da redução do NBT (*p*-nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. Neste ensaio, uma unidade de atividade enzimática (UA) de SOD, é considerada como a quantidade de enzima necessária para obter 50 % de inibição da redução do NBT pela SOD contida no extrato enzimático.

As amostras utilizadas foram as mesmas para determinação do teor de proteínas solúveis totais (item 3.7). Para tanto, os extratos foram lentamente descongelados em banho de gelo (± 4 °C) e após liquefação, diluídos (conforme necessidade) no próprio tampão de extração. Aliquotas de 100 μ L foram transferidas para tubos de ensaios protegidos da luz, contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 Mm, L-metionina 13 mM e NBT 75 μ M.

A reação foi iniciada pela adição de Riboflavina 2 μ M e a concomitante transferência dos tubos para uma câmara iluminada, por uma lâmpada fluorescente circular de 30 Watts, por período de 15 minutos. Em seguida, leituras de absorbância a 560 nm foram tomadas em espectrofotômetro (Spectronic 20 Genesys). Para efeito de correção nos cálculos, o branco da reação foi considerado como sendo os tubos que não continham extrato, expostos e não expostos à luz. A atividade foi determinada pelo cálculo da quantidade de extrato que inibiu 50 % da redução de NBT (BEAUCHAMP ; FRIDOVICH, 1971) e expressa em UA g⁻¹ MF min⁻¹.

3.9.2 Atividade de SOD em gel

A atividade das diferentes isoformas de SOD em gel foi realizada por meio de uma corrida eletroforética de proteínas em gel nativo e, em seguida, os géis foram revelados com inibidores específicos de cada isoforma da enzima. Após a corrida, os géis foram lavados em água

deionizada e incubados numa solução de Fosfato de Potássio 50mM, pH 7,8 + EDTA 1mM + Riboflavina 0,05 mM + NBT 0,1mM, por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, após lavagem com água, um deles foi incubado por 20 minutos com uma solução-tampão de Fosfato de Potássio 100mM, pH 7,8 + KCN 2mM. O segundo gel foi incubado com a mesma solução-tampão contendo H_2O_2 5mM. O terceiro gel, que serviu de controle para a comparação, permaneceu em água deionizada. Os géis foram então iluminados por 5 minutos ou até o aparecimento das bandas. A FeSOD de cloroplastos é inativada por H_2O_2 e resistente a Cianeto de potássio. A MnSOD, presente em mitocôndrias e peroxissomos, não é inativada por H_2O_2 nem inibida por cianeto de potássio. As Cu-ZnSODs são inativadas por cianeto e peróxido de hidrogênio e estão presentes nos cloroplastos e no citosol (ALSCHER et al., 2002).

3.10 Atividade de peroxidases de ascorbato (APX) (EC 1.11.1.11)

A atividade de APX foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), modificado por Koshiba (1993), onde a presença de APX no extrato bruto diminui a concentração de peróxido de hidrogênio do meio, pela redução do ácido ascórbico fornecido. Para tanto, o primeiro extrato obtido no item 3.7 foi utilizado. Diluições das amostras foram feitas quando necessário e alíquotas de 100 μL dos extratos diluídos, transferidas para tubos de ensaio. Ao meio de reação, 2,7 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo ácido L-ascórbico 0,8 mM. foram adicionados.

O experimento foi iniciado pela adição de H_2O_2 ao meio de reação, observando o decréscimo da leitura no intervalo de 60 segundos, à absorbância de 290 nm em espectrofotômetro modelo Pharmacia LKB Ultrospec III. Adicionalmente, leituras de tubos controles, com e sem a amostra, na ausência de peróxido de hidrogênio, foram realizadas. Para efeito de cálculo, foi considerado que o decréscimo de 1 unidade de absorbância seria equivalente a 1 unidade de atividade (UA). As atividades do extrato total foram determinadas pelo cálculo da quantidade de extrato que reduziu a leitura de absorbância em 1 UA e expressos em $\text{UA g}^{-1} \text{MF min}^{-1}$.

3.11 Extração de proteínas totais para eletroforese bidimensional (2-D)

O extrato de proteínas totais, para corrida eletroforética, foi obtido seguindo metodologia adaptada de Rabilloud (1996) e Molloy (1998). Da matéria fresca de folhas congeladas, 500 mg

de uma amostragem composta de cada tratamento, foram macerados em almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido, por 5 minutos. Em seguida, 5 mL de uma solução contendo TCA 10 % (p/v), DTT 0,07 % (p/v) em acetona P.A. foram adicionados. As amostras foram deixadas em repouso para precipitação natural, a -20°C , por 2 horas, e, em seguida, centrifugadas a $30.000 \times g$ a 4°C , por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com uma solução contendo DTT 0,07 % (p/v) dissolvido em acetona P.A., por 30 minutos, a -20°C . A mistura foi novamente centrifugada a $30.000 \times g$, por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Após essa etapa, o precipitado foi ressuspenso em 3 mL de tampão de lise contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, tris 40 mM, DTT 24 mM e CHAPS 0,1 % (p/v) e, novamente, as amostras foram centrifugadas a $15.000 \times g$, a 4°C , por 15 minutos. Desta vez, o sobrenadante foi coletado (fração protéica) e o precipitado, descartado (Figura 3).

Figura 3- Esquema da sequência de extração de proteínas totais de folhas de plântulas de cana-de-açúcar para corrida eletroforética uni e bidimensional sob condições desnaturantes

3.12 Focalização isoelétrica (IEF) e SDS-PAGE

As amostras de proteínas extraídas conforme a descrição anterior (~ 400 µg) foram homogeneizadas com 450 µl de tampão de re-hidratação de gel (8M Ureia/ 1M Tiourea/ 10% Glicerol/ 2% CHAPS/ 1% IPG Buffer pH 3-10/ 25mM DTT/ 0,001% Azul de bromofenol). As amostras foram transferidas para Strip Holders e as tiras de focalização (Imobiline dry strips 18cm, pH 3-10 NL) colocadas sobre os mesmos. Logo em seguida óleo de silicone (IPG cover fluid) foi despejado sobre ambos. A hidratação das tiras ocorreu durante 12-15h em sistema Ettan IPGphor II (Amersham Biosciences), seguindo com a focalização isoelétrica, a 20 °C, em corrente máxima de 50 µA/gel, voltagem máxima de 8000 V e potência máxima de 0,2 W/gel. De acordo com Gorg et al (1988), os parâmetros para IEF usando tiras de 18cm e pH 3-10 foram 500Vh; 1000Vh; 2000Vh; 3000Vh; 3500V (5h) ~ 24kVh.

Em seguida, as tiras de géis contendo as proteínas focalizadas foram incubadas em solução de equilíbrio (50 mM Tris, pH 8,8, 6M Ureia, 30% v/v Glicerol, 2% SDS e traços de Azul de bromofenol) contendo 10 mg/mL de DTT, por 15 min, a 20°C, e depois em solução de equilíbrio contendo 25 mg/mL de iodoacetamida, por 15 min a 20°C. Uma vez processada a segunda incubação, as tiras foram posicionadas no topo de géis SDS-PAGE 12,5% para realização da segunda dimensão. A corrida foi realizada em sistema vertical (BioRad) seguido os seguintes parâmetros de corrida: 25mA/gel; $E_{\max}$ 250 V e $P_{\max}$ 25 W. A duração da corrida foi de aproximadamente 5 horas. Em seguida os géis foram revelados em solução de Coomassie Blue, conforme descrito no item 3.8.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos do tratamento sobre a fluorescência da clorofila *a*

As medidas de fluorescência da clorofila são rapidamente obtidas e processadas, além de serem bastante precisas e não-destrutivas. Atualmente é a principal ferramenta para análise da performance fotossintética da planta e seu estado fisiológico geral (SCHREIBER et al., 1998).

Figura 4- A-Medidas da fluorescência basal (Fo) e máxima (Fm) da clorofila e B- eficiência quântica potencial do PSII em plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágono (Paraquat) após 18 horas de aplicação

Os resultados expostos na Figura 4A indicam um discreto aumento na fluorescência basal (Fo) seguido de uma queda na fluorescência máxima, em especial na dose de 4mM Metil Violágono. O mesmo ocorreu com a eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm), ou seja, uma drástica queda a partir da dose de 4mM Metil Violágono (Figura 4B). Decréscimos de Fv/Fm e da fluorescência máxima (Fm) indicam dano no aparato fotossintético (FRACHEBOUD, 2001; KRAUSE ; WEIS, 1991; LAISK et al., 1998).

O parâmetro Fo reflete o estado da clorofila nos centros antena e pode ser considerado uma medida da distribuição de energia inicial para o PSII, bem como a eficácia de captura da mesma (SEPPANEN et al., 1998). A relação Fv/Fm reflete a máxima eficiência com que a luz, absorvida pelo complexo antena do fotossistema II, é convertida em energia química. Guidi et al.,

(2000) observaram que o declínio de Fv/Fm em folhas de *Phaseolus vulgaris* tratadas com PQ foi acompanhado por um aumento fluorescência mínima (Fo). Estes autores inferiram que o PQ foi capaz de induzir danos ao PSII, excedendo a capacidade fotoprotetora da planta.

Em geral, a ocorrência de estresses ambientais que afetam a eficiência do PSII levam ao decréscimo de Fv/Fm (KRAUSE ; WEIS, 1991). No caso do presente estudo, as plantas foram tratadas com um herbicida atuante no PSI, inibindo o fluxo normal de elétrons, ocasionando danos no PSII também. Isto porque os principais transportadores existentes entre os dois fotossistemas (Pheo, Qa, Qb, PQ, Cyt bf, PC) perdem sua capacidade funcional, gerando um acúmulo prejudicial de elétrons e o desbalanço do gradiente de prótons entre estroma e lúmen do cloroplasto. Além disso, radicais reativos de oxigênio (EROs), especialmente o superóxido (1O_2), foram detectadas no PSII. Estas espécies foram produzidas pela re-oxidação do PQ reduzido e propagaram para os centros de reação do PSII, ocasionando uma perda da eficiência fotossintética (Fv/Fm) (IANNELLI et al., 1999) e, também, efeitos sobre as membranas celulares (SLOOTEN et al., 1995).

O parâmetro Fv/Fm é uma estimativa da capacidade fotoquímica total e da eficiência do PSII, ou seja, o número de complexos do PSII ativos. Valores típicos desse parâmetro em folhas saudáveis e iluminadas variam em torno de 0.8 ou um pouco abaixo desse valor (CRITCHLEY, 1998). Logo, o resultado da figura 4B evidencia que as plantas não-tratadas (0mM Metil Violágeno) estavam em perfeitas condições fotossintéticas. Uma diminuição significativa deste parâmetro, tal como ocorreu na dose 4, sugere uma diminuição na eficiência quântica da evolução do O_2 ou da fixação do CO_2 , além de ser também um indicativo de fotoinibição (HIDEG et al., 2000; KATO et al., 2003)

No presente estudo, a redução do valor de Fv/Fm, em especial na dose 4, pode ser atribuído ao aumento de Fo observado na mesma dose (Figura 4). Entretanto, mesmo com níveis baixos, como na dose 4, a atividade funcional do PSII foi mantida, pois, conforme já mencionando, uma redução de Fv/Fm indica uma perda na eficiência fotoquímica primária de folhas fotoinibidas. Essa diminuição é atribuída ao PQ, que induz uma redução na fluorescência variável da clorofila, resultando numa redução de Fm. Os valores de Fm, em todas as doses de PQ, reduziram significativamente devido a uma menor taxa de transporte de elétrons, conforme o gráfico a seguir.

Figura 5- Taxa aparente de transporte de elétrons em plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágênio (Paraquat) após 18 horas de aplicação

A taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) foi afetada pelo tratamento com Metil Violágênio, notadamente na dose intermediária de 4mM, em que os valores em $\mu\text{mol elétrons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ alcançaram valores próximo de zero. É importante ressaltar que as medidas de fluorescência da clorofila no claro, foram realizadas em duas intensidades distintas, conforme já mencionado na metodologia. Os resultados das medidas de claro, obtidos em intensidades de PAR baixa e média, asseguram que não há quaisquer interferências desses valores de PAR na resposta fisiológica das plantas, ou seja, não existe possibilidade de haver uma indução de estresse por excesso de luz. Portanto, as medidas obtidas representam o real estado fotossintético das plantas em estudo. Este parâmetro está relacionado diretamente com a resposta do PSII a determinada intensidade de PAR.

Ao penetrar nas folhas da plantas, a molécula de PQ tranforma-se num radical, na presença de luz, e este irá reagir com o oxigênio molecular formando espécies reativas de oxigênio (EROs) (ASADA; TAKAHASHI, 1987). Isso irá afetar a ETR nos tilacóides dos cloroplastos, provocando uma diminuição, como observado em feijoeiro por Schmitz-Eiberger ; Noga (2001). De maneira similar, na figura 5, com exceção da dose inicial (2mM), o PQ ocasionou uma redução na ETR.

Essa inibição do transporte fotossintético de elétrons em folhas da cana-de açúcar deve, também, ser associada aos danos gerados no PSI pelo tratamento com Paraquat. Em estudo com batateiras submetidas à alta temperatura, Havaux (1993) observou que os seguintes aspectos estão

interligados com a queda da ETR: a inibição da fotólise da água (em temperaturas superiores a 32°C), a redução da eficiência de captação de energia pelos centros de reação do PSII, alterações no fluxo de elétrons após Q_A ($T_f > 42^\circ\text{C}$) e danos no PSI ($T_f > 45^\circ\text{C}$).

A manutenção do fluxo de elétrons através do aparato fotossintético, mesmo na ausência de quantidades suficientes de NADP^+ , acceptor de elétrons, é essencial para a proteção do cloroplasto do estresse oxidativo, que neste estudo foi induzido pelo tratamento com PQ. Existem pelo menos duas diferentes vias que participam desse processo: fluxo cíclico de elétrons e o ciclo água-água. Este ciclo consiste no seguinte: parte dos elétrons resultantes da fotólise da água, no PSII, são usados na geração de redutores para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); a outra parte segue para que haja a redução univalente do O_2 no PSI (ASADA, 2006). Os elétrons fluem da água, consumida no PSII, para a água produzida na redução do H_2O_2 , no PSI.

De forma sucinta, no PSI, duas moléculas de O_2 são reduzidas, por dois elétrons do PSII, a radicais superóxidos ($^1\text{O}_2$). Estes radicais então são convertidos em H_2O_2 e O_2 em reação catalisada pela Superóxido Dismutase e o H_2O_2 é reduzido, pela Ascorbato Peroxidase, gerando água. Então, os elétrons oriundos da molécula de água no PSII são doados para a redução do O_2 . O ciclo água-água tem função fisiológica de proteção de moléculas alvo contra a ação de EROs, ajustamento da fotoprodução da razão ATP/NADPH e dissipação do excesso de fótons (ASADA, 1999).

O fluxo de elétrons através do ciclo água-água foi estimado a partir da assimilação de CO_2 e parâmetros de fluorescência da clorofila de folhas adaptadas em escuro (MAKINO et al., 2002). Estes autores observaram que o fluxo de elétrons pelo ciclo água-água antes da fotoativação do Ciclo de Calvin é similar ao fluxo para assimilação de CO_2 , em *steady state*, após a fotoativação. Tais observações indicam que o ciclo água-água é importante o suficiente para permitir o fluxo de elétrons em *steady state*, tornando-se a principal via de elétrons antes da fotoativação. Dessa forma, esta via parece ser indispensável ao início da fotossíntese em folhas adaptadas ao escuro sem haver danos fotooxidativos.

Um aumento no fluxo de elétrons através do ciclo água-água foi observado em plantas sob condições de estresse por baixa disponibilidade de CO_2 (MIYAKE; YOKOTA, 2000), baixas temperaturas (HIROTSU et al., 2004; LI et al., 2005) e estresse salino (CHEN et al., 2004). Em plantas C_4 , uma redução de ETR e fixação de CO_2 pode representar um aumento de elétrons para o ciclo água-água devido a baixa atividade fotorrespiratória (FRYER et al., 1998).

Figura 6- Eficiência quântica efetiva do FSII em plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 18 horas de aplicação

Da mesma maneira que a eficiência quântica potencial (F_v/F_m) e a taxa de transporte de elétrons (ETR), os resultados da eficiência quântica efetiva ($\phi PSII$) evidenciam um decréscimo na dose de 4mM Metil Violágeno para valores próximos de zero (Figura 6). Entretanto, diferente dos resultados de ETR, os valores de $\phi PSII$ foram maiores em baixa intensidade de PAR ($100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ fótons).

Este parâmetro estima a eficiência com que a energia luminosa absorvida pelas clorofilas associadas ao PSII é usada na fase fotoquímica em determinada intensidade luminosa. É determinado pelo produto da fração dos centros de reação abertos (qP) pela eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos (F_v'/F_m'). Ambas são medidas de claro, obtidas, neste trabalho, em duas intensidades de PAR, baixa e média.

A $\phi PSII$ pode ser considerada como a eficiência quântica do transporte linear de elétrons através do FSII, em uma dada intensidade luminosa (BAKER; ROSENQVIST, 2004). Segundo estes autores, a habilidade do aparato fotossintético em remover elétrons das quinonas (Q_A), primeiras moléculas aceptoras estáveis de elétrons (WALKER, 1992), é um fator limitante de $\phi PSII$. Portanto, baixos valores de $\phi PSII$ refletem um acúmulo de Q_A em estado reduzido.

Desta forma, os resultados da figura 6 corroboram com o decréscimo na taxa aparente de transporte de elétrons (Figura 5), marcadamente na dose intermediária de 4mM de Metil

Violágênio, cujos valores aproximam-se de zero. Nas doses subsequentes é possível observar uma discreta tendência de aumento na eficiência quântica efetiva do FSII, bem como nos valores de ETR. Respostas contrastantes aos resultados exibidos na Figura 6 foram encontradas em cultivares de soja submetidas a tratamentos de elevadas temperaturas (DASH; MOHANTY, 2001), em que os valores de ϕ PSII não sofreram alteração significativa. O mesmo ocorreu em folhas de *Aegilops* (REKIKA et al., 1997), que não exibiram nenhuma alteração fotossintética particular ao frio ou calor quando comparadas com folhas de *Triticum turgidum*.

Figura 7- A- Excesso relativo de energia no aparato fotoquímico e B- coeficiente de extinção não fotoquímica (*quenching*) de energia em plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágênio (Paraquat) após 18 horas de aplicação

O excesso de energia radiante (EXC) é uma variável que indica o excesso relativo de energia no aparato fotoquímico (RIBEIRO, 2006), calculada por meio da diferença entre a eficiência quântica potencial e efetiva no PSII. Representa um índice relativo de um excesso prejudicial de energia quântica na fase fotoquímica da fotossíntese. A dissipação desse excesso de energia é essencial para a sobrevivência das plantas a fim de evitar fotodanos, sendo o aumento de qN um exemplo de resposta (SCHREIBER et al., 1998).

A extinção da fluorescência pode ocorrer por processos fotoquímicos que dependem da presença de Q_A em estado oxidado (coeficiente de extinção fotoquímico, qP) ou não fotoquímicos, os quais estão relacionados à dissipação não radiativa de energia (coeficiente de extinção não

fotoquímica, q_N). Este último *quenching* engloba os processos térmicos da supressão de fluorescência sendo a maior parte ocasionada pela existência de um gradiente de pH transmembranar nos tilacóides dos cloroplastos (ΔpH) (KRAUSE; WEIS, 1991)

Em plantas de cana-de-açúcar tratadas com PQ esse índice, q_N , apresentou um aumento de quatro vezes entre as doses 2 e 4, nas duas intensidades de PAR analisadas, mantendo-se constante a partir de então. A elevação de q_N nas plantas analisadas pode ser decorrente de uma menor taxa fotorrespiratória. Com isso, parte da energia (ATP e NADPH) que seria dissipada, via assimilação de O_2 , acaba sobrando. O mecanismo de dissipação deste excesso de energia é pela forma não radiativa (q_N), via energia térmica pelo sistema antena (BUTLER, 1978; EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005)

Os valores do coeficiente de extinção fotoquímica (q_P), ou seja, transferência de energia dos estados excitados para os centros de reação do PSII, exibiram comportamento antagônico aos dados de q_N , apresentando uma redução abrupta na dose intermediária de PQ (dados não mostrados).

O fechamento dos centros de reação do PSII é acompanhado também pelo incremento de q_N , que, por sua vez, relaciona-se ao decréscimo de ϕ_{PSII} , ou seja, decréscimo na eficiência fotoquímica dos centros de reação do PSII abertos (GENTY et al., 1989), como evidenciado pelos resultados das figuras 6 e 7B. É importante ressaltar que os mecanismos dissipadores de energia térmica tornam-se ativos apenas quando o pH do lúmen cloroplastidial assume valores baixos (ORT, 2001). Existem diversos trabalhos comprovam que o baixo pH do lúmen ativa a enzima violaxantina de-epoxidase, a qual converte violaxantina em zeaxantina e antheraxantina (DEMMING-ADAMS et al., 1990; HAVAUX; NIYOGI, 1999; MINKOV et al., 1999; KATO et al., 2003). A formação de zeaxantina está relacionada ao aumento da dissipação da energia na forma não radiativa (DEMMING-ADAMS; ADAMS, 1996).

A clorofila em seu estado de máxima excitação (3Chl) é extremamente reativa com o oxigênio molecular caso sua energia não seja dissipada fotoquimicamente ou por transferência de excitação. Uma vez que reage com o oxigênio molecular (O_2) forma um radical excitado de oxigênio altamente reativo, o oxigênio singleto (1O_2) (MINKOV et al., 1999; TAI; ZEIGER, 2004). Este radical, conforme já mencionado na revisão de literatura deste trabalho, é extremamente prejudicial aos componentes celulares, especialmente lipídeos. É nesse momento

que os carotenóides, em especial as xantofilas, exercem uma ação protetora por meio do rápido *quenching* da clorofila excitada (KRAUSE; WEIS, 1991).

A dissipação de EXC através de processos não fotoquímicos (qN), relacionados a um decréscimo reversível de F_v/F_m , um aumento de ΔpH (redução do pH no lúmen) e uma maior atividade do ciclo das xantofilas (conversão de violaxantina em zeaxantina) é essencial para a manutenção da atividade fotossintética sob condições adversas, bem como a fixação de CO_2 quando esta é prejudicada por estresses adicionais, de origem biótica ou abiótica, como no caso do presente trabalho.

Figura 8- Relação entre o coeficiente de extinção não fotoquímica da fluorescência (qN) e o aumento do excesso relativo de energia (EXC) de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 18 horas de aplicação. Dados de EXC e qN baseiam-se nos resultados apresentados na Figura 7. Símbolos indicam o valor médio ($n=5$) $\pm$ desvio padrão.

A relação significativa de qN com EXC (até valores de EXC próximos a 1,0) pode ser considerada uma consequência de processos regulatórios nos cloroplastos para manter F_v relativamente constante nas mais variadas condições (BILGER et al., 1995). Alguns estudos têm relatado o aumento de qN em resposta a EXC em mudas de cajueiro (SOUZA et al., 2005) e laranjeira (RIBEIRO et al., 2003). É importante relembrar que EXC representa um índice relativo, ou seja, o valor de 1,0 pode ser alcançado em uma variedade de situações em que os valores de

PAR não são necessariamente elevados, sendo dependente do estado fisiológico da folha, como no caso do presente trabalho.

A fotoproteção do FSII é relacionada a eventos fotoquímicos que permitem a dissipação de EXC e impedem a ocorrência de inibição crônica e oxidação dos componentes fotossintéticos (HAVAUX; NIYOGY, 1999). Alguns mecanismos fotoprotetores envolvem aceptores alternativos de elétrons capazes de dissipar EXC, rotas bioquímicas para eliminação das espécies reativas de oxigênio geradas por EXC, assim como uma variedade de mecanismos de reparo (ORT, 2001).

Em suma, aclimação e proteção do FSII em condições de estresse compreendem ajustes no tamanho e quantidade das antenas coletoras de luz (LHCII), na quantidade de carreadores de elétrons e aumento da atividade bioquímica de algumas enzimas, através de regulação gênica e fosforilação reversível de proteínas, assim como extinção não fotoquímica da energia de excitação por mecanismos envolvendo ΔpH e inter-conversão de xantofilas. Em relação ao frio do inverno, por exemplo, a aclimação fotoquímica pode ocorrer tanto em questão de minutos quanto a longo prazo, envolvendo desde alterações na distribuição de energia entre os fotossistemas II e I até redução no tamanho da antena do FSII, com conseqüente decréscimo da eficiência quântica da fotossíntese (HUNER et al., 1998).

4.2 Efeitos do tratamento sobre indicadores bioquímicos de resposta ao estresse oxidativo

A intensidade dos efeitos do estresse oxidativo pode ser determinada na planta inteira, ou nos tecidos tratados e, mais especificamente, no nível celular. Para isso, é necessário avaliar variáveis que estejam diretamente relacionadas ao grau de estresse provocado. Assim, a estimativa do grau de estresse oxidativo por esses indicadores, no nível celular, pode, ao lado de outras abordagens, fornecer dados importantes para uma melhor compreensão fisiológica dos efeitos do estresse, neste caso causado por herbicida, como um todo.

Figura 9- Aspecto visual de folhas de cana-de-açúcar condição controle e tratadas com 4mM de Metil Viologeno após 24 horas de aplicação

Os sintomas visuais mostrados na figura 9, claramente evidenciam os danos em folhas causados pela aplicação de PQ, como perda de turgor, clorose avançada e manchas necróticas ao longo da superfície foliar, bem como um enrolamento do limbo. De acordo com uma escala de notas utilizada para a avaliação visual de fitotoxicidade de herbicidas (SBCPD,1995), as injúrias provocadas pelo PQ, na dose de 4mM, recebem o conceito *alta*, que descreve danos irreversíveis, com previsão de redução no rendimento econômico.

Mascher et al. (2005), por meio de eletromicrografias de folhas de cevada tratadas com Paraquat (0, 5; 1 e 5mM), observaram uma perda de turgor celular, deteriorização de membranas do cloroplasto e perda do padrão paralelo de distribuição de lamelas cloroplastidiais.

4.2.1 Peroxidação de lipídeos

Figura 10- Determinação da concentração de espécies reativas do Ácido Tiobarbitúrico em folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 24 horas e 48 horas de aplicação

A estimativa do estresse oxidativo através da peroxidação lipídica, com a quantificação indireta de seu produto, o malondialdeído (MDA), foi feita pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS ou TBA) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; HODGES et al., 1999). O Paraquat, como herbicida inibidor do FS II, age, inicialmente, pelo bloqueio do fluxo de elétrons do FS II. Esse bloqueio impede a transferência de energia da clorofila para o centro de reação P₆₈₀, o que dá origem a uma molécula altamente reativa, a clorofila tripleto (³Chl). Esta reage com o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). Todas essas moléculas altamente reativas irão reagir com os lipídios formadores das membranas, originando a peroxidação lipídica, que, além de formar novos radicais lipídicos, danificam irreversivelmente as membranas celulares (HESS, 2000; DEL RIO et al., 2005).

Conforme evidenciado na figura 10, a intensidade da peroxidação lipídica das membranas celulares foi superior em tecidos de plantas com 48 horas de exposição ao Paraquat, quando comparada com as plantas sob 24 horas de exposição. Em ambos os períodos de exposição, podemos considerar que o aumento dos danos foi proporcional à dose de Metil Violágeno aplicada. Mesmo sendo esta uma variedade de cana-de-açúcar robusta e resistente a diversos

outras adversidades ambientais, o herbicida causou danos evidentes também no aspecto visual (Figura 9).

Ekmeckci e Terzioğlu (2005), observaram um aumento no conteúdo de MDA em genótipos de trigo tratados com Paraquat tanto selvagens (*Aegilops biuncialis* e *Aegilops cylindrica*) como em variedades cultivadas de *Triticum aestivum* e *Triticum turgidum* e, mesmo nas cultivares consideradas mais tolerantes, este índice sofreu um aumento discreto, embora inferior ao resultado das demais cultivares.

Contrariamente aos resultados aqui apresentados, Parida et al., (2004) observou que este índice não era alterado em *Bruguiera parviflora* tratadas com concentrações crescentes de NaCl em hidroponia. Desta forma, juntamente com os demais resultados de enzimas antioxidativas obtidas no referido trabalho, os autores sugeriram que o NaCl induz uma regulação enzimática eficiente no combate aos danos oxidativos gerados nesta planta por meio de uma atividade aumentada de enzimas antioxidantes.

A ação do herbicida é normalmente amenizado por defesas naturais da planta ao estresse, destacando-se o papel dos carotenóides, os quais são capazes de reagir com as EROS, dissipando sua energia na forma de calor, como já explicado anteriormente. Em condições normais, a ação dos carotenóides é suficiente para impedir o dano às membranas. Contudo, quando a planta é tratada com um herbicida como o Metribuzin[®], a capacidade protetora dos carotenóides é ultrapassada e a planta sofre a peroxidação lipídica (DEVINE et al., 1993; BUCHANAN et al., 2000). O mesmo ocorre com o Paraquat, pois o conteúdo de carotenóides é reduzido ao passo que o MDA é aumentado em plantas de trigo tratadas com este herbicida (EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005).

4.2.2 Conteúdo de clorofilas totais, *a* e *b*

Figura 11- Determinações do conteúdo de clorofilas totais (A), clorofila *a* (B), clorofila *b* (C) e razão clorofila *a/b* (D) em folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágênio (Paraquat) após 24 horas e 48 horas de aplicação

As moléculas de clorofilas são pigmentos primários de captura de luz para as reações fotoquímicas, presentes nos centros de reação dos fotossistemas. Cada centro de reação tem aproximadamente 200-300 moléculas antena, entre clorofilas e carotenóides (TAIZ; ZEIGER, 2003), sendo a clorofila *a* o principal pigmento dos complexos coletores de luz (LHC) em

organismos oxigênicos. Um menor conteúdo de clorofilas está relacionado a menor quantidade de membranas nos tilacóides e menor empilhamento nos centros de reação do PSII (SANDMANN; SCHEER, 1998). A maior parte dos pigmentos acessórios está presente nos complexos coletores de luz do PSII (LHCII), em especial a clorofila *b* (PAULSEN, 1995).

Os resultados da figura 11A mostram um decréscimo no conteúdo total de clorofilas a partir da dose de 2mM de Metil Violágeno, sendo esta queda mais pronunciada em plantas com 48 horas de exposição ao composto ativo. Em plantas com 24 horas de exposição, foi detectado um incremento na dose inicial de PQ, tanto no conteúdo de clorofilas totais, como em clorofilas *a* e *b* (Figura 11B e C, respectivamente) ainda injustificado.

O conteúdo de clorofilas nas plantas controle apresentou uma diferença entre os períodos de 24 e 48 horas (Figura 11A), o que foi atribuído aos resultados de clorofila *b* (Figura 11C), onde essa diferença também era evidente. Essa diferença pode ser justificada por variações na intensidade luminosa diária, uma vez que as plantas foram coletadas em dias diferentes, ou seja, parte delas com 24 horas de exposição e outra parte com 48 horas.

Os resultados de clorofilas *a* e *b* mostraram-se semelhantes, tanto em plantas com 24 horas como em plantas com 48 horas de exposição ao PQ, ou seja, a redução na quantidade de clorofilas, *a* e *b* foi mais pronunciada no tratamento de 48 horas, em especial na dose de 4Mm (Figuras 11B e C). Resultados similares foram encontrados por Benavides et al. (2000) em trabalho com discos de folhas de girassol tratadas com PQ durante 20 horas de exposição. Neste trabalho, os autores encontraram uma redução de 30% no conteúdo de clorofilas de folhas tratadas com PQ quando comparadas com folhas de plantas controle. Além disso, os autores observaram que um pré-tratamento com poliaminas, no caso espermidina, é capaz de minimizar a perda de clorofila causada pelo PQ.

Em recente trabalho publicado com plântulas de cevada tratada com diferentes doses de Paraquat (0,5; 1 e 2mM), observou-se que um pré-tratamento com 2-aminoetanol era capaz de minimizar as perdas no conteúdo de clorofilas em todas as doses testadas (MASCHER et al., 2004). Este composto, de ocorrência natural em células vivas, desempenha importante papel na embriogênese, no desenvolvimento de órgãos e na formação de membranas intracelulares.

4.2.3 Concentração de proteínas solúveis e insolúveis

Figura 12- Concentração de proteínas, fração solúvel (A) e fração insolúvel (B) em folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 24 horas e 48 horas de aplicação

Os resultados obtidos através do fracionamento protéico mostraram uma diminuição na concentração de proteínas na fração solúvel de folhas, mais pronunciada em plantas expostas a 48 horas de tratamento com PQ. Nessas plantas ocorre uma redução linear na concentração de proteínas solúveis até a dose intermediária (4mM), estabilizando a partir de então (Figura 12A). Nas plantas com 24 horas de exposição a redução na concentração de proteínas é mais branda, porém, é na dose intermediária que também ocorre uma diminuição de aproximadamente 33% do valor apresentado pelas plantas não tratadas. Esta diferença, sempre evidente da dose intermediária, vem se repetido em diversas análises já expostas neste trabalho, o que sugere que esta concentração de Paraquat, que inclusive é a dose comercial aplicada nos canaviais, é um ponto chave para a planta em termos de alterações metabólicas drásticas.

Já os resultados de concentração de proteínas insolúveis não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 12 B) em ambos períodos de exposição ao PQ, apesar de conter aproximadamente a mesma quantidade de proteínas da fração solúvel no tratamento controle. Desta forma, fica evidente que a fração solúvel, enriquecida em proteínas citosólicas, é a mais afetada pelo tratamento com o herbicida quando comparada com a fração insolúvel, esta constituída essencialmente por proteínas de membranas, organelas e nucleares. Além disso, uma

exposição mais prolongada ao PQ é, nitidamente, bem mais prejudicial para a planta, alterando drasticamente sua concentração de proteínas e aumentando a degradação destas moléculas.

4.2.4 SDS-PAGE 12,5% de proteínas solúveis e insolúveis

Figura 13- Eletroforese desnaturante em mini-gel de poliacrilamida 12,5 % da fração de proteínas solúveis (A e C) e insolúveis (B e D) de folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após períodos de 24 horas (A e B) e 48 horas (C e D) de aplicação. Os números 0,2,4,6 e 8 correspondem as concentrações de Metil Violágeno em mM

O perfil de proteínas das frações solúveis e insolúveis, mostrado na figura 13, não apresentou uma resolução acurada de bandas que permitisse inferir com precisão se existiram bandas induzidas ou reprimidas pela presença do PQ. Apenas podemos observar em todos os géis uma clara redução na intensidade das bandas proteicas a partir da dose 4, evidenciando que ocorre uma degradação de proteínas a partir de então. Esta degradação é mais evidente nos géis correspondentes às plantas com 48 horas de exposição (Figura 12 C e D), o que é perfeitamente esperado, uma vez que as plantas já apresentavam sintomas visuais de necrose foliar neste período.

O mais interessante a ser observado nesta figura é o gel correspondente a fração solúvel de folhas de plantas expostas ao PQ durante 24 horas (Figura 13A), pois existem algumas bandas de proteínas que mantêm-se constantemente expressas mesmo em doses elevadas do herbicida. Dentre elas, as mais evidentes possuem uma massa molecular aproximada de 66, 36 e 29 KDa. Este fato sugere que estas proteínas devem desempenhar um papel imprescindível na planta, diretamente relacionado com sua sobrevivência em condições adversas.

Resultados bastante similares àqueles mostrados na Figura 12A, foram obtidos com duas cultivares de trigo tratadas com Paraquat (LASCANO et al., 2003). Neste trabalho, os autores demonstraram que há uma redução dose-dependente na concentração de proteínas nas duas variedades, entretanto, demais parâmetros de defesa oxidativa analisados apresentaram valores diferentes entre as cultivares, evidenciando maior susceptibilidade de uma delas. A redução na concentração de proteínas totais também ocorreu em folhas de cevada tratadas com Paraquat e sob estresse fotooxidativo (CASANO et al., 1999)

Altos níveis de EROs podem inativar ou degradar um grande número de proteínas tanto em células animais (YAKES; VAN HOUTEN, 1997) como em cloroplastos (CASANO; TRIPPI, 1992). Estas alterações são, provavelmente, consequências do número de sítios protéicos alvos de radicais, como resíduos de aminoácidos aromáticos e grupos tióis (LASCANO et al., 1998)

4.2.5 Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)

Figura 14 - Atividade da enzima Superóxido Dismutase em folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 24 horas e 48 horas de aplicação

A atividade e expressão de genes de enzimas antioxidantes é variável conforme o tipo e intensidade do estresse sofrido pela planta (PARIDA et al., 2004). A toxicidade ao Paraquat é mediada pela geração de radicais superóxido ($^1\text{O}_2$) produzido nas membranas dos cloroplastos e a Superóxido Dismutase é uma enzima-chave na detoxificação de ânions superóxido. O aumento na atividade de SOD é considerado como fator de resistência ao Paraquat em plantas de ervilha (DONAHUE et al., 1997), *Conyza canadensis* (SZIGETI, 2005), cevada (CASANO et al., 1999; MASCHER et al., 2005), trigo (LASCANO et al., 2003), entre outras.

O resultado da atividade relativa de SOD (Figura 14), calculado na base de proteínas totais, mostra um aumento gradativo da atividade desta enzima em plantas tratadas com Paraquat, em especial no período maior de exposição, ou seja, 48 horas. Neste período de exposição, as plantas já exibiam claros sinais visuais de toxicidade (dados não mostrados), bastante avançados na doses maiores. Nesses casos, uma atividade aumentada de SOD certamente não seriam suficientes na detoxificação de radicais tóxicos para a planta.

Respostas similares foram verificadas em cevada também tratadas com Paraquat (MASCHER et al., 2005), inclusive com doses semelhantes de Metil Violágeno. No mesmo trabalho, os autores observaram que um pré-tratamento com Aminoetanol reflete numa redução de

atividade desta enzima. Entretanto, em discos foliares de girassol tratados com PQ, a atividade de SOD reduziu significativamente e a aplicação de poliaminas foi capaz de minimizar os efeitos deletérios deste herbicida (BENAVIDES et al., 2000). Em estudo com plântulas de trigo expostas ao cádmio não foram observadas mudanças na atividade de SOD (ZHAO et al., 2005)

Amsellem e colaboradores (1994) mostraram que a resistência ao Paraquat foi correlacionada com o estágio de desenvolvimento e atividade de SOD em plantas de *Conyza bonariensis*. Esta observação também foi feita por Chandru et al., (2003), em plantas de arroz injuriadas mecanicamente, a atividade de enzimas antioxidativas foi dependente do estágio de desenvolvimento.

Figura 15- Revelação diferencial da atividade em gel nativo 12,5% da enzima Superóxido Dismutase folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 24 horas de aplicação. Os números 0 ,2, 4, 6 e 8 correspondem as concentrações de Metil Violágeno em mM

Figura 16- Atividade em gel nativo 12,5% da enzima Superóxido Dismutase folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 24 horas e 48 horas de aplicação. Os números 0,2,4,6 e 8 correspondem as concentrações de Metil Violágeno em mM

Os resultados da atividade de SOD em gel, por meio da revelação diferenciada com compostos inibidores de algumas isoformas, permitiu a identificação de dois tipos de SOD em folhas de cana-de-açúcar tratadas com PQ (Figura 15). A ação destes inibidores, KCN e H_2O_2 , já foi mencionada anteriormente. Entretanto, o resultado da figura 16 não evidenciou alterações na expressão das isoformas reveladas, com exceção da isoforma Mn-SOD, que apresentou uma discreta diminuição em plantas expostas a 48 horas de tratamento, a partir da concentração de 4 mM de PQ (Figura 16). A expressão da isoforma SOD CuZn foi mantida em níveis similares ao controle mesmo em altas concentrações de PQ, apesar do decréscimo observado na atividade relativa total medida por espectrofotometria (Figura 14).

Em quase todas as plantas, a isoforma SOD CuZn é a principal SOD presente em cloroplastos e mais fortemente expressa. O número de isoformas CuZn é variável entre as espécies vegetais (ASADA, 2006). Além disso, a forma citosólica desta enzima está presente também no núcleo, tonoplasto (OGAWA et al., 1996), peroxissomos (JIMÉNEZ et al., 1997),

apoplástico (HÉROUART et al., 1994; STRELLER ; WINGSLE, 1994), e participa da biossíntese de lignina (OGAWA et al., 1997). Plantas transgênicas com alterações constitutivas na expressão de SOD CuZn têm mostrado uma maior resistência ao estresse oxidativo (AONO et al., 1993; SEN GUPTA et al., 1993; VAN CAMP et al., 1994; PITCHER; ZILINSKAS, 1996). Contudo, a manipulação de uma única enzima antioxidante pode não conferir uma tolerância ao estresse sofrido. O nível de produção de SOD contra o estresse oxidativo é variável entre plantas transgênicas (FOYER et al., 1994). Por exemplo, McKersie et al, (1999; 2000), verificaram melhoras na tolerância ao estresse oxidativo, enquanto Payton et al., (1993) não obtiveram os mesmos resultados positivos.

Kwon et al. (2002) observaram um aumento da tolerância ao estresse oxidativo induzido por PQ em plantas de tabaco transgênicas com expressão alterada de SOD e APX em cloroplastos. Perl et al., (1993) demonstraram uma resistência aumentada ao PQ em plantas de batata transgênica expressando a isoforma SOD CuZn de tomate. Conforme já mencionado, nem sempre é possível uma tolerância ao estresse oxidativo pela manipulação de uma única enzima. A justificativa para isso está na complexidade do sistema de remoção de EROs, em que a alteração de uma única enzima pode não representar uma mudança significativa na via de detoxificação da planta. Entretanto, é sempre importante verificar os níveis dos transcritos das enzimas antioxidativas para entender se as respostas foram constitutivas ou indutivas.

4.2.6 Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase (APX)

Figura 17- Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase em folhas de plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes concentrações de Metil Violágeno (Paraquat) após 24 horas e 48 horas de aplicação

A APX (Ascorbato Peroxidase), por ser predominantemente citosólica e organelar (FOYER; NOCTOR, 2000), tem maior participação na eliminação de H_2O_2 produzido pela SOD, através da via Halliwell-Asada. Na presença do Paraquat, cloroplastos iluminados iniciam a acumulação de H_2O_2 logo após alguns minutos (NAKANO; ASADA, 1980). Sob tais condições, a APX é a primeira enzima inativada após pequeno período de luz (MANO et al., 1999). Mesmo na ausência de Paraquat, a adição de H_2O_2 , no escuro, inativa APX (HOSSAIN; ASADA, 1984). Ao passo que outras enzimas, como SOD, DHAR (dehydroascorbate reductase) e GR (glutathione reductase) são inativadas somente após um longo período de luz na presença do Paraquat (ITURBE-ORMAETXE et al., 1998). Esses dados mostram que, entre as enzimas antioxidativas, a APX é a mais sensível, alvo primário do ciclo água-água anteriormente discutido.

O resultado da figura 17 evidencia essa sensibilidade da APX, pois, na concentração inicial de herbicida, há um aumento na atividade relativa desta enzima e, em seguida, a atividade sofre uma redução brusca com o aumento das concentrações. O paraquat também induziu o um aumento de atividade de outras peroxidases em folhas de batateira doce (KWAK et al., 1996), mas não seguido de uma redução na atividade destas enzimas, como no caso do presente estudo. Donahue et al., (1997), verificaram que um aumento nos níveis de RNAm de APX, induzido por Paraquat, não refletiam no correspondente aumento na atividade da enzima APX.

Soares-Netto (2001) descreve os resultados de uma busca no banco de dados de seqüências expressas de cana de açúcar (SUCEST) de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. Neste mesmo trabalho foram encontrados vários genes envolvidos na defesa antioxidante, como quelantes de metais, antioxidantes de baixo peso molecular, enzimas antioxidantes e sistemas de reparo foram verificados. Ascorbato (vitamina C) é um importante antioxidante em plantas tanto porque é encontrado em altas concentrações em células vegetais, como também é substrato da ascorbato peroxidase, uma enzima que foi encontrada com diferentes isoformas no banco de dados do SUCEST.

A indução de várias enzimas antioxidantes localizadas em plastídeos, como superóxido dismutase e componentes do ciclo ascorbato-glutationa é uma das respostas do plastídeo ao estresse sofrido. Estudos em proteômica têm mostrado a localização de outras enzimas antioxidantes no lúmen do tilacóide, bem como proteínas envolvidas em proteólise e mudanças conformacionais (Peltier et al, 2002).

4.3 Efeitos do tratamento sobre a expressão de proteínas totais em folhas de cana-de-açúcar

A utilização de mapas protéicos, como os géis bidimensionais, podem ser de grande valia para pesquisas biológicas pois fornecem uma visão global do proteoma de um determinado tecido e permitem a pré-separação de proteínas de um tecido por ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (MM). O proteoma, por sua vez, pode ser visto como todas as proteínas expressas no tecido naquele momento e naquela determinada situação, e as proteínas, como já é sabido, são os verdadeiros efetores de funções celulares diversas.

Os dados gerados por análises proteômicas devem ser combinados com outras informações genéticas a fim de buscar uma classificação funcional de proteínas e genes para a elucidação de vias metabólicas complexas. Estas associações são essenciais no mapeamento de funções individuais de proteínas, bem como sua participação em outros eventos celulares, como sinalização de reposta e interação com outras moléculas. A aplicação dessa técnica em um organismo cujos constituintes proteômicos e genéticos são poucos definidos, é bastante útil para inferir funcionalidades dos mesmos através da conservação evolucionária de genes e também de domínios de proteínas entre espécies.

Figura 18- Eletroforese bidimensional de folhas de cana-de-açúcar, condição controle e condição tratada com 4mM Metil Violágeno após 24 horas de aplicação. Para a focalização isoeletrica (IEF) utilizou-se tiras pH 3-10, 18 cm e acumulou-se 24kVh ao final da corrida. A segunda dimensão (SDS-PAGE) foi feita em gel de poliacrilamida 12,5%

Figura 19- Imagem do programa ImageMaster 2-D Platinum, software para análise das imagens obtidas por meio do escaneamento dos géis. Os pontos vermelhos representam os spots detectados pelo programa em cada gel

Figura 20- Imagem do programa ImageMaster 2-D Platinum, mostrando uma identificação numérica para cada spot dos respectivos tratamentos. Esta identificação será correlacionada com a tabela localizada no item 7. ANEXOS

A análise dos géis pelo programa permitiu identificar alguns *spots* com maiores valores de volume e saliência, dois parâmetros utilizados para avaliar a intensidade do *spot*. Conforme esses parâmetros, no gel correspondente ao tratamento controle, podemos inferir que os *spots* 122 (pI 9,5 e MW 15,19 KD), 74 (pI 4,9 e MW 31,16 KD), 105 (pI 7,5 e MW 18,2 KD) e 22 (pI 5,4 e MW 59,6 KD) apresentaram, nesta ordem, maior intensidade que os demais (Figura 20; Tabela 1). Já no gel referente ao tratamento com Paraquat, os *spots* mais proeminentes foram, em ordem decrescente, os seguintes: 25 (pI 10,3 e MW 54,8 KD), 80 (pI 6,8 e MW 21,8 KD) e 48 (pI 10,3 e MW 30,58 KD).

Com relação à indução de spots pelo tratamento com Paraquat, a qualidade dos géis obtidos não permite uma afirmação precisa sobre isto, apenas podemos inferir que algumas proteínas tiveram sua síntese suprimida e/ou foram degradadas pelo tratamento com o herbicida (Figura 18).

Figura 21- Imagem do programa ImageMaster 2-D Platinum, software para análise das imagens obtidas por meio do escaneamento dos géis. Os pontos vermelhos representam os spots presentes somente em um gel e os verdes são aqueles spots comuns aos dois géis, ou seja, que foram relacionados por meio do 'match', uma ferramenta de sobreposição de géis pelo programa

O resultado mostrado na figura 19 permite visualizar que o gel correspondente ao tratamento controle apresentou maior quantidade de spots (129) que o tratamento de 4mM (93), segundo relatório emitido pelo programa. Este resultado está de acordo com o resultado de concentração de proteínas solúveis (Figura 12), em que ocorre uma redução na quantidade de proteínas das folhas de plantas de cana-de-açúcar tratadas com PQ. Esta é mais uma evidência da ação prejudicial do herbicida para a planta, a degradação de proteínas

Soares-Netto (2001) encontrou várias enzimas envolvidas na biossíntese de antioxidantes de baixo peso molecular que podem ser alvos para manipulação genética. A obtenção de plantas modificadas geneticamente que sintetizariam vitaminas C e E em altos níveis poderiam melhorar o valor nutricional e a tolerância a estresses de cana-de-açúcar. Os diversos componentes do sistema de defesa antioxidante interagem entre si e as suas sínteses devem ser muito bem reguladas. Fatores de transcrição envolvidos na regulação da resposta ao estresse oxidativo de bactérias, leveduras e de humanos diferem consideravelmente entre si e quando foram utilizados

para buscas no banco de dados do SUCEST, somente genes com similaridades fracas foram encontrados, sugerindo que estas proteínas não são muito conservadas.

As proteínas que são diferencialmente expressas em uma célula são dependentes da idade e condições fisiológicas do tecido. Existem diversas estratégias em proteômica que permitem identificar e quantificar proteínas com sensibilidade e rapidez, e estão sendo utilizadas em conjunto com análises de expressão gênica, a fim de predizer funções biológicas de certos genes envolvidos em eventos importantes, como divisão celular, respiração, fotossíntese, etc.

Dois procedimentos são mais comumente adotados: caracterização geral do proteoma com identificação do maior número possível de proteínas ou identificação apenas das proteínas diferencialmente expressas entre duas amostras com características diferentes, como no caso deste estudo, controle e tratado com Paraquat. Os spots de proteínas de interesse são submetidos à digestão enzimática e os fragmentos protéicos resultantes são analisados por espectrometria de massas. Walz et al., (2004) desenvolveram trabalho com proteínas expressas no floema de abóbora e pepino e verificaram a presença, por espectrometria de massas, de várias proteínas cujas funções estavam relacionadas com defesa. Entre estas proteínas, estavam algumas enzimas antioxidantes, como SOD, peroxidases, monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), e glutathione redutase.

No caso deste estudo, para haver identificação e comparação de proteínas expressas em cana-de-açúcar sob condições de estresse por Paraquat, seria necessário maior número de repetição dos resultados obtidos a fim de assegurar uma boa quantidade de proteínas para o processo subsequente, o sequenciamento por espectrometria de massas.

5 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, os resultados permitem concluir que:

- a) A variedade de cana-de-açúcar estudada sofreu danos intensos em seu sistema fotoquímico causados por doses acima de 4 mM de Metil Violágeno, 18 horas após a aplicação;
- b) Os danos fotooxidativos causados pelo o PQ geraram grandes danos oxidativos nas folhas indicados pelo o aumento na peroxidação de lipídeos;
- c) Os danos causados pelo PQ induziram uma progressiva redução nas concentrações de clorofilas a e b, a qual foi dependente da dose e dependente do tempo de exposição;
- d) O PQ causou intensa degradação de proteínas solúveis (citoplasmáticas?), mas não de proteínas insolúveis, indicada pelo método de Bradford e por SDS-PAGE;
- e) A eletroforese 2-DE confirmou a degradação ou menor expressão de diversas bandas peptídicas causadas por doses acima de 4 mM de MV;
- f) Interessantemente, as atividades de superóxido dismutase, tanto a total como a de suas isoformas, não foram afetadas pela a presença do MV, destacando-se a isoforma Mn/Zn-SOD localizada nos cloroplastos. De fato, a atividade específica total de SOD foi estimulada pelo tratamento com PQ;
- g) Ao contrário da resposta da atividade de SOD, a atividade de peroxidase de ascorbato foi drasticamente diminuída por doses acima de 4 mM de MV.

Em conjunto, o trabalho permite concluir que a variedade de cana-de-açúcar possui uma SOD cloroplástica extremamente resistente a ação do PQ, mas possuindo, entretanto, uma sensibilidade para remoção de espécies reativas de oxigênio ao nível da atividade de APX, provavelmente a isoforma localizada nos cloroplastos.

O melhoramento de espécies vegetais com a introdução de genes para maior expressão de APX resistente ao excesso de H_2O_2 parece ser promissor para a resistência ao Paraquat e outros herbicidas afins.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINETTO, D.; FLECK, N.G.; MENEZES, V.G. Herbicidas não seletivos aplicados na fase de maturação do arroz irrigado. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n.2, p. 277-285, 2001.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N. ; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1331-1341. 2002.
- AMSELLEM, Z.; JANSEN, M.; DREISENAAR, A.; GRESSEL, J. Developmental variability of photooxidative stress tolerance in paraquat-resistant *Conyza*, **Plant Physiology**. Rockville, v.103, p.1097-1106, 1994.
- AONO, M.; KUBO, A.; SAJI, H.; TANAKA, K.; KONDO, N. Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathione reductase activity. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.34, p. 129-135, 1993.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399. 2004.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v.24,n.1, p.1-15, 1949.
- ASADA, K. The Water-Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639.1999.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 391–396, 2006.
- ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis, in: KYLE, D.J.; OSMOND, C.D.; ARNTZEN, C.J. (Ed.), **Photoinhibition**. Amsterdam, p. 227–287, 1987.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J.; Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild-type and catalase deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v.104, p. 280-292, 1998.
- BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1607-1621, 2004.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v.44, n.1, p.276-287, 1971.

BENAVIDES, M.P.; GALLEG0, S. M.; COMBA, M.E.; TOMARO, M.L.; Relationship between polyamines and paraquat toxicity in sunflower leaf discs. **Plant Growth Regulation**, Berlin, v.31, p.215–224, 2000.

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, Berlin, v. 102, p. 425-432, 1995.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, Spec No, p. 179-194. 2003.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, Hoboken, v. 8, p.93-99, 1987.

BÖLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G.O. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BÖLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C.; LONG, S.P. **Photosynthesis and production in a changing environment**, London: Chapman & Hall, chap. 12, p. 193-206, 1993

BOWLER, C.; YAMAGATA, H.; NEUHAUS, G. ; CHUA, N. H. Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. **Genes & Development**, New York, v. 8, p. 2188-2202, 1994.

BOWLER, C.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**. Palo Alto, v. 13, n^o3, p. 199-218, 1994.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 246-254, 1976.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; RUSSELL, L. J. **Biochemistry and molecular biology of plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1367 p. Parte 1: Compartments. 2001.

BUTLER, W. L. Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.29, p.345-378, 1978.

CASANO, L.M.; MARTIN, M.; ZAPATA, J.M.; SABATER, B. Leaf age- and paraquat concentration-dependent effects on the levels of enzymes protecting against photooxidative stress. **Plant Science**, London, v.149, p.13–22, 1999.

CASANO, L.M.; TRIPPI, V.S. The effect of oxygen radicals on proteolysis in isolated Oat chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.33, p.329-332, 1992.

CAVALCANTI, F. R. **Atividade de enzimas antioxidativas e integridade de membranas em plantas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] submetidas ao estresse salino.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 2002. 62 p.

CAVALCANTI, F. R.; OLIVEIRA, J. T. A.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, New York, v. 163, p. 563 – 571, 2004.

CHANDRU, H.K.; KIM, E.; KUK, Y.; CHO K.; HAN, O. Kinetics of wound-induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential activation at different growth stages. **Plant Science**, London, v.164, p.935-941, 2003.

CHEN, C. C. S.; PLANT, A. L. Salt-induced protein synthesis in tomato roots: the role of ABA. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, p.677-687, 1999.

CHEN, H.-X.; GAO, H.-Y.; AN, S.-Z.; LI, W.-J. Dissipation of excess energy in mehl- peroxidase reaction in *rumex* leaves during salt shock. **Photosynthetica**, Berlin, v.42, n.1, p. 117-122, 2004.

CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J. K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p.225-236, 2004.

CNA- Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. www.cna.org.br. Acesso em: 20 Ago 2006.

CRITCHLEY, C. Photoinhibition. In: RAGHAVENDRA, A.S. **Photosynthesis: a comprehensive treatise**. Cambridge: Cambridge University Press. 1998. chap. 20, p. 264-272.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. IN: HEINZ, D.J. **Sugarcane improvement through breeding**. New York: Elsevier, 1987. 84p.

DASH, S.; MOHANTY, N. Evaluation of assays for the analysis of thermo-tolerance and recovery potentials of seedling of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Journal of Plant Physiology**, Oxford, v. 158, p.1153–1165, 2001.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. ; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, Oxford, v. 57, p. 779-795. 2000.

DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 34, p.1023-1028, 1993.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress., New York, v.15, n.4, p.316-328, 2005.

DEL RIO, L. A.; CORPAS, F. J.; SANDALIOS, L. M.; PALMA, J. M.; GOMEZ, M. ; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p. 1255-1272, 2002.

DEL RIO, L. A.; PASTORI, G. M.; PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F. J.; JIMENEZ, A.; LOPEZ-HUERTAS, E. ; HERNANDEZ, J. A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 1195-1200. 1998.

DEMMIG-ADAMS, ADAMS III, W.W; B.;ROSENSTIEL, T.N.; BRIGHTWELL, A.K.; EBBERT, V. O. Photosynthesis and photoprotection in overwintering plants.**Plant Biology**, Denver, v.4, p. 545-557, 2002.

DEVINE, M.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. Englewood Cliffs: PTR Prentice Hall, 1993. 441 p.

DONAHUE, J.L.; OKPODU, C.M.; CRAMER, C.; GRABAU, E.A.; ALSCHER, R.G. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves: relationships to resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v.113, p.249-257, 1997.

EKMEKCI, Y.; TERZIOGLU, S. Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 83, p.69–81, 2005.

ELSTNER, E. F.; Oxygen radicals: Biochemical basis for their efficacy. **Journal of Molecular Medicine**, New York, v. 69, n.21, p. 449-956, 1991.

EPE, B. Genotoxicity of singlet oxygen. **Chemical and Biological Interactions**, London, v. 80, n.3, p. 239-260, 1991.

FLECK, N. G.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores do fotossistema 2. In: VIDAL, R. A.; MEROTTO Jr., A. (Ed.). **Herbicidologia**, Porto Alegre: 2001. p. 100-112.

FLOWERS, T. J.; KOYAMA, M. L.; FLOWERS, S. A.; SUDHAKAR, C.; SINGH, K. P.; YEO, A. R. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 99-106. 2000.

FOYER, C. H.; MULLINEAUX, P. M. **Causes of Photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. CRC Press, Boca Raton, FL., 1994.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. **New Phytologist**, New York, v. 146, p.359-388, 2000.

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

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 28, p. 1056, 2005

FOYER, C.H.; DESCOURVIERES, P.; KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. **Plant, Cell and Environmental**, Oxford, v.17, p. 507–523, 1994.

FRACHEBOUD, Y. **Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis**.
<http://www.ab.ipw.agrl.ethz.ch/~yfracheb/flex.htm>. Acesso em: 8 jul. 2001

FRYER, M.J.; ANDREWS, J.R.; OXBOROUGH, K.; BLOWERS, D.A.; BAKER, N.R. Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p.571–580, 1998.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica Et Biophysica Acta**, Oxford, v.990, n.1, p.87-92, 1989.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v.59, p.309-314, 1977.

GROVER, A.; SAHI, C.; SANAN, N.; GROVER, A. Taming abiotic stresses in plants through genetic engineering: current strategies and perspective. **Plant Science**, New York, v. 143, p.101-111, 1999.

GUIDI, L.; TANINI, M.; SOLDATINI, G.F. Effects of high light and ozone fumigation on photosynthesis in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, New York, v.38, p.717–725, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, Oxford: Oxford University Press, 1989. 543 p.

HAVAUX, M. Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperatures. **Plant, Cell and Environment**, New York, v.16, n. 4, p.461-467, 1993.

HAVAUX, M.; NIYOGI, K.K. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, New York, v. 96, p. 8762-8767, 1999.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Oxford, v. 125, p.189-196, 1968.

HENRIQUES, J.A.P.; DAFRÉ, A.L.; PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI, L.A.; Barros, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**, Guaíba: Agropecuária, v.1, p. 227-252, 2001.

HENZLER, T. ; STEUDLE, E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 2053-2066, 2000.

HERNANDEZ, J. A.; FERRER, M. A.; JIMENEZ, A.; BARCELÓ, A. R.; SEVILLA, F. Antioxidant Systems and O₂⁻/ H₂O₂ Production in the Apoplast of Pea Leaves. Its Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 827-831, 2001.

HÉROUART, D.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Developmental and environmental regulation of the *Nicotiana plumbaginifolia* cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase promoter in transgenic tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v.104, p.873–880, 1994.

HESS, F. D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, Washington, v. 48, n. 2, p. 160-170, 2000.

HIDEG, E.; KÁLAI, T.; HIDEG, K.; VASS, I. Do oxidative stress conditions impairing photosynthesis in the light manifest as photoinhibition? **Philosophical Transactions of the Royal Society of Biological Sciences**, New York, v.355, n.140, p. 1511 – 1516, 2000.

HIROTSU, N.; MAKINO, A.; USHIO, A.; MAE, T. Changes in the Thermal Dissipation and the Electron Flow in the Water–Water Cycle in Rice Grown Under Conditions of Physiologically Low Temperature. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.45, n.5, p. 635-644, 2004.

HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C. F.; PRANGE, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds, **Planta**, Elstner, v. 207, n. 4. p. 604-611, 1999.

HOSSAIN, M.A.; ASADA, K. Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: its protection by ascorbate. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 25, p.1285–1295, 1984.

HUNER, N.P.A.; ÖQUIST, G.; SARHAN, F. Energy balance and acclimation to light and cold. IN: IANNELLI, M.A.; VAN BREUSEGEM, F.; VANMONTAGU, M.; INZE, D.; MASSACI, A. Tolerance to low temperature and paraquat-mediated oxidative stress in two maize genotypes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.50, p. 523–532, 1999.

INZE, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, New York, v. 6, p. 153-158, 1995.

ITURBE-ORMAETXE, I.; ESCUREDO, P.R.; ARRESE-IGOR, C.; BECANA, M. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p.173–181, 1998.

JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J. A.; DEL RIO, L. A.; SEVILLA, F. Evidence of the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.114, p.275-284, 1997.

KATO, M.C.; HIKOSAKA, K.; HIROTSU, N.; MAKINO, A.; HIROSE, T. The Excess Light Energy that is neither utilized in Photosynthesis nor Dissipated by Photoprotective Mechanisms Determines the Rate of Photoinactivation in Photosystem II. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.. 44, n.3, p. 318-325, 2003.

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*), **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.34, p.713-721, 1993.

KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 313-349, 1991.

KWAK, S-S.; KIM, S.K.; PARK, I-H.; LIU, J.R. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. **Phytochemistry**, New York, v.43, n^o. 3, p. 565-568, 1996.

KWON, S.Y.; JOENG, Y.J.; LEE, H.S.; KIM, J.S.; CHO, K.Y.; ALLEN, R.D.; KWAK, S.S. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. **Plant, Cell and Environmental**, Oxford, v.25, p.873–882, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. **Nature**, Washington, v. 227, p.680-688, 1970.

LAISK, A.; RASULOV, B.H.; LORETO, F. Thermoinhibition of photosynthesis as analyzed by gas exchange and chlorophyll fluorescence. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v.45, n.4, p.412-421, 1998.

LAMB, C., DIXON, R. A. The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251-275, 1997.

LASCANO, H. R.; MELCHIORRE, M.N.; LUNA, C.M.; TRIPPI, V. S. Effect of photooxidative stress induced by paraquat in two wheat cultivars with differential tolerance to water stress. **Plant Science**, Washington, v.164, p.841- 848, 2003.

LASCANO, H.R.; GIMENEZ, L.D.; CASANO, L.M.; TRIPPI, V.S. Changes in glutathione reductase activity and protein content in wheat leaves and chloroplasts exposed to photooxidative stress. **Plant Physiology and Biochemistry**. Oxford, v. 36, n.4, p. 311-329, 1998.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 2ª ed., São Paulo: Ed. Sarvier, 1995. 839p.

LEONARDIS S.; DIPIERRO N.; DIPIERRO S. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. **Plant Physiology and Biochemistry**, New York, v.38,n.10, p. 773-779, 2000.

LI, X.-G.; BI, Y.-P.; ZHAO, S.-J.; MENG, Q.-W.; ZOU, Q.; HE, Q.-W. Cooperation of xanthophyll cycle with water-water cycle in the protection of photosystems 1 and 2 against inactivation during chilling stress under low irradiance, **Photosynthetica**. Oxford v.43, n.2, p.261-266, 2005.

MAESTRI, E.; KLUEVA, N.; PERROTTA, C.; GULLI, M.; NGUYEN, H. T. ; MARMIROLI, N. Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. **Plant Molecular Biology**, Oxford, v. 48, p.667-681, 2002.

MAGALHÃES, P. C. Efeito de doses reduzidas de glyphosate e paraquat simulando deriva na cultura do milho. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 19, n. 2, p. 247-253, 2001

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; KARAM, D. Effectiveness of the desiccants Paraquat and Diquat in anticipating maize harvesting. **Planta Daninha**, Viçosa, v.20, n.3, p.449-455, 2002.

MAKINO, A.; MIYAKE, C.; YOKOTA, A. Physiological Functions of the Water–Water Cycle (Mehler Reaction) and the Cyclic Electron Flow around PSI in Rice Leaves. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 43, n.9, p. 1017-1026, 2002.

MANO, J.; OHNO, C.; ASADA K. Ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its assessment by in vivo electron spin resonance spectrometry. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.40, 1999.

MASCHER, R.; NAGY, E.; LIPPMANN, B.; HORNLEIN, S.; FISCHER, S.; SCHEIDING, W.; NEAGOE, A.; BERGMANN, H. Improvement of tolerance to paraquat and drought in barley (*Hordeum vulgare* L.) by exogenous 2-aminoethanol: effects on superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure. **Plant Science**, Washington, v.168, p. 691–698, 2005.

MCKERSIE, B.D.; BOWLEY, S.R.; JONES, K.S. Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p.839–847, 1999.

MCKERSIE, B.D.; MURNAGHAN, J.; JONES, K.S.; BOWLEY, S.R. Iron-superoxide dismutase expressing in transgenic alfalfa increases winter survival without detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.122, p.1427–1437, 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- MAPA.
<http://www.agricultura.gov.br>. Acessado em 10 jan. 2006.

MINKOV, I.N.; JAHOUBJAN, G.T.; DENEV, I.D.; TONEVA, V.T. Photooxidative stress in higher plants. IN: **Handbook of plant and crop stress**. Pessarakli, M. 2^a ed. New York. M. Dekker, 1999, 1254 p.

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

MIYAKE, C.; YOKOTA, A. Determination of the rate of photoreduction of O₂ in the water–water cycle in watermelon leaves and enhancement of the rate by limitation of photosynthesis. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.41, p.335–343, 2000.

MOLLER, I. M. Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Oxford, v. 52, p. 561-591, 2001.

MOLLOY, M. P.; HERBERT, B. R.; WALSH, B. J.; TYLER, M. I.; TRAINI, M.; SANCHEZ, J. C.; HOCHSTRASSER, D. F.; WILLIAMS, K. L.; GOOLEY, A. A. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis, **Electrophoresis**, Washington, v.19, p.837-844, 1998.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 22, p. 1068-1072, 1981.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.21, p.1295–307, 1980.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R. D. ; HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. **Journal Experimental Botany**. Oxford, v. 53, p. 1237-1247, 2002.

NOCTOR, G., FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Oxford, v. 49, p. 249-279, 1998.

OGAWA, K.; KANEMATSU, S.; ASADA K. Intra- and extra-cellular localization of “cytosolic” CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v.37, p.790–799, 1996.

OGAWA, K.; KANEMATSU, S.; ASADA K. Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. **Plant Cell Physiology**, Oxford v.38, p.1118– 1126, 1997.

OP DEN CAMP, R. G.; PRZYBYLA, D.; OCHSENBEIN, C.; LALOI, C.; KIM, C.; DANON, A.; WAGNER, D.; HIDE, E.; GOBEL, C.; FEUSSNER, I.; NATER, M. ; APEL, K. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in Arabidopsis. **Plant Cell**, New York, v. 15, p. 2320- 2332, 2003.

ORT, D.R. When there is too much light. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p. 29-32, 2001.

OSMOND, C.B. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of sun and shade plants. In: BAKER, N.R.; BOWYER, J.R. **Photoinhibition and photosynthesis: from molecular mechanisms to the field**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1994, cap.. 1, p.1-24.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B.; MOHANTY, P. Investigations on the antioxidative defence responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes, **Plant Growth Regulation**, New York, p. 1-14, 2004.

PAULSEN, H. Chlorophyll a/b- binding proteins. **Photochemistry and photobiology**, Washington, v.62, p.367-382. 1995.

PAYTON, P.; ALLEN, R.D.; TROLINDER, N.; HOLADAY, A.S. Overexpression of chloroplast-targeted Mn superoxide dismutase in cotton (*Gossypium hirsutum* L., cv. Coker 312) does not alter the reduction of photosynthesis after short exposures to low temperature and high light intensity, **Photosynthesis Research**, Washington, v.52, p.233–244, 1997.

PEIXOTO, P. H. P. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.11, n.3, p.137-143, 1999.

PEIXOTO, P. H. P. **Peroxidação de lipídios em membranas de tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) com tolerância diferencial ao alumínio**, Tese de Doutorado em Ciências Agrárias – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998. 95p.

PELTIER, J.B. Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. **Plant Cell**, New York, v.14, p.211-236, 2002.

PERL, A.; PERL-TREVES, R.; GALILI, S.; AVIV, D.; SHALGI, E.; MALKIN, S.; GALUN, E. Enhanced oxidative stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu,Zn superoxide dismutases. **Theoric Applied Genetics**, New York, v. 85, p.568-576, 1993.

PITCHER, L.H.; ZILINSKAS, B.A. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. **Plant Physiology**, Rockville, v.110, p. 583-588, 1996.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v.126, p.445-462, 2001.

PROCÓPIO, S.O.; SILVA, A.A.; VARGAS, L.; FERREIRA, F.A. **Manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2003. 150p.

- PRZYMUSINSKI, R.; RUCINSKA, R.; GWOZDZ, E.A. Increased accumulation of pathogenesis-related proteins in response of lupine roots to various abiotic stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 485-495, 2005.
- RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoretic analysis, **Electrophoresis**, New York, v.17, p.813-829, 1996.
- REKIK, D.; MONNEVEUX, P.; HAVAUX, M. The *in vivo* tolerance of photosynthetic membranes to high and low temperatures in cultivated and wild wheats of the *Triticum* and *Aegilops* genera. **Journal of Plant Physiology**, Washington, v.150, p. 734–738, 1997.
- RIBEIRO, R.V. **Variação sazonal da fotossíntese e relações hídricas de laranjeira ‘Valência’**. Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal. Escola Superior de gricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.. Piracicaba, 2006. 156p.
- RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Denver, v. 62, p. 167-173, 2003.
- RODRIGUES, M. A. A. **Definição e ocorrência de fotoinibição**. <http://www.iq.ufrj.br/~almenara/fotoinibicao.html>. Acesso em 23 Jul. 1998.
- SANDMANN, G.; SCHEER, H. Chloroplast pigments: chlorophylls and carotenoids. IN: **Photosynthesis, a comprehensive treatise**. Raghavendra, A.S (Editor), New York, Cambridge University press. 376 p.1998.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, p.7-12, 1993.
- SCHMIDT, T. **Australian Journal of Agriculture**, Canberra, v.45, p.547-564, 1994.
- SCHMITZ-EIBERGER, M.; NOGA, G. Reduction of paraquat induced oxidative stress in *Phaseolus vulgaris* and *Malus domestica* leaves by α -tocopherol. **Scientia. Horticulture**, Oxford, v.91, p.153–167, 2001.
- SCHREIBER, U.; BILGER, W.; HORMANN, H.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: RAGHAVENDRA, A.S. **Photosynthesis: a comprehensive treatise**. Cambridge: Cambridge University Press, cap. 24, p. 320-336. 1998.
- SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, Washington, v.10, n.1, p.51-62, 1986.
- SEN GUPTA, A.; WEBB, R.P.; HOLADAY A.S.; ALLEN, D.R. Over-expression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. Induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase over-expressing plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.103, p.1067-1073, 1993.

SEPPANEN, M.M.; MAJAHARJU, M.; SOMERSALO, S.; PEHU, E. Freezing tolerance, cold acclimation and oxidative stress in potato: Paraquat tolerance is related to acclimation but it s a poor indicator of freezing tolerance. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v.2, p. 454–460, 1998.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOUSHIKAWA, K. Regulation and Function of Ascorbate Peroxidase Isoenzymes. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1305- 1319, 2002.

SINDICATO DAS INDÚSTRIS DE DEFENSIVOAS AGRÍCOLAS-SINDAG.
<http://www.sindag.com.br>, acessado em: 15 jun. 2001.

SLESACK, I.; MISZALSKI, Z.; KARPINSKA, B.; NIEWIADOMSKA, E.; RATAJCZAK, R.; KARPINSKI, S. Redox control of oxidative stress responses in the C₃-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, New York, v.40,n.6, p. 669-677, 2002.

SLOOTEN, L.; CAPIAU, K.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; SYBESMA, C.; INZE, D. Factors effecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in chloroplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, p. 737– 750, 1995.

SMITH, D. **Weed Control Practices in US Sugarcane**, Texas A&M University, Department of Soil and Crop Sciences, Technical Report 98-03, Dez,1997.

SOARES NETTO, L. E. Oxidative stress response in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 24, p.93-102, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS – SBCPD.
Procedimentos para instalação, avaliação e análise de experimentos com herbicidas. Londrina, 1995, 42 p.

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

STRELLER, S.; WINGSLE, G. *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular CuZn-superoxide dismutase. **Planta**, Oxford, v.192, p.195–201, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, Porto Alegre: Artmed, 2004. p.449-484.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVA, E.; DAT, J. F. ; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, New York,v. 161, p. 405-414, 2001.

VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutases causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants, IN: C.H. Foyer and P.M. Mullineaux (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1994, p. 317-341.

- VARGAS, L.; SILVA, A.A. da; BORÉM, A.; REZENDE, S.T.; FERREIRA, F.A; SEDIYAMA, T. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**, Viçosa: Jard, 1999. 131p.
- VETTORE, A.L.; da SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries tha made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Oxford, v.24, p.1-7, 2001.
- VICTORIA FILHO, R; CHRISTOFFOLETI, P.J. Manejo de plantas daninhas e produtividade da cana-de-açúcar. **Visão Agrícola**, Piracicaba, p.32-37, 2004.
- VRANOVÁ, E.; INZE, D. ; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1227-1236, 2002.
- WALKER, D.A. Excited leaves. **New Phytologist**, Oxford, v. 121, p. 325-345, 1992.
- WALZ, C.; GIAVALISCO, P.; SCHAD, M.; JUENGER, M.; KLOSE, J.; KEHR, J. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. **Phytochemistry**, Oxford, v.65, p. 1795–1804, 2004.
- WALZ. **Portable chlrophyll fluorometer PAM-2000 and data aquisition software DA-2000**. Effeltrich: Walz Mess-und Regeltechnik, 1993. 199p.
- WANG, W. X.; VINOCUR, B. ; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Oxford, v. 218, p.1-14, 2003.
- WRIGHT, D.P.; BALDWIN, B.C.; SHEPHARD, M.C.; SCHOLLES, J.D. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, New York, v.47, n.4, p.255-267, 1995
- WU, G.; WILEN, R. W.; ROBERTSON, A. J. ; GUSTA, L. V. Isolation, Chromosomal Localization, and Differential Expression of Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase and Chloroplastic Copper/Zinc Superoxide Dismutase Genes in Wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 513-520, 1999.
- XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J.K. Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. **The Plant Cell**, Oxford, vol. 14, p.165-183, 2002.
- YAKES, F.M., VAN HOUTEN, B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proceedings. National. Academic. Science**, Whashington, USA, v. 94, p 514-519, 1997.
- YEN, H. E.; EDWARDS, G. E. ; GRIMES, H. D. Characterization of a salt-responsive 24-kilodalton glycoprotein in *Mesembryanthemum crystallinum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p.1179-1187, 1994.

ZHAO, Z. Q.; ZHU, Y.G.; KNEER, R.; SMITH, S.E. Effect of zinc on cadmium toxicity-induced oxidative stress in winter wheat seedlings. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.28, p. 1947-1959, 2005.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review Plant Biology**, Oxford, v. 53,p. 247-273, 2002.

ZHU, J-K. Plant Salt Tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 6, p.66-71, 2001

ANEXOS

Tabela 1- Relação dos *spots* do gel 2-D da amostra não-tratado (Controle), identificados pelo programa ImageMaster 2-D Platinum, conforme mostrado na figura 20, mostrando seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MW), intensidade percentual normalizada (%Intens) e volume percentual normalizado (%Vol)

SpotID	pI	MW	%Intens.	%Vol	SpotID	pI	MW	%Intens.	%Vol
4	5,13	95,69	1,49	2,47	73	7,83	33,19	0,38	0,36
5	7,43	85,00	0,21	0,27	74	4,97	31,16	3,27	7,61
6	4,56	75,13	2,36	1,96	75	4,61	31,55	1,14	1,33
7	5,80	74,52	0,56	0,21	76	4,79	31,16	2,85	2,97
8	5,93	74,21	1,59	0,59	77	3,86	32,36	0,24	0,35
9	6,08	73,91	1,59	0,51	78	3,93	30,00	0,49	0,28
10	5,37	68,35	0,31	0,11	81	4,16	27,66	0,28	0,15
11	5,52	67,51	0,35	0,17	83	4,57	24,83	0,31	0,28
12	4,72	65,87	0,45	0,43	84	4,75	24,61	0,49	0,63
13	5,86	65,60	0,31	0,26	85	9,22	24,83	0,49	0,32
14	5,71	65,60	0,24	0,11	86	7,57	24,61	0,21	0,09
15	6,13	64,79	0,35	0,12	89	3,91	22,89	0,63	0,31
16	4,36	64,26	0,31	0,23	91	4,72	22,49	0,94	0,81
17	6,08	62,18	0,35	0,26	92	5,38	22,49	0,49	0,33
18	6,38	61,42	0,59	0,39	93	5,18	22,28	0,35	0,33
19	5,09	60,42	0,28	0,26	94	4,59	22,08	1,05	0,79
20	6,69	60,66	2,05	1,25	95	6,28	21,89	0,42	0,24
21	5,65	60,17	0,56	0,32	96	3,86	20,00	0,42	0,30
22	5,47	59,67	3,20	2,62	97	8,21	19,56	0,28	0,11
23	7,19	60,17	0,42	0,49	98	3,86	19,27	0,31	0,36
24	6,06	59,43	0,35	0,13	99	4,49	19,06	0,31	0,25
25	4,04	57,98	0,24	0,22	100	5,53	18,92	0,21	0,27
26	6,56	57,27	0,31	0,20	101	6,67	18,85	0,38	0,13
27	4,41	56,34	0,56	0,33	102	4,79	18,64	0,42	0,30
29	9,60	54,51	0,24	0,38	103	6,33	18,64	3,03	1,86
30	7,58	53,62	0,28	0,46	104	8,53	18,71	0,21	0,15
31	7,83	53,84	0,84	1,32	105	7,50	18,23	3,06	5,01
32	8,05	53,40	2,85	3,14	106	4,29	17,69	0,77	0,62
33	5,80	52,53	0,49	0,25	108	4,74	17,69	0,17	0,14
34	5,93	52,53	0,49	0,21	109	4,16	17,50	0,49	0,45
35	6,33	51,67	0,63	0,38	110	7,58	17,43	0,31	0,21
36	6,19	51,46	0,56	0,17	111	6,77	17,30	1,49	0,85
37	4,95	49,69	0,94	0,61	112	4,64	17,24	0,31	0,15
38	4,29	49,06	0,45	0,44	113	7,75	17,24	0,24	0,17
39	6,13	47,84	0,59	0,41	114	6,77	16,67	0,73	0,42
40	5,09	48,75	0,31	0,34	115	4,70	16,30	0,28	0,22
41	5,37	47,24	0,35	0,31	116	4,29	15,94	0,52	0,95
42	7,09	47,24	0,24	0,15	117	8,39	15,89	0,77	0,65
43	5,50	46,06	0,28	0,18	119	6,26	15,36	0,70	0,83
44	5,70	45,78	0,35	0,22	120	6,51	15,36	0,45	0,46
45	7,53	46,06	0,63	0,18	122	9,54	15,19	2,92	9,88
46	4,79	44,92	1,01	1,02	123	7,25	15,08	1,07	0,82
47	4,92	44,35	0,77	0,44	124	4,27	15,08	0,52	0,37
48	4,59	41,91	0,73	0,45	125	4,84	15,14	0,91	0,58
49	6,84	41,38	0,24	0,24	126	6,94	15,08	0,28	0,29
50	7,65	40,10	0,21	0,25	127	8,92	14,97	2,75	4,74
51	6,59	41,38	0,38	0,18	128	8,49	14,97	1,56	2,83
52	8,54	40,86	0,80	0,67	129	4,29	14,64	0,56	0,42
54	7,43	40,61	0,52	0,29	130	5,93	14,32	0,35	0,26
55	4,90	40,61	0,21	0,14	132	3,76	14,21	2,99	3,59
56	8,83	39,59	0,73	0,46	134	9,47	14,10	2,82	6,78
59	6,59	38,85	0,56	0,28	135	4,64	14,00	0,84	0,65
60	5,78	36,94	0,28	0,19	136	5,02	13,95	2,82	1,79
61	6,13	36,48	1,98	0,94	137	5,61	13,79	1,52	0,94
62	6,59	36,25	0,28	0,33	141	4,70	136,53	0,28	0,15
63	4,94	35,35	0,87	0,50	142	7,34	40,10	0,21	0,04
64	7,12	35,57	0,28	0,19	144	5,30	59,92	0,56	0,45
65	5,18	35,12	0,63	0,42	145	3,86	30,96	0,49	0,33
66	8,49	35,35	0,35	0,32	146	5,83	20,55	0,24	0,09
67	5,37	34,90	0,24	0,22	147	5,83	19,63	0,21	0,09
68	7,70	35,12	0,28	0,14	148	5,32	24,39	0,24	0,09
69	5,52	34,25	0,38	0,22	149	5,09	24,17	0,31	0,14
70	6,57	34,03	0,38	0,33	150	6,13	35,57	1,17	0,41
71	8,54	33,61	0,31	0,26	151	7,39	54,51	1,24	0,19
72	7,14	33,40	1,10	0,50					

Tabela 2: Relação dos *spots* do gel 2-D da amostra tratada com PQ 4mM, identificados pelo programa ImageMaster 2-D Platinum, conforme mostrado na figura 20, mostrando seus respectivos pontos isoelétricos (pI), massas moleculares (MW), intensidade percentual normalizada (%Intens) e volume percentual normalizado (%Vol)

SpotID	pI	MW	%Intens.	%Vol	SpotID	pI	MW	%Intens.	%Vol
10	4,67	90,46	1,32	1,29	73	6,19	25,44	0,25	0,21
16	4,56	72,03	1,42	0,51	74	8,27	23,15	0,40	0,16
17	10,32	70,65	3,91	0,49	75	7,99	22,61	0,18	0,06
22	6,13	58,43	0,29	0,41	76	4,15	22,50	1,06	1,41
23	4,22	57,02	0,40	0,85	77	5,03	22,50	0,36	0,37
24	4,98	55,92	1,12	0,84	78	5,59	22,29	2,94	2,34
25	10,32	54,85	4,13	3,53	79	4,54	22,19	0,47	0,64
26	10,32	52,75	4,09	1,49	80	6,87	21,87	3,15	4,90
28	7,26	50,74	0,50	0,76	81	4,12	20,57	0,47	0,83
30	7,47	50,74	1,13	1,17	82	4,51	20,57	0,94	1,08
32	10,32	50,00	3,73	0,56	84	5,16	19,90	0,25	0,27
33	4,59	47,61	0,22	0,27	85	6,22	20,48	1,32	0,71
34	5,16	47,87	0,32	0,34	86	7,20	20,38	0,18	0,10
35	5,75	47,61	0,65	0,41	88	6,22	19,49	0,36	0,22
37	10,32	47,36	4,13	0,62	90	6,82	18,32	0,25	0,23
38	4,18	44,37	0,58	1,08	91	7,84	18,13	0,40	0,27
39	5,56	44,13	0,22	0,25	92	4,10	17,40	1,68	2,65
40	6,47	44,13	0,22	0,11	93	9,25	17,49	1,13	3,06
41	10,32	44,13	4,16	1,49	94	5,63	17,22	0,83	1,00
42	4,59	41,57	0,40	0,60	95	5,93	17,04	0,36	0,50
43	10,32	41,79	3,98	1,36	96	9,01	17,31	1,13	2,10
45	6,18	39,37	0,22	0,25	98	6,76	16,95	1,10	1,00
46	7,13	38,73	0,18	0,25	99	7,86	16,95	0,36	0,30
47	7,97	39,15	0,65	0,44	100	8,83	16,78	3,01	3,64
48	10,32	39,58	4,16	2,56	102	4,54	16,60	0,86	1,16
49	5,98	39,15	0,43	0,23	103	8,07	16,43	1,35	0,63
50	6,87	38,94	0,40	0,32	106	7,49	15,61	0,22	0,26
51	7,57	38,73	0,22	0,26	108	3,99	15,69	2,90	2,81
52	8,25	38,52	0,36	0,22	109	9,22	15,53	2,97	3,60
53	4,56	38,73	0,54	0,46	111	9,03	15,45	2,90	4,18
54	5,97	37,49	0,40	0,23	115	4,47	14,82	2,00	1,99
55	5,24	35,31	0,29	0,29	119	9,04	14,22	0,97	2,25
56	5,98	35,51	0,25	0,22	125	8,85	13,43	1,50	2,58
57	5,53	35,12	1,46	0,86	126	7,99	13,30	0,72	0,72
58	4,15	34,37	0,58	1,11	128	7,50	13,02	1,96	1,21
59	4,62	34,18	0,50	0,89	138	5,54	71,68	0,29	0,06
60	5,97	33,26	0,29	0,27	139	5,40	71,68	0,47	0,06
61	6,48	33,26	0,61	0,30	140	5,17	63,78	0,36	0,09
62	4,18	31,16	0,90	2,20	141	5,03	63,78	0,22	0,05
63	4,64	30,49	3,30	15,16	142	8,74	47,36	0,29	0,09
66	6,21	29,03	0,25	0,11	143	7,80	47,61	0,32	0,06
67	8,85	27,82	0,50	0,24	144	4,51	18,60	0,43	0,73
68	4,56	27,17	0,32	0,53	145	6,99	56,20	0,47	0,08
69	8,09	26,54	0,25	0,09	146	5,54	55,11	0,29	0,05
70	4,51	25,32	0,47	1,52	147	6,09	51,48	0,25	0,06
71	4,13	25,44	0,72	1,39	148	5,80	55,38	0,18	0,04
72	5,71	25,44	0,36	0,33					