

FLÁVIA DIAS SUASSUNA

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE H⁺-ATPases E
INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS CELULARES EM DOIS
GENÓTIPOS DE BANANEIRA (*Musa spp*) SUBMETIDOS A
ESTRESSE SALINO**

**RECIFE - PE
2007**

FLÁVIA DIAS SUASSUNA

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE H⁺-ATPases E INTEGRIDADE DAS
MEMBRANAS CELULARES EM DOIS GENÓTIPOS DE BANANEIRA
(*Musa spp*) SUBMETIDOS A ESTRESSE SALINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Botânica, com área de concentração em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Profa. Dr^a Lilia Gomes Willadino (UFRPE)

Co-orientadores: Profa. Dr^a Terezinha Rangel Camara (UFRPE)

Prof. Dr. Ricardo Enrique Bressan-Smith (UENF)

RECIFE - PE

2007

FLÁVIA DIAS SUASSUNA

**MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE H⁺-ATPases E
INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS CELULARES EM DOIS
GENÓTIPOS DE BANANEIRA (*Musa spp*) SUBMETIDOS A
ESTRESSE SALINO**

Banca Examinadora:

Profa. Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto
(Universidade Federal Rural de Pernambuco) - Titular

Profa. Dr^a Eliana Akie Simabukuro
(Universidade Federal de São Carlos) - Titular

Dr^a Eline Waked Ferreira Gomes
(Instituto Pernambucano de Pesquisa Agropecuária – IPA) - Titular

Prof. Dr. Arnóbio Gonçalves de Andrade
(CETENE – UFPE) - Suplente

RECIFE – PE

2007

Dedico a meus pais e irmãos, a meu bebê e
a Márcio.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço, primeiramente, a DEUS por ter me dado a vida e por sempre me guiar pelos caminhos por mim escolhidos.
- ❖ Agradeço à minha família (Lourdes, Nelson, Fernanda, Nelsinho, Nilton, Laís e Lucas) por todo o amor, dedicação e incentivo que sempre me deram.
- ❖ Agradeço, de coração, à minha orientadora Lilia Willadino pelo apoio, incentivo, broncas, elogios e principalmente a amizade que me dedicou nestes dois anos e vai continuar me dedicando nos próximos anos da minha vida.
- ❖ À minha co-orientadora e amiga Terezinha Camara, por todas as festinhas, risadas e brincadeiras, e, claro, por todos os ensinamentos durante o mestrado. Pode me aguardar que eu voltarei.
- ❖ À todos que fazem e fizeram parte do LCTV (Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais) e, principalmente, ao meu amigo e companheiro Wellington (gatinho) por todos os conselhos, brincadeiras e conversas durante esse tempo.
- ❖ Agradeço ao Professor Ricardo Bressan-Smith por todos os ensinamentos e por tudo que aprendi sobre ATPases e Estresse oxidativo.
- ❖ À todos que conheci no tempo que passei na UENF (Universidade Estadual do Norte Fluminense), principalmente a Mirrella Pupo Santos, por todo o companheirismo, ajuda e amizade. Obrigada Diva.
- ❖ À todos da minha turma de mestrado do ano de 2005, principalmente a André, Carol, Clarissa, Elifábia, Luíza, Luciana, Joãozinho (criatura nefasta de todas as horas) e Priscila.
- ❖ À todos os professores do PPGB que contribuíram para a minha formação.
- ❖ Á Ariadne Moura e Carmem Zickel, então coordenadora e vice do PPGB no ano de 2005. Bem como á Dona Margarida. Simone e Seu Mano, por toda ajuda que me deram.
- ❖ À família que conheci aqui na UFRPE e que nunca esquecerei. Meu pai Gileno, meu tio Léo e minhas irmãs: Aurinha, Claudinha (Biri), Nanda e Celly. Amo muito vocês.
- ❖ À todos que conheci durante esses dois anos de Rural. Principalmente à Ricardo por toda a força que deu nos meus momentos mais difíceis, valeu Rico.

- ❖ Às criaturas nefastas do dia, da tarde, da noite e de todas as horas: Alexandre, Celly, Dani Dark e Joãozinho.
- ❖ À CAPES pela ajuda financeira durante esses dois anos.
- ❖ Ao PPGB, por se tornar minha segunda casa.
- ❖ Aos que fizeram parte da banca examinadora desta dissertação.
- ❖ E, por último, à Márcio, por esse presente maravilhoso que ele me deu que é o meu filho, atual razão da minha vida.
- ❖ Obrigada!!!

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1 – Introdução

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - Aspectos da planta

2.1.1 – Origem e distribuição geográfica da bananeira

2.1.2 - Estrutura da planta e Classificação botânica

2.1.3 - Importância econômica

2.2 - Salinidade

2.2.1 - Efeitos sobre as plantas

2.3 - Bombas protônicas

2.3.1 - H⁺-ATPase de membrana plasmática

2.3.2 - H⁺-ATPase do tonoplasto

2.3.3 - H⁺-ATPase mitocondrial

2.3.4 – Bombas de prótons X Estresse salino

2.4 - Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS)

3- Referências Bibliográficas

Capítulo 1: Manuscrito a ser enviado ao Brazilian Journal of Plant Physiology

Modulação da atividade de H⁺-ATPases e integridade das membranas celulares em dois genótipos de bananeira (*Musa* spp) submetidos a estresse salino

INTRODUÇÃO

MATERIAS E MÉTODOS

Preparação da fração microssomal

Dosagem de proteínas

Determinação da atividade ATPásica de tonoplasto e de membrana plasmática

Peroxidação lipídica

Determinação da integridade membranar

RESULTADOS

DISCUSSÃO

REFERÊNCIAS

Legenda das figuras

Figuras

Considerações Finais

Anexo (Normas do Brazilian Journal of Plant Physiology para envio de trabalhos)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Atividade da P-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Berlin) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h

Figura 2: Atividade da P-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Thap Maeo) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h

Figura 3: Atividade da V-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Berlin) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h

Figura 4: Atividade da V-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Thap Maeo) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h

Figura 5: Atividade da F-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Berlin) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h

Figura 6: Atividade da F-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Thap Maeo) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h

Figura 7: Peroxidação Lipídica em raiz de *Musa* spp (genótipo Berlin) submetida à salinidade por 24, 48 e 72h , medida pela concentração de Malondialdeido (MDA)

Figura 8: Peroxidação Lipídica em raiz de *Musa* spp (genótipo Thap Maeo) submetida à salinidade por 24, 48 e 72 h, medida pela concentração de Malondialdeido (MDA)

Figura 9: Extravasamento de eletrólitos, medido pela porcentagem de integridade relativa das membranas de raízes de dois genótipos de *Musa* spp submetidos a tratamento com 50 mM de NaCl por 24, 48 e 72 h

RESUMO

Suassuna, Flávia Dias Ms.; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Modulação da atividade de H^+ -ATPases e integridade das membranas celulares em dois genótipos de bananeira (*Musa* spp) submetidos a estresse salino; Lilia Gomes Willadino, Terezinha Rangel Camara, Ricardo Enrique Bressan Smith.

A bananicultura é uma atividade de importância econômica e social em todo o mundo. O Brasil é o segundo maior produtor de banana, com 6,7 milhões de toneladas. O Nordeste é a região de maior produção, correspondendo a 30,65% de área plantada com bananeira no país. Em termos de produtividade nacional, o estado de Pernambuco é o sexto colocado com produção de 360 mil toneladas de banana. A baixa produtividade da cultura, em Pernambuco, deve-se, entre outros fatores, a condições de estresse salino vigentes na região do semi-árido. No Brasil, apesar da importância da cultura da bananeira, são poucos os trabalhos de pesquisa envolvendo os efeitos do estresse salino nesta espécie. O aumento da produtividade e da qualidade da banana, através da introdução de materiais tolerantes, tende a favorecer o aumento nas exportações do produto e contribuir para a superação das disparidades regionais. O estresse salino induz distúrbios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos nas plantas. Nas células vegetais, as propriedades físicas e químicas das membranas celulares podem ser alteradas pelo estresse salino. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de H^+ -ATPases e a integridade das membranas celulares em dois genótipos de bananeira, Berlin, sensível ao NaCl, e Thap Maeo, tolerante, utilizando como indicadores, para este último, a peroxidação lipídica e o extravasamento de eletrólitos. Utilizaram-se plantas de bananeiras, dois níveis de sal (0 e 50 mM de NaCl) e quatro tempos de coleta (0, 24, 48 e 72 horas). Para obter as atividades das H^+ -ATPases, a fração microsomal foi isolada de primórdios radiculares por centrifugação diferencial e as atividades determinadas pela quantidade de P_i liberado. A peroxidação de lipídios foi feita medindo-se o conteúdo de malondialdeído (MDA) em extratos de tecido de raiz. A determinação da integridade das membranas celulares (PIR) foi realizada a partir de discos e determinadas por condutividade elétrica. Os resultados demonstraram que o genótipo Thap Maeo, tolerante ao sal, manteve a atividade da P-ATPase similar ao controle, garantindo o gradiente de H^+ para a extrusão de Na^+ . Em relação a concentração de MDA, no genótipo Berlin, sensível ao NaCl, houve maior peroxidação nas plantas tratadas até as 48h, enquanto que no genótipo Thap Maeo, tolerante, observou-se valores similares ao controle. O extravasamento de eletrólitos não refletiu diferença entre os tratamentos nem entre os genótipos.

ABSTRACT

Suassuna, Flávia Dias Ms.; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Modulation of H⁺-ATPases activity and the cell membranes unity in two banana's genotip (*Musa* spp) submitted to salt stress; Lilia Gomes Willadino, Terezinha Rangel Camara, Ricardo Enrique Bressan Smith.

The banana cultivate is one important economic and social activity around the world. Brazil is the second greater banana producer country of the world, with 6,7 millions ton by year. The north west region is the greater producer with 30,65 % banana planted area of the country. In national productivity, Pernambuco's state is the 6th with 360 thousand banana's ton by year. In Pernambuco's state, the low productivity is because, between other facts, the condition of salt-stress in banana's specie. The better banana's quality and productivity, tolerable by materials introduction, make sense to increase the product's exportations and contribute for the increase the region disparities. The salt-stress induce morphological, physiological and biochemical plants disturbs. On vegetable cell, the physical and chemical properties' membranes cell can be modified by salt-stress. The aim of the work was evaluated the H⁺-ATPases and the cell membranes unity in two banana's genotip, Berlin, sensitive to NaCl and the Thap Maeo, tolerant, using for the last the lipid peroxidation and electrolyte leakage. At banana's plant were used two salt levels (0 and 50 MM NaCl) and four collect times (0, 24, 48 and 72 hours). To get the activities H⁺-ATPases the microsomal fraction was isolated young roots, and centrifugated it, and the activities by the liberate Pi quantity. The lipid peroxidation was done by measure the malondialdeid concentration (MDA) in the tissue roof. The cell membrane unity was determined (PIR) with leaves discs by electronic conductivity. The results showed the genotip Thae Maeo salt tolerating were the P-ATPases had similar activity control, got the H⁺ gradient from Na⁺ exclusion. In relation to MDA concentration, the Berlin genotip, NaCl sensitive, there was great peroxidation on the treated plants until 48 hours, however the genotip Thae Maeo tolerant there was similar values control. There wasn't differences between the electrolyte leakage neither than genotip treatment.

1- INTRODUÇÃO

A cultura da banana é explorada na grande maioria dos países tropicais, sendo uma das frutas mais consumidas no mundo (IBGE, 2002).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de banana, apresentando produção em torno de 6,7 milhões de toneladas desta fruta, que é cultivada em todas as regiões fisiográficas do país, possuindo uma elevada importância social e econômica (FAO, 2005). Na região Nordeste, a bananicultura é uma das principais explorações agrícolas entre as fruteiras, assumindo importância fundamental por seu valor na alimentação, na fixação de mão-de-obra no meio rural e por gerar divisas para o país. Porém, grande parte do solo desta região, mais precisamente nas áreas irrigadas das zonas semi-áridas, encontra-se salinizado, devido ao manejo inadequado do solo e da água (Santos e Gheyi, 1993).

De acordo com a FAO (2005), a nível global, o problema da salinidade ocorre em 397 milhões de hectares. Dos 230 milhões de hectares irrigados, 45 milhões estão salinizados. Segundo Moura (2000), no Brasil, principalmente na região Nordeste, cerca de 30% das áreas de projetos públicos de irrigação estava com problemas de salinidade. No perímetro irrigado de São Gonçalo-PB, cerca de 40% da área irrigada era salinizada. Já o município de Custódia/PE apresentava 70% do perímetro irrigado salinizado. Na região do pólo Petrolina-PE/Juazeiro-BA, que contava com seis perímetros de irrigação, em uma área de 38.917 ha, observava-se que aproximadamente, 20% da área apresentava reduções na produção agrícola e diminuição da área total irrigada devido à salinização do solo.

O melhoramento genético da bananeira em todo o mundo enfoca, sobretudo, os aspectos de resistência a pragas e doenças (Crouch et al., 1998). A questão da tolerância à

salinidade não era amplamente estudada nos anos 90 (Shannon, 1997), assim, regiões que enfrentavam o problema cultivavam, indiscriminadamente, genótipos de bananeira sem o conhecimento de sua tolerância. Desta forma, a produtividade e a qualidade do produto ficavam aquém do potencial da cultura e limitavam o desenvolvimento regional, além de haver redução na produção por abandono das áreas salinizadas. Uma das estratégias que promoveram a reincorporação de áreas salinizadas e o aumento da produtividade consistiu no desenvolvimento e na seleção de genótipos tolerantes, o que vem sendo feito nos últimos anos.

A seleção e avaliação quanto à tolerância à salinidade exigem um amplo e aprofundado conhecimento dos mecanismos envolvidos no processo (Willadino e Camara, 2005).

Trabalhos prévios do grupo (Gomes et al., 2004) apontam a exclusão do sódio como estratégia presente nos genótipos tolerantes e, ausente nos sensíveis. O movimento seletivo e a redistribuição de íons e pequenas moléculas orgânicas é essencial para o crescimento e homeostase da célula vegetal. O controle do transporte desses íons e moléculas, através da membrana plasmática e endomembranas dos diferentes compartimentos celulares, é desempenhado por proteínas de membrana que constituem canais, carreadores e bombas iônicas. Esses sistemas possibilitam não somente o trânsito de metabólitos nessas membranas, como também estabelecem e mantêm gradientes iônicos que são essenciais para vários processos metabólicos (Chasan e Schroeder, 1992; Taiz e Zeiger, 2004).

Mudanças nas condições ambientais, como salinidade, temperaturas extremas, intensidade luminosa, metais pesados, seca, infecção por patógenos, podem conduzir ao estresse oxidativo com prejuízos às células vegetais (Prasad et al., 1994; Sgherri e Nawari-Izzo, 1995; Alscher et al., 1997; Vitória et al., 2001).

Um aspecto comum a todas essas condições de estresse é o aumento da produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), com o concomitante aumento de substâncias e enzimas antioxidantes (Alscher et al., 1997), sugerindo que o sistema de defesa antioxidativo possui um papel fundamental na aquisição de tolerância das plantas (Vitória et al., 2001). A possível função desta resposta pode incluir uma proteção ao aparato fotossintético, proteção de DNA e proteínas, além da preservação da integridade de membranas que garante o movimento seletivo de íons (Alscher et al., 1997).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a modulação de H⁺-ATPase e o acúmulo de ROS em genótipos de bananeira contrastantes quanto a tolerância à salinidade.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Aspectos da planta

2.1.1 – Origem e distribuição geográfica da bananeira

O Continente Asiático é o centro de origem primário da bananeira, embora existam centros secundários de origem na África Oriental e nas ilhas do Pacífico, além de um importante centro de diversidades na África Ocidental (Medina et al., 1985). Os genótipos apresentam três níveis cromossômicos distintos: diplóide, triplóide e tetraplóide, respectivamente com dois, três e quatro múltiplos do número básico de cromossomos ($n=11$) (Dodds, 1943).

Por ser uma planta tipicamente tropical, a bananeira exige calor constante e elevada umidade para um bom desenvolvimento. Essas condições favoráveis são encontradas na faixa compreendida entre os paralelos de 30° de Latitude Norte e Sul, nas regiões onde as temperaturas se situam entre os limites de 10° e 40° C. Entretanto, existe a possibilidade de seu cultivo em latitudes acima de 30° (até 45°), desde que a temperatura seja adequada (Dantas et al., 1997).

2.1.2 - Estrutura da planta e Classificação botânica

De acordo com Dantas et al. (1997), a bananeira é uma planta herbácea, possui caule curto e subterrâneo (rizoma), que constitui um órgão de reserva, onde se inserem as raízes

adventícias e fibrosas de um sistema radicular fasciculado. Possui pseudocaule resultante da união das bainhas foliares, que termina com uma copa de folhas longas e largas, com nervura central desenvolvida. Do centro da copa emerge a inflorescência com brácteas ovaladas de coloração roxo-avermelhada, em cujas axilas nascem as flores. Cada grupo de flores reunidas forma uma penca com um número variável de frutos.

Na sistemática botânica de classificação hierárquica, as bananeiras são plantas da classe das monocotiledôneas, ordem Zingiberales (Chase et al., 2000), família Musaceae e subfamília Musoideae. Essa última inclui o gênero *Musa* constituído por quatro séries ou seções: Australimusa, Callimusa, Rhodochamys e (Eu)-Musa (Simmonds, 1973). A seção (Eu)-Musa é a mais importante, pois além de ser formada pelo maior número de espécies do gênero, apresenta ampla distribuição geográfica e abrange as espécies de bananas comestíveis (Dantas et al., 1997).

2.1.3 - Importância Econômica

A cultura de bananeira é de grande importância na economia mundial, razão pela qual é cultivada em mais de 100 países, apresentando produção anual superior a 64 milhões de toneladas. O Brasil é o segundo maior produtor de bananas, produzindo 6,7 milhões de toneladas de frutos numa área colhida de 494 mil hectares (FAO, 2005). Entre as frutas tropicais, é a que apresenta o mais alto índice de consumo per capita, sendo considerada a fruta de maior consumo entre os brasileiros (Souza e Torres Filho, 1997; Rosa Júnior, 2000).

A bananeira é cultivada em todos os Estados brasileiros, sobressaindo-se o Pará como maior produtor, com 771.500 toneladas de frutos, seguido por São Paulo (640.000 t) e Bahia (517.270 t). Pernambuco ocupa a sexta posição, com 360.000 t de bananas produzidas por ano,

sendo explorada principalmente as cultivares Pacovan e Prata Anã (IBGE, 2002). Em Pernambuco, a região do perímetro irrigado do Vale do São Francisco apresenta maior expansão da cultura (França, 1998).

2.2 - Salinidade

2.2.1 - Efeitos sobre as plantas

O estresse salino induz uma série de respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas plantas, respostas estas que variam dependendo do genótipo e do estágio de desenvolvimento da planta. As plantas tolerantes a elevadas concentrações de sal são classificadas como halófitas, as quais apresentam a capacidade de acumular uma grande quantidade de Na^+ e Cl^- (Ungar, 1991). As glicófitas, por sua vez, apresentam pouca tolerância à salinidade. Enquanto que as halófitas crescem em ambientes com concentrações salinas que variam de 50 a 500 mM, a maioria das glicófitas apresenta redução do crescimento quando a salinidade supera os 10 mM (Orcutt e Nielsen, 2000).

Em geral, o estresse salino restringe o crescimento das plantas. Níveis excessivamente elevados de salinidade causam necrose de células do sistema radicular e da parte aérea. Este conjunto de danos permanentes pode provocar a morte da planta. Os efeitos do sal sobre as plantas são consequência de fatores osmóticos e iônicos. O componente osmótico resulta de elevadas concentrações de sais dissolvidos na solução do solo que reduz o potencial osmótico desta solução, diminuindo, conseqüentemente, a disponibilidade de água para a planta. Por outro lado, o efeito iônico se refere aos íons absorvidos pela planta. Elevadas concentrações de

íons específicos podem provocar desequilíbrio na nutrição mineral e/ou efeitos tóxicos no metabolismo (Willadino e Camara, 2004).

2.3- Bombas protônicas

As células vegetais possuem uma membrana plasmática que separa o ambiente interno, relativamente constante, do entorno, altamente variável que, além de formar uma barreira hidrofóbica à difusão, tem a função de facilitar e regular continuamente o trânsito de íons e moléculas selecionados para dentro e para fora. O mesmo é válido para membranas internas, as quais separam os diversos compartimentos dentro de cada célula (Taiz e Zeiger, 2004).

Os sistemas de transporte presentes nas biomembranas podem ser divididos em dois grupos: os sistemas primários, que compreendem bombas eletrogênicas ou eletroneutras, que são capazes de gerar um gradiente eletroquímico ao transportarem íons contra um gradiente de concentração, utilizando-se da energia liberada na quebra de ligações covalentes, e os sistemas secundários, desempenhados por canais, carreadores ou transportadores, onde o transporte de íons através da membrana não envolve quebra de ligações covalentes, mas depende do desequilíbrio de cargas e ΔpH gerado na membrana pelos sistemas primários (Logan et al., 1997).

As adenosinas 5'-trifosfatases translocadoras de prótons, as H^+ -ATPases, são as principais bombas eletrogênicas responsáveis pela interconversão da energia química, elétrica e luminosa nas células de todos os organismos vivos. Nas membranas das células vegetais, encontram-se três tipos de H^+ -ATPases (a H^+ -ATPase da membrana vacuolar-tipo V, a H^+ -ATPase da membrana plasmática – tipo P e a H^+ -ATPase das membranas do cloroplasto e da

mitocôndria – tipo F) que se distinguem por suas estruturas, funções, mecanismos de ação e evolução, cada uma representando uma das três classes de ATPases translocadoras de cátions. Uma outra classe de enzimas, as pirofosfatases (H^+ -PPases) têm sido caracterizadas, tanto em nível bioquímico quanto molecular, e, atualmente, são consideradas como um grupo de enzimas translocadoras capazes de acoplar a hidrólise do pirofosfato inorgânico à translocação de prótons através do tonoplasto (Rea et al., 1992).

2.3.1 - H^+ -ATPase de membrana plasmática

A H^+ -ATPase de membrana plasmática de plantas desempenha funções chave na fisiologia das plantas. Usando ATP como fonte de energia, a H^+ -ATPase bombeia prótons através da membrana plasmática do citoplasma para o exterior da célula (apoplasto). A bomba de prótons da membrana plasmática é uma H^+ ATPase tipo P, caracterizando-se por assumir dois estados conformacionais designados E1 e E2 (Serrano, 1989). A enzima é formada por um único polipeptídeo, de 100 KDa, que é ativo nas formas monomérica e homodimérica. O monômero tem 10 domínios transmembranares e uma grande alça hidrofílica contendo a região de ligação do ATP. As ATPases de membrana plasmática são inibidas por ortovanadato ($H_2VO_4^-$), que compete com o fosfato (Sze et al., 1999) e por complexos de fluoreto de alumínio (Façanha e De Meis, 1995).

A H^+ -ATPase de membrana plasmática constitui uma base para processos de transporte de membrana plasmática, devido à formação do gradiente de pH e do potencial elétrico gerado pela bomba. Contudo, além do fluxo dirigido através de outros sistemas de transporte, a H^+ -ATPase de membrana plasmática representa várias outras funções essenciais na biologia celular da planta. A acidificação da parede celular induz a plasticidade da parede,

possibilitando assim a expansão celular, e a bomba também é essencial na remoção do excesso de H^+ do citossol. A alcalinização do citoplasma talvez seja um dos fatores disparadores da divisão celular (Serrano, 1989; 1990).

Como outras enzimas, a ATPase de membrana plasmática é regulada por variáveis como a concentração de substrato (ATP) e temperatura (Sze et al., 1999). Moléculas individuais de H^+ -ATPase podem ser reversivelmente ativadas ou desativadas em resposta a uma variedade de sinais, tais como luz, hormônios, ataque de patógenos, dentre outros. Esse tipo de regulação é mediado por um especializado domínio altoinibitório da região C-terminal da cadeia polipeptídica, a qual age como uma válvula, regulando a atividade da bomba de prótons (Taiz e Zeiger, 2004).

2.3.2 - H^+ -ATPase do tonoplasto

Os sistemas de transporte primários de prótons da membrana vacuolar de plantas (tonoplasto) exercem um papel fundamental no controle do pH citoplasmático e na manutenção da homeostase celular. Por isso, fatores que afetam a atividade dessas enzimas geralmente provocam reflexos severos sobre o desenvolvimento da planta (Taiz e Zeiger, 2004).

O vacúolo é a maior organela da maioria das células vegetais, podendo compreender mais de 90% do espaço intracelular de uma célula madura (Taiz e Zeiger, 2004). No tonoplasto encontram-se duas diferentes bombas de prótons, uma H^+ -ATPase do tipo V e uma próton-pirofosfatase (H^+ -PPase) ligadas à membrana (Rea et al., 1992). Ambas as enzimas são capazes de gerar um gradiente eletroquímico de prótons no tonoplasto pela hidrólise de ATP ou de PPI, os quais são utilizados para energizar a translocação de solutos (como íons

inorgânicos, açúcares e ácidos orgânicos) do citoplasma para o interior do vacúolo (Rea e Sanders, 1987). Essa atividade é de vital importância para o controle da concentração de metabólitos e para a compartimentação de agentes tóxicos, que, eventualmente, possam vir a acessar o citoplasma (Taiz, 1992). Esse gradiente de H^+ , gerado através da membrana vacuolar pode, também impulsionar a síntese de ATP e PPI, devido à capacidade de reversibilidade dos ciclos catalíticos dessas enzimas (Façanha e De Méis, 1998).

A ATPase de tonoplasto, que possui um peso molecular de aproximadamente 730 Kda, consiste de várias subunidades polipeptídicas, as quais estão localizadas em dois domínios maiores, um domínio globular na periferia da membrana (V_1), contendo o sítio de ligação nucleotídica, e um domínio integral da membrana (V_0), contendo o canal de próton. (Ratajczak, 2000). Essa proteína possui um alto grau de homologia estrutural com as ATPases do tilacóide e da membrana mitocondrial (Grabe et al., 2000). Essa homologia na seqüência de várias subunidades, das ATPases do tilacóide e da membrana mitocondrial com a ATPase do tonoplasto, e a similaridade na estrutura das holoenzimas sugerem a existência de uma proteína ancestral comum no passado evolutivo de ambas as ATPases (Ratajczak, 2000).

Essas ATPases são estimuladas por ânions, como o cloreto, e, especificamente, inibidas por nitrato, bafilomicina A_1 e concanamicina, e podem, também, ser inibidas pelo ADP, que compete com o ATP pelo sítio catalítico. Entretanto, são insensíveis ao inibidor da ATPase de membrana plasmática (ortovanadato) e ao inibidor da ATPase do tilacóide e da membrana mitocondrial (azida). Outros diferentes mecanismos estão envolvidos na regulação da atividade dessas enzimas, tais como: fosforilação das subunidades da ATPase do tonoplasto, modificações do estado redox da enzima por oxidação e redução de grupos sulfidrilas essenciais, presentes nas subunidades A e B da ATPase do tonoplasto. Mudanças na disponibilidade do substrato $MgATP^{2-}$ no citoplasma e os fosfolipídios presentes na fase

cristalina líquida do tonoplasto são importantes para a regulação, o que mostra a complexidade dos mecanismos regulatórios da atividade dessas enzimas (Ratajczak, 2000).

O bombeamento de prótons pela H^+ -ATPase não somente energiza o tonoplasto para o transporte mediado por carreadores, mas também gera o baixo pH do vacúolo, onde proteases, glucosidases, fosfatases e nucleotidases permanecem e funcionam em pH ácido (Buchanan et al., 2000).

2.3.3 – H^+ -ATPase mitocondrial

A F-ATPase mitocondrial é uma das mais complexas enzimas caracterizadas. Consistindo num componente F_0 limitado por uma membrana lipofílica e um componente F_1 hidrofílico. Esta enzima complexa com multisubunidades funcionais é a principal ATP sintetase em mitocôndrias, cloroplastos e bactérias. O componente F_1 isolado tem sido extensivamente caracterizado de mitocôndrias de mamíferos pelas suas propriedades moleculares e cinéticas (Sane et al., 1996). Um detalhado estudo de raio X cristalográfico em F-ATPase bovina, levando a elucidação estrutural, foi publicado (Abrahams et al., 1994) e relatou que a F-ATPase de mitocôndrias consiste principalmente de cinco subunidades que são, $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ e ϵ os quais acreditam-se existir nas proporções de 3:3:1:1:1.

F-ATPase mitocondrial de plantas superiores tem sido pouco caracterizadas e foi somente na última década que F-ATPases de milho, ervilha, batata doce, nabo, aveia, copo-de-leite e beterraba vem sendo purificadas e caracterizadas (Sane et al., 1996).

2.3.4 – Bombas de prótons X Estresse salino

Em nível celular deve ser evitado o acúmulo de sal no citosol, onde se encontra o aparato metabólico sensível, tanto em glicófitas como em halófitas, para evitar a inibição de um grande número de enzimas (Munns, 2002).

Três mecanismos estão disponíveis em plantas para prevenir o acúmulo excessivo de Na^+ no citosol. No primeiro, a entrada de Na^+ é restringida pela seletividade na absorção de íons. O segundo refere-se à compartimentalização de Na^+ no vacúolo e, no terceiro, o Na^+ presente no citosol é exportado para o espaço apoplástico ou para o solo/substrato (Munns, 2002).

A extrusão de Na^+ do citosol, para o vacúolo ou para o apoplasto, ocorre através do antiporte Na^+/H^+ . O antiporte é um transporte ativo secundário que utiliza o gradiente eletroquímico estabelecidos por H^+ -ATPase ou H^+ -PPase de membrana (transporte ativo primário) (Blumwald et al., 2000). Uma H^+ -ATPase é a principal responsável pelo ΔpH e pelo gradiente de potencial de membrana encontrados na membrana plasmática, enquanto que uma H^+ -PPase ou uma H^+ -ATPase vacuolar geram o gradiente através do tonoplasto. A atividade dessas bombas é necessária para o antiporte, Na^+/H^+ , que conduz o Na^+ em uma direção e o H^+ na direção oposta (Willadino e Camara, 2005).

O efluxo de Na^+ do citoplasma para o apoplasto é mediado por um produto do gene *SOS1* (Salt Overly Sensitive 1) que funciona como um transportador Na^+/H^+ do tipo antiporte. Por sua vez, a compartimentalização vacuolar de Na^+ resulta da atividade de uma família de transportadores Na^+/H^+ tal como o *AtNHX1* identificado em *Arabidopsis* (Apse et al., 1999).

Plantas de *Arabidopsis*, submetidas ao estresse salino, expressam *SOS1* preferencialmente nas células da epiderme do ápice das raízes, evidenciando a ativação do mecanismo de extrusão de sódio para o meio externo (Shi et al., 2002). De acordo com Apse et al. (1999), a ausência do antiporte *SOS1* de forma generalizada nas demais células da raiz e da parte aérea. A atividade intensa desse transportador levaria a extrusão do Na^+ para o apoplasto dos tecidos da planta o que, dependendo da magnitude, é tóxico para as células vizinhas e favorece a desidratação das mesmas. Em contraste, o gene *AtNHX* não se expressou no ápice da raiz, o que reflete uma estratégia crucial para a proteção das células meristemáticas, visto que as mesmas reconhecidamente não apresentam vacúolos grandes, os quais são fundamentais para a compartimentalização do Na^+ . Por outro lado, o gene *AtNHX* expressa-se abundantemente nas células de quase todos os tecidos, indicando que a compartimentalização do Na^+ no vacúolo é um mecanismo bastante generalizado nas demais células da planta (Apse et al., 1999).

2.4 - Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS)

Uma das mudanças bioquímicas ocorridas quando as plantas são submetidas a estresses ambientais, entre eles o salino, é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Dat et al., 2000).

O oxigênio, apesar de ser requerido pelas plantas para processos indispensáveis a sua sobrevivência, é potencialmente danoso a elas, já que pode ser reduzido a espécies reativas de oxigênio (ROS), na forma de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH). A produção acentuada de ROS durante o estresse

pode representar uma ameaça para as células. Apesar disso, elas também podem agir como sinalizadores na ativação de resposta ao estresse e como vias de defesa. Assim, as ROS podem ser consideradas, inicialmente, um indicador celular de estresse e um mensageiro secundário envolvido na transdução de sinal em resposta ao estresse (Mittler, 2002).

Os principais locais de produção de ROS em células vegetais são as organelas com altas atividades metabólicas de oxigenação ou com fluxo substancial de elétrons, são elas: cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Garczarska et al., 2004). Nos cloroplastos as ROS podem ser regeneradas por transferência direta de energia pela excitação da clorofila, para produzir oxigênio singlete, ou por redução de oxigênio em reações Mehler (Meloni et al., 2003). O peróxido de hidrogênio, nos cloroplastos, é um poderoso inibidor do ciclo de Calvin (Takeda et al., 1995). Em adição, H_2O_2 e O_2^- podem interagir na presença de certos íons metálicos e quelatos que produzem OH altamente reativas (Sudhakar et al., 2001).

Outras fontes de ROS pertencentes a outras vias são acentuadas em resposta a estresse abiótico, tais como, glicolato oxidase nos peroxissomos durante a fotorrespiração. Contudo, nos últimos anos, novas fontes de ROS têm sido identificadas em plantas, incluindo NADPH oxidase na membrana plasmática, aminas oxidase no apoplasto e peroxidases na parede celular (Mittler, 2002).

A toxidez das ROS é devido às suas reações com numerosos compostos celulares, que causam uma cascata de reações oxidativas, sendo o efeito mais comum, a degradação da membrana celular (Prochazkova et al., 2001). Ocorre, também, a inativação de enzimas, degradação de proteínas, danos em DNA e RNA, e peroxidação de lipídios (Scandalios, 1993; Yu e Rengel, 1999). A peroxidação lipídica é o processo através do qual os radicais livres retiram elétrons dos lipídios das membranas das células, resultando em dano para a célula. O processo ocorre através de um mecanismo de reação em cadeia de radicais livres. Isto

freqüentemente afeta os ácidos graxos poliinsaturados, porque eles contêm múltiplas duplas ligações entre as quais encontram-se grupos metileno – CH₂, que são especialmente reativos ao hidrogênio (Wikipedia, 2006).

Para proteção das organelas e das membranas celulares dos efeitos danosos de concentrações tóxicas de ROS, as plantas desenvolveram um complexo mecanismo de defesa (Foyer et al., 1994; Mehdy et al., 1996), incluindo um sistema enzimático, que compreende a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase, catalase, glutathione redutase e tioredoxina redutase, e um sistema não-enzimático composto por moléculas antioxidantes, como ácido ascórbico, glutathione, carotenóides, α -tocoferol (Mittler, 2002) e compostos fenólicos (Sakihama et al., 2002). Tem sido proposto que a proteção contra os efeitos negativos decorrentes da produção de ROS, na célula vegetal, depende da atividade coordenada entre os sistemas não-enzimáticos e a atividade do sistema enzimático (Scandalios, 1993). Apesar disso, quando a geração de ROS ultrapassa às defesas celulares desenvolvidas, então o estresse oxidativo é observado (Mehdy et al., 1996), podendo inclusive levar a célula à morte (Buchanan et al., 2000).

3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahams JP, Leslie AGW, Lutter R, Walker JE (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁ ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 621-628.
- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100:224-233.
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256-1258.
- Blumwald E, Aharon GS, Apse MP (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465:140-151.
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed. American Society of Plant Physiologists.
- Chasan R, Schroeder JI (1992) Excitation in plant membrane biology. *Plant Cell* 4: 1180.
- Chase MW, Soltis DE, Soltis PS, Rudall PJ, Fay MF, Hahn WH, Sullivan S, Joseph J, Molvray M, Kores PJ, Gunish TJ, Systma KJ, Pires JC (2000) Higher level systematics of the Monocotyledons: an assessment of current Knowledge and a new classification. In: Wilson KL, Morrison DA (eds), *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO, Collingwood, 341-349.
- Crouch JH, Vuylsteke D, Ortiz R (1998) Perspectives on the application of biochemistry to assist the genetic enhancement of plantain and banana. *Eletr. J. Biotecnol.* 1:1-12.
- Dantas JLL, Shepherd K, Silva SOE, Soares filho WS (1997) Classificação Botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: ALVES, E.J. *A cultura da banana: aspectos técnicos, sócio-econômicos e agroindustriais*. Brasília: Embrapa-SPI/Cruz das Almas. Embrapa- CNPMF 27-34.

- Dat J, Vandenberghe S, Vranová E, Van montagu M, Inzé D, Van breusegem F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life. Sci.* 57:779-795.
- Dodds KS (1943) Genetic and cytological studies of *Musa*. V. Certain edible diploids. *Journal of Genetics Cambridge* 45:113-138.
- Façanha AR, De Meis L (1995) Inhibition of maize root H^+ -ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiol.* 108:241
- Façanha AR, De Meis L (1998) Reversibility of H^+ -ATPase and H^+ -pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiol.* 116:1487-1495.
- FAO. Statistics agricultural production. Crops Primary. Disponível em: <http://www.fao.org.br>. Acessos Agosto de 2005.
- França JGE (1998) Situação atual e perspectiva das áreas irrigadas no Estado de Pernambuco. Petrolina: EMBRAPA.
- Garczarska M, Bednarski W, Morkunas I (2004) Re-aeration-induced oxidative stress and antioxidative defenses in hypoxically pretreated lupine roots. *J. Plant Physiol.* 161:415-422.
- Gomes EWF, Willadino L, Martins LSS, Silva SO; Camara TR, Meunier IMJ (2004) Diplóides (AA) de bananeira submetidos ao estresse salino. *Pesq. Agropec. Brasil.* 39: 525-531.
- Grabe M, Wang H, Oster G (2000) *Biophysic. Journal* 78:2798-2813.
- IBGE. Estatística, Agricultura. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em fevereiro 2002.
- Logan H, Basset M, Véry AA, Setenec H (1997) Plasma membrane transport systems in higher plants: from black boxes to molecular physiology. *Physiol. Plant.* 100:1.

- Medina CJ, Bleinroth EW, De Martin ZJ, Travaglini DA, Okada M, Quast DG, Hashizume T, Moretti VA, Bicudo Neto LC, Almeida LASB de; Renesto OV (1985) Banana: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2ed., 302p. Campinas: ITAL.
- Mehdy MC, Sharma YK, Sathasivan K, Bays NW (1996) The role of activated oxygen species in plant diseases resistance. *Physiol. Plant.* 98:365-374.
- Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA, Cambraia J (2003) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 49:69-76.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-410.
- Moura RF (2000) Efeito das lâminas de lixiviação de recuperação do solo e da salinidade da água de irrigação sobre os componentes de produção e coeficiente de cultivo da beterraba. 2000. 211f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais.
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, 25:239-250.
- Orcutt DM, Nilsen ET (2000) *Physiology of plants under stress*. John Willey and Sons. New York.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.
- Prochazkova D, Sairam RK, Srivastava GC, Sing DV (2001) Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant. Sci.* 161:765-771.
- Ratajczak R (2000) Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 17-36.

- Rea PA, Sanders D (1987) Tonoplast energization: two H⁺ pumps, one membrane. *Physiol. Plant.* 71:131.
- Rea PA, Kim Y, Sarafian V, Poole RJ, Davies JM, Sanders D (1992) Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends in Biochemical Sciences* 17:353.
- Rosa Júnior CDRM (2000) Bananeira. Cultivo sob condição irrigada. Recife: SEBRAE/PE.*
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology.* 177:67-80.
- Sane VA, Sane AP, Seth P, Sane PV (1996) Purification and characterization of the mitochondrial F₁ ATPase from rice. *Plant Sci.* 117: 1-8.
- Santos JGR, Gheyi H (1993) Crescimento da bananeira nanica sob diferentes qualidades de água de irrigação. *Pesq. Agropec. Bras.*28:339-349.
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101:7-12.
- Serrano R (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:61-94.
- Serrano R (1990) The plant plasma membrane-structure, function and molecular biology. (Larsson, C.; Moller, I.M.), Springer-Verlag, Berlim, Heidelberg 127-153.
- Sgherri CL, Nawari-izzo F (1995) Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: Oxidative stress and defense mechanisms. Physiol. Plant.* 93:25-20.
- Shannon MC (1997) Adaptation of plants to salinity. *Adv. Agron.* 60:76-199.
- Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁺ transport in plantas. *The Plant Cell*, 14:465-477.

- Simmonds NW (1973) Los platanos. Barcelona: Blume, 539p.
- Souza JS, Torres-Filho P (1997) Aspectos socioeconômicos. In: ALVES, E.J.A. A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: Embrapa, 121p.
- Sudhakar C, Lakshmi A, Giridarakumar S (2001) Changes in the oxidant enzymes activity in two high yielding genotypes of Mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Sci. 161:613-619.
- Sze H, Xuhang L, Palmgren MG (1999) Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. Plant Cell 11:677-689.
- Taiz, L. (1992) The plant vacuole. J. Exp. Biol. 172:113—122.
- Taiz L, Zeiger E (2004) Fisiologia Vegetal. Editora Artmed. 3.ed. São Paulo, SP.
- Takeda T, Yokota A, Shigeoka S (1995) Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae. Plant Cell Physiol. 36:1089-1095.
- Ungar IA (1991) Ecophysiology of vascular halophytes. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Vitória AP, Lea PJ, Azevedo RA (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. Phytochem. 57:701-710.
- Wikipedia, enciclopédia eletrônica livre. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/lipid_peroxidation. Acesso em: 20 de Julho de 2006.
- Willadino LG, Camara TR (2004) Origen y naturaleza de los ambientes salinos. In: La Ecofisiologia Vegetal: Una Ciencia de Sintesis. Thomson Editores Spain. Madrid, 1ed.
- Willadino LG, Camara TR (2005) Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. In.: Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas. MXM Gráfica e Editora. Recife-PE.
- Yu Q, Rengel Z (1999) Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupins. Plant Sci. 142:1-11.

CAPÍTULO 1

Manuscrito a ser enviado ao Brazilian Journal of Plant Physiology

Modulação da atividade de H⁺-ATPases e integridade das membranas celulares em dois genótipos de bananeira (*Musa spp*) submetidos a estresse salino

Flávia Dias Suassuna^{1*}, Mirella Pupo Santos², Lilia Gomes Willadino³, Terezinha Rangel Camara⁴, Ricardo Enrique Bressan Smith⁵.

1- Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2- Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Melhoramento Genético da Universidade Estadual do Norte Fluminense, 3- Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco; 4- Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco; 5- Departamento de Melhoramento Genético Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Modulação da atividade de H⁺-ATPases e integridade das membranas celulares em dois genótipos de bananeira (*Musa spp*) submetidos a estresse salino

O estresse salino induz distúrbios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos nas plantas. Nas células vegetais, as propriedades físicas e químicas das membranas celulares podem ser alteradas pelo estresse salino. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de H⁺-ATPases e a integridade das membranas celulares em dois genótipos de bananeira, Berlin, sensível ao sal, e Thap Maeo, tolerante, utilizando como indicadores, para este último, a peroxidação lipídica e o extravasamento de eletrólitos. Utilizaram-se plantas de bananeiras, dois níveis de sal (0 e 50 mM de NaCl) e quatro tempos de coleta (0, 24, 48 e 72 horas). Para obter as atividades das H⁺-ATPases, a fração microsomal foi isolada de primórdios radiculares por centrifugação diferencial e as atividades determinadas pela quantidade de P_i liberado. A peroxidação de lipídios foi feita medindo-se o conteúdo de malondialdeído (MDA) em extratos de tecido de raiz. A determinação da integridade das membranas celulares (PIR) foi realizada a partir de discos e determinadas por condutividade elétrica. Os resultados demonstraram que o genótipo Thap Maeo, tolerante ao sal, manteve a atividade da P-ATPase similar ao controle, garantindo o gradiente de H⁺ para a extrusão de Na⁺. Em relação a concentração de MDA, no genótipo Berlin, sensível ao NaCl, houve maior peroxidação lipídica nas plantas tratadas até as 48h, enquanto que no genótipo Thap Maeo, tolerante, observou-se valores similares ao controle. O extravasamento de eletrólitos não refletiu diferença entre os tratamentos nem entre os genótipos.

Palavras-chave: *Banana, bombas de prótons, extravasamento de eletrólitos, peroxidação de lipídios, salinidade.*

Modulation of H⁺-ATPases activity and the cell membranes unity in two banana's genotip (*Musa spp*) submitted to salt stress

The salt-stress induce morphologics, phisiologycs and bioquimics plants disturbs. On vegetable cell, the physicals and chimycals properties' membranes cell can be modified by salt-stress. The aim of the work was evaluated the H⁺ -ATPases and the cell membranes unity in two banana's genotip, Berlin, sensitive to NaCl and the Thap Maeo, tolerant, using for the last the lipid peroxidation and electrolyte leakage. At banana's plant were used two salt levels (0 and 50 MM NaCl) and four colect times (0, 24, 48 and 72 hours). To get the activities H⁺ -ATPases the microsomal fraction was isolated young roots, and centrifugated it, and the activities by the liberate Pi quantity. The lipid peroxidation was done by measure the malondialdeid concentration (MDA) in the tissue roof. The cell membrane unity was determinated (PIR) with leaves discs by electronic conductivity. The results showed the genotip Thae Maeo salt tolerating were the P- ATPases had similar activity control, got the H⁺ gradient from Na⁺ exclusion. In relation to MDA concentration, the Berlin genotip , NaCl sensitive, there was great peroxidation on the treated plants until 48 hours, however the genotip Thae Maeo tolerant there was similar values control. There wasn't differences between the electrolyte leakage neither than genotip treatment.

Key-words: *Banana, electrolyte leakage, lipid peroxidation, proton pumps, salinity.*

INTRODUÇÃO

Um dos mais importantes fatores limitantes da produtividade das plantas é o estresse induzido por salinidade. Este é especialmente severo em regiões áridas e semi-áridas, como o Nordeste Brasileiro, onde a salinização do solo é um problema, sobretudo em áreas irrigadas. O estresse salino resulta em alterações no metabolismo da planta incluindo redução no potencial hídrico, desbalanço iônico, toxicidade, e redução na assimilação do dióxido de carbono (Willadino e Camara, 2004). A habilidade para sobreviver sob salinidade ambiental requer múltiplas adaptações da planta. Através dos anos, muitas tentativas tem sido testadas para mudar o grau de tolerância ao sal de muitas culturas, ainda que os resultados alcançados para estas tentativas tenham sido limitados (Flowers et al., 2000). Apesar da vasta literatura científica focada nas respostas das plantas a estresses abióticos, ainda continua sendo necessária à compreensão das numerosas respostas fisiológicas das diversas culturas. O entendimento das respostas das plantas a estresses é essencial para o uso adequado das culturas (Xiong e Zhu, 2001).

Em nível celular, deve ser evitado o acúmulo de sal no citosol, onde se encontra o aparato metabólico sensível, tanto em glicófitas como em halófitas. Os íons Sódio (Na^+) e Cloro (Cl^-) permanecem no citosol e nas organelas até concentrações de, aproximadamente, 100 mM. Quando esse limite é ultrapassado o sal deve ser excluído do citosol para evitar a inibição de um grande número de enzimas (Munns, 2002).

Três mecanismos estão disponíveis em plantas para prevenir o acúmulo excessivo de Na^+ no citosol. No primeiro, a entrada de Na^+ é restringida pela seletividade na absorção de íons. O

segundo refere-se à compartimentalização de Na^+ no vacúolo e, no terceiro, o Na^+ presente no citosol é exportado para o espaço apoplástico ou para o solo/substrato (Munns, 2002).

A extrusão de Na^+ do citosol, para o vacúolo ou para o apoplasto, ocorre através do antiporte Na^+/H^+ . O antiporte é um transporte ativo secundário que utiliza o gradiente eletroquímico estabelecidos por H^+ -ATPase ou H^+ -PP_iase de membrana (transporte ativo primário) (Blumwald, 2000). Uma H^+ -ATPase é a principal responsável pelo ΔpH e pelo gradiente de potencial de membrana encontrados na membrana plasmática, enquanto que uma H^+ -PP_iase ou uma H^+ -ATPase vacuolar geram o gradiente através do tonoplasto. A atividade dessas bombas é necessária para o antiporte, Na^+/H^+ , que conduz o Na^+ em uma direção e o H^+ na direção oposta (Willadino e Camara, 2005).

Muitos dos efeitos dos estresses ambientais no metabolismo das plantas são mediados pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e radical hidroxila (OH^\cdot) (Hernández et al., 2000; Vaidyanathan et al., 2003; Cavalcanti et al., 2004). Estas ROS são extremamente citotóxicas e podem causar sérios danos no metabolismo através de danos oxidativos nos lipídios (Alscher et al., 2002; Foyer e Noctor, 2000, 2003), ácidos nucleicos (Alscher et al., 2002; Herbette et al., 2002) e proteínas (Herbette et al., 2002). Ainda que o aumento da produção de ROS possa ser um perigo potencial para a célula, é também provável que estas espécies atuem como sinais para a ativação de defesa dos estresses em plantas (Mittler, 2002; Neill et al., 2002). Deste modo, as ROS podem ser vistas como indicadores de estresse e como segundo mensageiros envolvidos no caminho de transdução de sinais nas respostas das plantas ao estresse (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004).

As plantas têm desenvolvido sistemas de defesa contra estas ROS, envolvendo tanto uma limitação na formação das mesmas como sua remoção (Alscher et al., 2002), para evitar os danos causados por estes componentes. As defesas enzimáticas das plantas incluem enzimas antioxidantes como as fenol peroxidase, ascorbato peroxidase, glutathione peroxidase, superóxido desmutase e catalase, as quais, juntas com outras enzimas do ciclo da ascorbato-glutathione, promovem a retirada das ROS (Hernández et al., 2000; Cavalcanti et al., 2004).

Os efeitos do estresse salino (NaCl) em respostas antioxidantes tem sido estudados em um número significativo de espécies de plantas. Estes estudos indicam que as respostas antioxidativas estão muito correlacionadas com a sensibilidade e tolerância das cultivares ao estresse salino (Bandeoglu et al., 2004), uma vez que o acúmulo de ROS resulta em uma série de processos degenerativos celulares, incluindo a peroxidação de lipídios de membrana e o disparador da morte celular programada (Gechev et al., 2002).

O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito da salinidade sobre o comportamento de dois genótipos de bananeira contrastantes, Berlin (sensível) e Thap Maeo (tolerante) quanto à modulação das bombas de prótons e a integridade das membranas celulares utilizando a peroxidação lipídica e o extravasamento de eletrólitos.

MATERIAS E MÉTODOS

Foram utilizadas mudas de bananeiras, provenientes de cultivo *in vitro*, do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF). Os genótipos utilizados foram o Berlin e o Thap Maeo. A escolha dos genótipos foi realizada em

função de trabalhos prévios do grupo (Cunha et al., 2006) que identificaram o Berlin como sensível ao NaCl e o Thap Maeo como tolerante.

As plantas foram submetidas a dois tratamentos salinos, 0 e 50 mM de NaCl. O tempo de duração do tratamento foi de 0, 24, 48 e 72 horas. O experimento constou de um fatorial de 4 x 2 x 2 sendo 4 tempos de coleta, 2 cultivares e 2 níveis de sal. Em cada tratamento utilizaram-se 3 repetições.

Preparação da fração microsomal

As frações microsomais, contendo vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto, foram isoladas através de centrifugação diferencial, como descrito por Giannini e Briskin (1987), com algumas modificações propostas por Façanha e De Méis (1998).

Os primórdios radiculares foram removidos com uma tesoura. Após serem pesados foram, a extração foi feita com o tampão composto de 250 mM de sacarose, 10% de glicerol, 100 mM de Tris-base, 5 mM EDTA, e 5 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 0,4% PVP-40T, 0,3% BSA, 100 mM KCl e 10 mM de glicerol-P. Foram, então, homogeneizados. Foi utilizado tampão na proporção de 1:2 (v:w – tampão: peso matéria fresca) durante maceração manual. O homogenato foi filtrado em duas camadas de gaze e, em seguida, o extrato foi centrifugado a 3.000 g por 10 min a 4⁰C para a remoção de células não rompidas, núcleos e mitocôndrias. O sobrenadante foi, então, centrifugado em ultracentrífuga (modelo CP 75 □, HITACHI, Japan) a 100.000 g por 30 min a 4⁰C. O precipitado dessa segunda centrifugação foi ressuspenso em solução tampão contendo: 15% de glicerol, 70 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT e 1 mM de PMSF. O material foi então congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70⁰ C até o uso.

Dosagem de proteínas

As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão.

Determinação da atividade ATPásica de tonoplasto e de membrana plasmática

As atividades ATPásica foram determinadas colorimetricamente, consistindo na determinação de Pi liberado durante a hidrólise do ATP, segundo o método descrito por Fiske e Subbarow (1925), com modificações propostas por Façanha e De Méis (1998). As reações foram iniciadas com a adição da proteína e finalizadas através da adição de 20% (p/V) de ácido tricloroacético a 4⁰C, e mantendo-se nesta temperatura. Ao material das reações foi adicionado a mistura de uma solução de 0,5% de molibdato de amônio mais 2% de ácido sulfúrico com uma solução de 10% de ácido ascórbico, na proporção de 10:1. Passados 2 min, fez-se a leitura em leitor de microplaca Modelo *μQuant, Bio Tek instruments, NC.*, com comprimento de onda de 750 nm, obtendo-se a densidade ótica.

O meio reacional foi composto de 50 mM de Tris-HCl (pH 7,0) – tonoplasto ou 50 mM de HEPES – KOH (pH 6,5) – membrana plasmática, 100 mM de KCl, 5 mM de MgSO₄, 0,2 mM de Na₂MoO₄, 0,2 mM H₂VO₄⁻ e 1 mM de ATP para as reações de atividade de H⁺-ATPase, e 30 μg de proteína.mL⁻¹ e água destilada.

Peroxidação lipídica

A estimativa da peroxidação de lipídios das membranas foi feita pela medida do conteúdo de malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica em plantas.

Foram retiradas 5 gramas de amostras frescas (PF) das raízes (controle e tratamento) de bananeira. Essas amostras foram maceradas em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% na presença de polivinil polipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:1,5 (PF:PVPP).

O homogenato foi centrifugado a 10.000 g por cinco minutos 1 mL do sobrenadante foi retirado e adicionado a 4 mL de uma mistura formada por TCA 20% e TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,5%. Após homogeneizado, o extrato foi submetido a 95⁰C por 30 minutos, seguindo-se de rápido resfriamento em gelo. A amostra foi lida a 535 e 600 nm em leitor de microplaca Modelo *μQuant, Bio Tek instruments, NC*.

A concentração de MDA ([MDA]) foi calculada pela seguinte equação:

$$[\text{MDA}] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi b), \text{ na qual:}$$

$$\xi = \text{coeficiente de extinção} = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ e } b \text{ (comprimeto ótico)} = 1 \text{ cm.}$$

Esse procedimento segue o descrito por Dhindsa et al. (1981).

Determinação da integridade membranar

A determinação de integridade de membrana (PIR) foi realizada como descrito por Vasquez-Tello et al. (1990), com modificações. Foram coletados, das folhas, dez discos de 1 cm de diâmetro, lavados três vezes em água ultrapura e colocados imersos em 30 mL de água ultrapura em um tubo de ensaio durante 2400 h, à temperatura de 8⁰C. Após este período os tubos foram transferidos para temperatura ambiente. Foram realizadas as leituras de condutividade (condutividade livre – CL), em um condutivímetro *Quimis, modelo Q-405 A2*. Terminadas as leituras, os tubos foram submetidos à temperatura de 80⁰C, por 0,5 h em banho-maria, e retornaram para o refrigerador por 16 h. Após esse repouso, os tubos foram retirados do refrigerador, e assim que a temperatura da solução dos tubos entrou em equilíbrio com a temperatura ambiente, foram realizadas novas leituras de condutividade (condutividade total – CT).

A integridade de membrana foi obtida pelas seguintes fórmulas:

Porcentagem de integridade absoluta (PIA):

$$PIA = [1-(CL/CT)] \times 100$$

Porcentagem de integridade relativa (PIR)

$$PIR = (PIA_{\text{tratamento}} / PIA_{\text{controle}}) \times 100$$

RESULTADOS

Observou-se que a atividade da P-ATPase membranar diminuiu no genótipo Berlin quando submetido ao tratamento com 50 mM NaCl (Figura 1). Por sua vez no genótipo Thap Maeo, a atividade da enzima foi similar ao controle (Figura 2).

A atividade V-ATPásica vacuolar no genótipo Berlin (Figura 3) não sofreu nenhuma alteração com o tratamento de 50 mM NaCl. Já o genótipo Thap Maeo, mais tolerante ao sal, apresentou uma diminuição na atividade da enzima quando submetido ao tratamento (Figura 4).

Com relação a F-ATPase mitocondrial, nos tratamentos controle de ambos os genótipos, ocorreu uma estabilização após os 30 min da hidrólise do ATP (Figura 5 e 6), o que não aconteceu nos tratamentos salinos.

Na Peroxidação lipídica observou-se que, às 2400 h de tratamento, o genótipo Berlin, sensível ao sal, comportou-se de forma que as plantas submetidas à salinidade apresentaram um maior conteúdo de MDA nas suas raízes, enquanto que em Thap Maeo, genótipo tolerante, não foi observada diferença significativa. Esse comportamento se repetiu às 48 h de tratamento. Às 72 h o conteúdo de MDA das raízes das plantas controle, de ambos os genótipos, apresentam maiores valores que as submetidas ao tratamento salino (Figuras 7 e 8).

Quanto ao Extravasamento de eletrólitos, os resultados encontrados neste trabalho não mostram diferenças significativas entre o extravasamento de eletrólitos nas raízes de plantas em presença ou ausência de NaCl, tanto às 2400 h como às 48 e 72 h (Figura 9).

DISCUSSÃO

Quando plantas são submetidas ao estresse salino, elas podem sobreviver e crescer através de processos adaptativos como a compartimentalização do sal e o transporte de íons para fora da célula. Assim, o controle do movimento de íons através da membrana plasmática e do tonoplasto para manter uma baixa concentração de Na⁺ no citoplasma é essencial para a tolerância à salinidade (Janicka-Russak e Klobus, 2006).

No presente trabalho, observou-se que, em relação à atividade da P-ATPase, houve diferença de comportamento entre as duas cultivares e entre os dois tratamentos (controle e 50mM NaCl). Observou-se a inibição da atividade da enzima no genótipo sensível Berlin quando submetido a 50 mM NaCl. Por sua vez, o genótipo tolerante, Thap Maeo, foi capaz de manter a atividade desta enzima de forma similar ao controle. No trabalho de Yang et al. (2004), com duas cultivares de trigo também foram observadas mudanças significativas na P-ATPase quando as plântulas foram submetidas a diferentes concentrações de NaCl. Na cultivar sensível ocorreu inibição na atividade da enzima quando as plantas foram tratadas com 50, 100 e 150 mM NaCl, contrastando com a cultivar tolerante que apresentou um incremento na atividade enzimática. O aumento no tempo de exposição ao estresse provocou uma intensificação da resposta, indicando que os efeitos do NaCl na atividade da P-ATPase é dependente da severidade e da duração do estresse salino.

A manutenção da atividade da P-ATPase na cultivar de bananeira Thap Maeo, garantiu o gradiente eletroquímico para o antiporte Na^+/H^+ , o qual permite a extrusão de sódio para o apoplasto. Este antiporte resulta em menores teores de Na^+ na cultivar Thap Maeo do que na cultivar Berlin, conforme demonstrado em trabalhos prévio do grupo (Cunha et al., 2006).

Janicka-Russak e Klobus (2006) demonstraram que o tratamento salino (200 mM) em sementes de *Cucumis sativus*, por 24 horas, estimulou a atividade das ATPases de membrana plasmática e tonoplasto determinadas pela hidrólise do ATP. O efeito do sal na atividade hidrolítica de ambas as bombas foi similar, sendo bem maior do que o controle. Wang et al. (2001), trabalhando com folhas de *Suaeda salsa*, observaram que enquanto a atividade hidrolítica da V-ATPase do controle, no período de 16 dias, permaneceu constante, o tratamento com NaCl nas plantas apresentou um aumento linear na atividade da enzima. Já no trabalho com a bananeira, a atividade hidrolítica da V-ATPase manteve-se similar ao controle no genótipo mais sensível, Berlin, quando submetido ao tratamento salino. No genótipo tolerante detectou-se uma diminuição na atividade da V-ATPase.

O que observou-se neste trabalho é que o genótipo tolerante, mesmo submetido ao estresse (50 mM NaCl durante 72 horas) foi capaz de manter a atividade hidrolítica da P-ATPase similar ao controle e, paralelamente reduziu a atividade de V-ATPase, o que sugere que o mecanismo de tolerância à salinidade é a extrusão de Na^+ para o apoplasto. O genótipo sensível por sua vez reduziu a atividade da P-ATPase sob condições de estresse e manteve a atividade hidrolítica da V-ATPase similar ao controle, sugerindo uma estocagem do Na^+ no vacúolo. Trabalhos prévios do grupo (Cunha et al., 2006) demonstram um maior acúmulo de Na^+ no genótipo Berlin (sensível) do que no Thap Maeo (tolerante). Outros genótipos de bananeira apresentam este mesmo mecanismo (Gomes et al., 2005). Em função da transpiração, tende a ocorrer acúmulo de Na^+ nas folhas, sobretudo quando o genótipo não

possui mecanismo de extrusão deste cátion para o apoplasto em seu sistema radicular. Quando o mecanismo de extrusão de Na^+ do citoplasma ocorre, predominante na forma de compartimentalização no vacúolo, é freqüente que o acúmulo dos mesmos exceda a capacidade de tolerância da planta, ocorrendo danos, como clorose e necrose observados no genótipo Berlin (Cunha et al., 2006).

A atividade hidrolítica da F-ATPase (mitocondrial), nas plantas controle estabilizou-se após os 30 minutos de reação, o que não ocorreu nas plantas tratadas nos dois genótipos de bananeira estudados. Os resultados encontrados nesse trabalho, ou seja, a não estabilização das atividades das F-ATPases mitocondriais, podem indicar um aumento da demanda por ATP no processo respiratório das plantas tratadas, talvez para suprir a demanda energética da célula nas condições estressantes.

As bombas de prótons em plantas são muito sensíveis a mudanças na composição lipídica de suas membranas de suporte (Kasamo e Sakakibara, 1995; Grandmougin-Ferjani et al., 1997). Sabe-se que os efeitos de vários estresses ambientais em plantas são mediados, pelo menos parcialmente, por um aumento na geração de ROS (Alscher et al., 1997; Hernández et al., 2001; Able et al., 2003). Frequentemente é relatado que o estresse salino induz danos oxidativos nos tecidos vegetais (Gómez et al., 1999; Hernández et al., 2001; Uchida et al., 2002; Mittova et al., 2003; Chaparzadeh et al., 2004), e a peroxidação lipídica tem sido freqüentemente usada com um indicador de estresse oxidativo quando as plantas são submetidas à salinidade. Dionísio-Sese e Tobita (1998) relataram um aumento na peroxidação de lipídios em folhas de arroz durante estresse salino. Sudhakar et al., 2001, também reportaram que a formação de MDA foi alta na variedade sensível de amora (*Morus alba* L.),

enquanto a variedade tolerante não mostrou mudança no conteúdo de MDA submetidas ao estresse salino.

Os dados obtidos na cultivar sensível de bananeira, Berlin, mostraram uma tendência ao aumento na concentração de MDA de, aproximadamente, 30% após 24 horas e um aumento significativo após 48 horas de tratamento salino. Ben-Amor et al. (2006), mediram a peroxidação de lipídios nas folhas de dois acessos da halófito *Cakile maritima*. No acesso sensível, a acumulação de MDA foi significativamente mais alta que no tolerante. Neste acesso, os tratamentos com 100, 200 e 400 mM NaCl causaram, respectivamente, aumentos de 3, 4 e 9 vezes no conteúdo de MDA quando comparados com as plantas controle. No acesso mais tolerante, o conteúdo de MDA decresceu em 17% com 100 mM NaCl e aumentou significativamente aos 200 e 400 mM NaCl para 83 e 233% do controle, respectivamente. Os dados desses autores, comparando os dois acessos deste trabalho, mostraram que o nível de peroxidação de lipídios foi menor no tolerante do que no sensível, e a diminuição da permeabilidade da membrana foi menos pronunciada nas células do acesso tolerante do que no sensível. A melhor proteção do acesso tolerante aos danos do estresse oxidativo pode ser resultado de uma atuação mais eficiente do sistema antioxidativo, enquanto que o maior distúrbio na estabilidade da membrana e o maior aumento no MDA no sensível, refletem um alto dano oxidativo (Dionísio-Sese e Tobita, 1998; Hernández et al., 2000, Sreenivasula et al., 2000; Bor et al., 2003; Ben-Amor et al., 2005).

Os principais locais de produção de ROS em células vegetais são as organelas com altas atividades metabólicas de oxigenação ou com fluxo substancial de elétrons, que são: cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Em tecidos não fotossintéticos, como é o caso das raízes de bananeira, as mitocôndrias são os principais locais fontes de ROS (Garczarska et al., 2004).

Stepien e Klobus (2005), trabalhando com folhas de trigo (C_3) e milho (C_4) submetidas a tratamento com sal, demonstraram que o nível de peroxidação de lipídios nas plantas controle foram similares para as duas espécies. O tratamento com NaCl nas duas plantas, trigo e milho, causou um evidente aumento no MDA, proporcionalmente com a concentração de sal na solução nutritiva. Nas sementes de trigo crescendo em solução salina, o nível de MDA aumentou gradualmente até o fim do experimento, e no oitavo dia, foram alcançados os valores de 155, 265 e 290% em 50, 100 e 150 mM NaCl respectivamente. Nas variedades de milho, o aumento de MDA persistiu até o quarto dia de tratamento ao sal e subseqüentemente ou estabilizou ou diminuiu levemente.

No presente trabalho, os genótipos de bananeira submetidos à salinidade apresentaram uma concentração de MDA inferior ao controle após 72 horas de tratamento. Possivelmente essa inversão dos valores da peroxidação nas duas cultivares esteja associada à aclimação, ou seja, uma estratégia de resistência da planta para se ajustar ao estresse (Bray et al., 2000), salientando-se que o genótipo tolerante apresentou os menores valores de MDA. Um dos mecanismos de combate às espécies reativas de oxigênio, as enzimas antioxidantes, podem ter se expressado em maior grau, conferindo essa aclimação às plantas e atingindo assim uma nova homeostase metabólica.

Conforme os resultados apresentados, a cultivar Thap Maeo, mais tolerante ao sal que a Berlin, não mostrou diferença no conteúdo de MDA, às 24 e 48 horas, entre as plantas controle e as tratadas. Parida et al., (2004), trabalhando com folhas de *Bruguiera parviflora* tratadas com diferentes concentrações de NaCl, também não detectaram mudança significativa na peroxidação de lipídios durante o período de 45 dias de tratamento, o que sugere que os danos oxidativos são largamente controlados por enzimas antioxidantes. Esses resultados estão

de acordo com o reportado por Hernández et al. (1995) em ervilha tolerante ao sal, os quais propõem que elevados níveis de enzimas antioxidantes protegem as plantas das espécies reativas de oxigênio, deste modo evitando a peroxidação de lipídios durante o estresse salino.

Em relação ao extravasamento de eletrólitos de membrana em bananeira, não houve diferença significativa entre os tratamentos salinos com três dias de duração quando comparado ao tratamento controle, em ambos os genótipos aqui estudados. A porcentagem de integridade relativa (PIR) mede o aumento do extravasamento do conteúdo celular, devido ao aumento da fluidez das membranas em decorrência de injúrias, dentre elas as altas temperaturas (Ahrens e Ingram, 1988), estresse hídrico (Monteiro de Paula et al., 1990) e estresse salino (Ben-Amor et al., 2006).

Pimentel et al., (2002) avaliaram a liberação de eletrólitos em discos foliares e detectaram diferenças entre os dois genótipos de feijão caupi submetidos a estresse hídrico durante 10 e 17 dias. A porcentagem de integridade relativa (PIR) de plantas estressadas foi maior para o genótipo que considerou-se ser o mais tolerante, pois este apresentou maior retenção de eletrólitos.

Ben-Amor et al., (2006), trabalhando com dois cultivares da halófito *Cakile maritima*, submetidos a 0, 100, 200, 300 e 400 mM de NaCl, durante 20 dias, observaram que o extravasamento de eletrólitos aumentou em todos os tratamentos e foi mais significativo no genótipo sensível, quando comparado com o tolerante.

A partir dos dados obtidos observou-se que o genótipo tolerante, Thap Maeo, manteve a atividade da P-ATPase similar ao controle, mesmo em condições de estresse, o que permite a manutenção do gradiente de prótons necessário para o transporte secundário da extrusão de Na⁺ do citoplasma para o apoplasto. Nesse genótipo, as concentrações de MDA foram também

similares ao controle, o que, por sua vez, sugere que a integridade das membranas celulares foram mantidas, visto que não houve acúmulo de radicais livres que levam à peroxidação dos lipídios de membrana.

A cultivar Berlin apresentou uma redução na atividade da P-ATPase paralelamente a um aumento na peroxidação lipídica, quando as plantas foram submetidas ao estresse salino, mostrando uma maior sensibilidade deste genótipo à salinidade.

No que se refere ao extravasamento de eletrólitos, o mesmo não foi afetado pela salinidade, nem variou entre os genótipos, sugerindo que esta técnica não tem a sensibilidade necessária para detectar diferenças genotípicas de bananeira submetida à 50 mM NaCl.

REFERÊNCIAS

- Able AI, Sutherland MW, Guest DI (2003) Production of reactive oxygen species during non-specific elicitation, non-host resistance and field resistance expression in cultures of tobacco cells. *Func. Plant. Biol.* 30:91-99.
- Ahrens MJ, Ingram DL (1988) Heat tolerance of citrus leaves. *Hort Sci.* 23:747-748.
- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997) Reactive oxugen species and antioxidants; relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100:224-233.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53:1331-1341.
- Bandeoglu E, Eyidogan F, Yucel M, Oktem HA (2004) Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. *Plant Growth Reg.* 42: 69-77.
- Ben-Amor N, Ben Hamed K, Debez A, Grignon G, Abdelly C (2005) Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. *Plant Sci.* 168:889-899.

- Ben-Amor N, Jimenez A, Megdiche W, Lundqvist M, Sevilla F, Abdely C (2006). Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. *Physiol. Plant.* 126:446-457.
- Blumwald E (2000) Sodium transport and salt tolerance in plant cells. *Current Opinion of Cell Biology* 12:76-112.
- Bor M, Ozdemir F, Turkan I (2003) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Sci.* 164:77-84.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-253.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds), *Biochemistry & Molecular Biology of Plant Physiologists*, Rockville.
- Cavalcanti FR, Oliveira JTA, Martins-Miranda AS, Viégas RA, Silveira JAG (2004) Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytol.* 164:563-571.
- Chaparzadeh N, D'Amico ML, Khavari-Nejad RA, Izzo R, Navari-Izzo F (2004) Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 42:695-701.
- Cunha PC, Camara TR, Willadino LG (2006) Teores de Cl⁻, Na⁺ e K⁺ de três cultivares de bananeira cultivadas sob diferentes níveis de sal. *Anais da XXIX Reunião Nordestina de Botânica.*

- Dionisio-Sese ML, Tobita S (1998) Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* 135:1-9.
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981) Leaf senescence: correlated with increases levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreases levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32:93-101.
- Façanha AR, De Meis L (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiol.* 116:1487-1495.
- Fiske CF, Subbarow Y (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375.
- Flowers TJ, Koyana ML, Flowers SA, Sudhakar c, Singh KP, Yeo AR (2000) QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. *J. Exp. Bot.* 51:99-106.
- Foyer CH, Noctor G (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.* 146:359-388.
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 119:355-364.
- Garczarska M, Bednarski W, Morkunas I (2004) Re-aeration-induced oxidative stress and antioxidative defenses in hypoxically pretreated lupine roots. *J. Plant Physiol.* 161:415-422.
- Gechev T, Gadjev I, Van Breusegem F, Inze D, Dukiandjiev S, Toneva V, Minkov I (2002) Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cel. Mol. Life Sci.* 59:708-714.
- Giannini JL, Briskin DP (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiol.* 84:613.

- Gomes EWF, Willadino L, Martins LSS, Silva SO, Camara TR (2005) Variabilidade genética de genótipos de bananeira (*Musa* spp) submetidos ao estresse salino. Rev. Brasil. Eng. Agr. Amb. 9: 171-177.
- Gómez JM, Hernández JÁ, Jiménez A, Del Rio LA, Sevilla F (1999) Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. Free Radic. Res. 31:511-518.
- Grandmougin-Ferjane A, Schuler-Muller, Hartmann MA (1997) Sterol modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. Plant Physiol 113:165-174.
- Herbette S, Lenne C, de Labrouhe DT, Drevet JR, Roedel-Drevet P (2002) Transcripts of sunflower antioxidant scavengers of the SOD and GPX families accumulate differentially in response to downy mildew infection, phytohormones, reactive oxygen species, nitric oxide, protein kinase and phosphatase inhibitors. Physiol. Plant. 119:418-428.
- Hernández JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, del Rio LA (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. Plant Sci. 105:151-167.
- Hernández JA, Jimenez A, Mullineaux P, Sevilla F (2000) Tolerance of pea plants (*Pisum sativum*) to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. Plant Cell. Environ. 23:853-862.
- Hernández JA, Ferrer MA, Jiménez A, Ros-Barceló A, Sevilla F (2001) Antioxidant system and O₂/H₂O₂ production in the apoplast of *Pisum sativum* L. Leaves: its relation with NaCl-induced necrotic lesions in minor veins. Plant Physiol, 127:817-831.
- Janicka-Russak M, Klobus G (2006) Modification of plasma membrane and vacuolar H⁺-ATPases in response to NaCl and ABA. J. Plant Physiol. article in press.

- Kasamo K, Sakakibara Y (1995) The plasma membrane H⁺-ATPase from higher plants: functional reconstitution into liposomes and its regulation by phospholipids. *Plant Sci.* 111:117-131.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9:490-498.
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M (2003) Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in responses to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerance tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell Environ.* 26:845-856.
- Monteiro de Paula F, Pham Thi AT, Vieira da Silva J, Justin AM, Demandre C, Mazliak P (1990) Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. *Plant. Sci.* 66:185-193.
- Munns R, Husain S, Rivelli AR, James RA, Condon AGT, Lindsay MP, Lagudah ES, Schachtman DP, Hare RA (2002) Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant Soil* 247: 93-105.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 53:1237-1247.
- Parida AK, Das AB, Mohanty P (2004) Investigations on the antioxidative defense responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes. *Plant Growth Reg.* 42:213-226.
- Pimentel C, Sarr B, Diouf O, Abboud ACS, Macauley HR (2002) Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivados em campo. *Revista Universidade Rural, Série: Ciências da Vida*: 22 (1):07-14.

- Sreenivasula N, Grimm B, Wobus U, Weschke W (2000) Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiol. Plant.* 109:435-441.
- Stepien P, Klobus G (2005) Antioxidant defense in the leaves of C₃ and C₄ plants under salinity stress. *Physiol. Plant.* 125:31-40.
- Sudhakar C, Lakshmi A, Giridarakumar S (2001) Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Sci.* 161:613-619.
- Uchida A, Jagendorf AT, Hibino T, Takabe T, Takabe T (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci.* 163:515-523.
- Vaidyanathan H, Sivakumar P, Chakrabarty R, Thomas G (2003) Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) – differential response in salt-tolerance and sensitive varieties. *Plant Sci.* 165:1411-1418.
- Vasquez-Tello A, Zuily-Fodil Y, Pham Thi AT, Viera de Silva JB (1990) Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. *J. Exp. Bot.* 228: 827-832.
- Wang B, Luttge U, Ratajczak R (2001) Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-Ppase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *J. Exp. Bot.* 52: 2355-2365.
- Willadino LG, Camara TR (2004) Origen y naturaleza de los ambientes salinos. In: *La Ecofisiología Vegetal: Una Ciencia de Síntesis*. Thomson Editores Spain. Madrid, 1ed.
- Willadino LG, Camara TR (2005) Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. In: *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*. MXM Gráfica e Editora. Recife - Brasil.

Xiong L, Zhu JK (2001) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress.

Plant Cell Environ. 25:131-139.

Yang YL, Guo JK, Zhang F, Zhao LQ, Zhang LX (2004) NaCl induced of the H⁺-ATPase in

root plasma membrane of two wheat cultivars. Plant Sci. 166:913-918.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Atividade da P-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Berlin) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h.

Figura 2: Atividade da P-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Thap Maeo) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h.

Figura 3: Atividade da V-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Berlin) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h.

Figura 4: Atividade da V-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Thap Maeo) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h.

Figura 5: Atividade da F-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Berlin) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h.

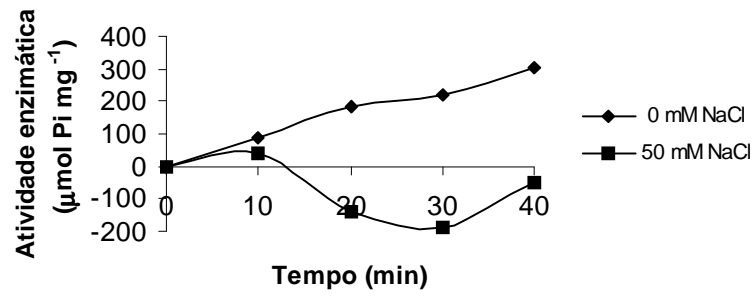
Figura 6: Atividade da F-ATPase de primórdios radiculares de *Musa* spp (genótipo Thap Maeo) submetidos a 50 mM NaCl por 72 h.

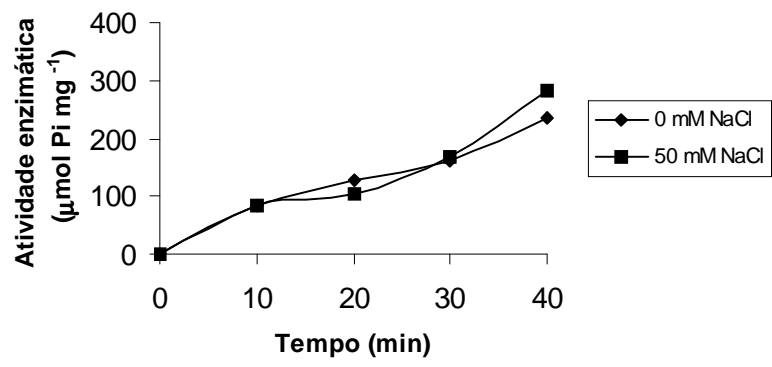
Figura 7: Peroxidação Lipídica em raiz de *Musa* spp (genótipo Berlin) submetida à salinidade por 24, 48 e 72h , medida pela concentração de Malondialdeido (MDA).

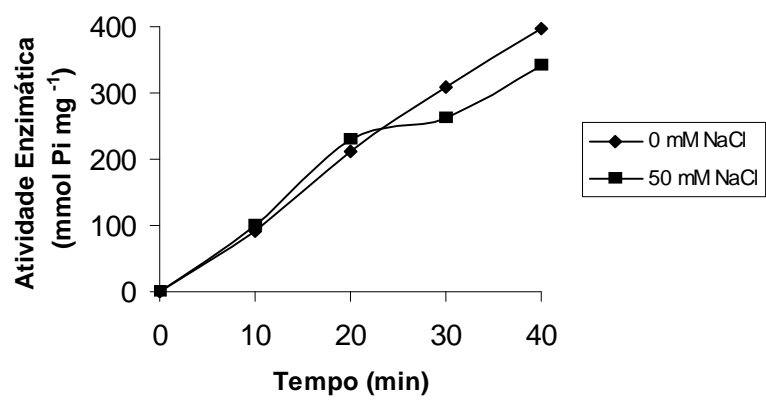
Figura 8: Peroxidação Lipídica em raiz de *Musa* spp (genótipo Thap Maeo) submetida à salinidade por 24, 48 e 72 h, medida pela concentração de Malondialdeido (MDA).

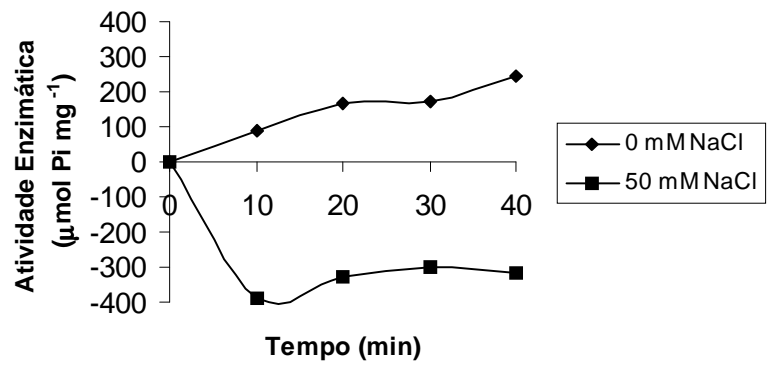
Figura 9: Extravasamento de eletrólitos, medido pela porcentagem de integridade relativa das membranas de raízes de dois genótipos de *Musa* spp submetidos a tratamento com 50 mM de NaCl por 24, 48 e 72 h.

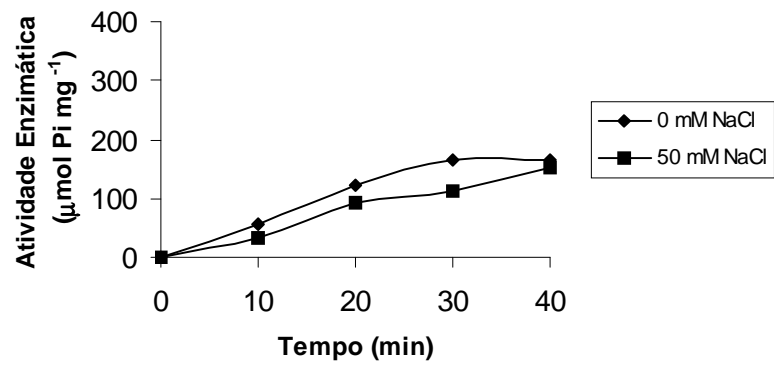
FIGURAS

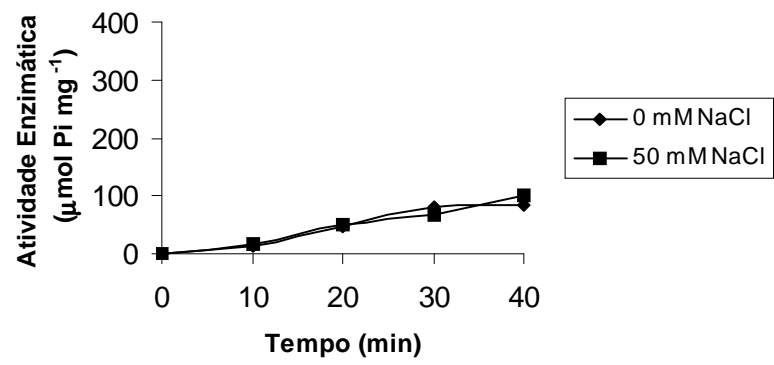


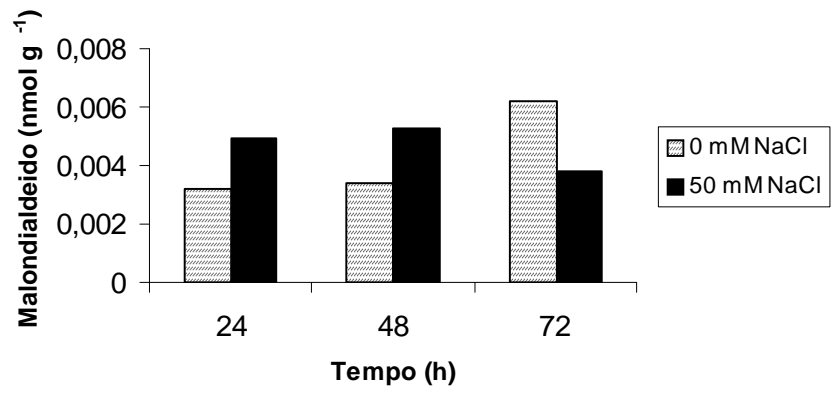


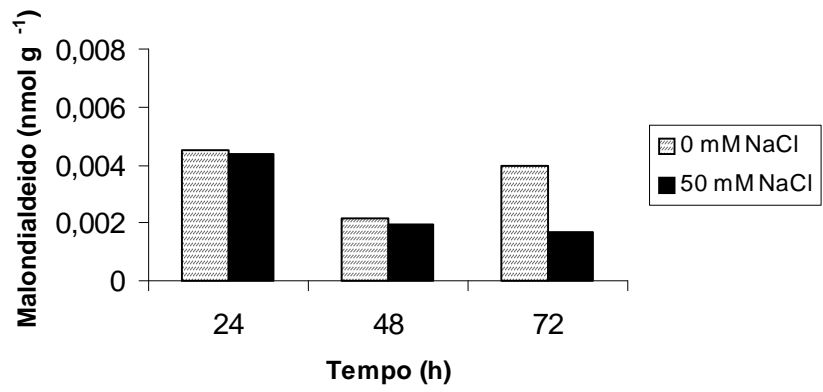


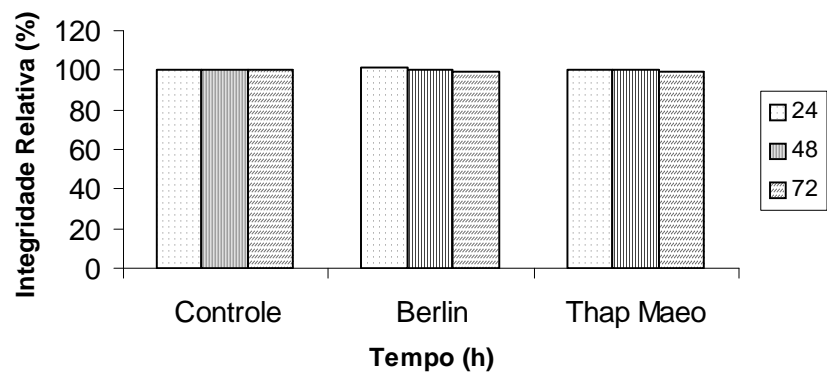












CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resposta de vegetais ao estresse salino envolve uma série de ajustes fisiológicos e metabólicos. Variações nestas respostas, muitas vezes constituem mecanismos de tolerância à salinidade.

Neste trabalho, utilizou-se para a avaliação de genótipos contrastantes (tolerante x sensível) a atividade de H⁺-ATPases e a oxidação de lipídios de membranas. Estas variáveis permitiram a diferenciação dos genótipos Thap Maeo, tolerante, do Berlin, sensível.

ANEXO

Normas do Brazilian Journal of Plant Physiology para envio de trabalhos

BRAZILIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY - BJPP

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Editor Chefe:

Fábio M. DaMatta, Universidade Federal de Viçosa, Brasil

Editor Assistente:

Marcelo E. Loureiro, Universidade Federal de Viçosa, Brasil

ESCOPO E POLÍTICA

Brazilian Journal of Plant Physiology - BJPP (ISSN 0103-3131) é o periódico oficial da Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal e voltado para a publicação de trabalhos científicos originais nas várias áreas da Fisiologia Vegetal. BJPP publica trabalhos regulares, comunicações, minirrevisões e minirrevisões brasileiras. Essas minirrevisões são publicadas mediante convite, mas autores também podem consultar o Editor-Chefe para o envio de um artigo. Minirrevisões Brasileiras devem versar, preferentemente, sobre a fisiologia de plantas de ecossistemas tropicais naturais. BJPP publica artigos nas seguintes áreas de conhecimento:

Processos Bioquímicos (Metabolismo primário e secundário, e bioquímica)

Fotobiologia e Processos Fotossintéticos

Regulação Gênica, Transformação, Biologia Celular e Molecular

Nutrição Mineral de Plantas

Desenvolvimento, Crescimento e Diferenciação (Fisiologia de sementes, hormônios vegetais e morfogênese)

Fisiologia Pós-Colheita

Ecofisiologia/Fisiologia da Produção e Fisiologia do Estresse

Interações Planta-Microrganismos e Planta-Insetos

Instrumentação em Fisiologia Vegetal

BJPP somente publica trabalhos na língua inglesa, escritos de forma clara, concisa e fluente. Recomenda-se que o texto seja revisado por alguém fluente em inglês e familiarizado com terminologia e textos científicos. Os artigos enviados para publicação devem apresentar resultados novos e significantes. Isso é particularmente importante para trabalhos na área de Cultura de Células, Tecidos e Órgãos Vegetais, que devem basear-se em dados que contribuam para a compreensão da fisiologia de plantas. Simples experimentação sobre a aplicação de métodos já existentes não será considerada para publicação, tampouco trabalhos originados de experimentos do tipo dose-resposta, sem discussão com base fisiológica.

SUBMISSÃO E REVISÃO

A submissão de um manuscrito ao Editor-Chefe necessariamente implica no fato de que o trabalho não foi publicado ou que está sendo avaliado para publicação em outro periódico. Submissão de manuscritos de vários autores significa que o autor correspondente obteve a aprovação de todos os outros co-autores para submeter o manuscrito a BJPP. BJPP considera que todas as informações contidas em um artigo são de completa responsabilidade dos autores, inclusive a exatidão dos resultados e as conclusões deles extraíveis. Os autores devem enviar o manuscrito (em um único arquivo contendo texto como também tabelas, legendas para figuras e figuras) mediante e-mail para o Editor-Chefe. Solicita-se também aos autores que submetam um arquivo adicional contendo apenas o "abstract". Arquivos com extensão pdf ou doc (Word) são preferíveis. Fotografias importantes ou essenciais para a compreensão dos resultados têm de ter alta qualidade. Ao submeter um manuscrito, o Editor-Chefe verificará se o trabalho está dentro do escopo de BJPP e se segue as diretrizes do periódico. Submissões que não respeitarem as diretrizes de BJPP serão devolvidas imediatamente aos autores para correção, antes de serem enviadas para revisão. Os manuscritos serão enviados a um Editor Associado, que escolherá revisores baseando-se em suas competências nas várias áreas especializadas da fisiologia vegetal. Quando da submissão, os autores poderão indicar até cinco revisores potenciais (com seus respectivos e-mails) com competência reconhecida na área de pesquisa do manuscrito. Todavia, ao Editor Associado é reservado o direito de não considerar essas sugestões. Os autores receberão uma carta do Editor-Chefe juntamente com as avaliações dos revisores. Manuscritos que necessitarem de revisão deverão ser retornados ao Editor-Chefe dentro de 30 dias; caso contrário, serão considerados como submissões novas. A versão revisada deverá ser enviada via e-mail e deve ser acompanhada de uma carta em que se responde aos questionamentos dos revisores e do editor. Os autores deverão justificar claramente quando não concordarem, ou quando não acatarem, um dado questionamento. Solicita-se aos autores que utilizem o aplicativo "Microsoft Word for Windows 95-2003" como processador de textos. Manuscritos rejeitados para publicação somente serão devolvidos aos autores se contiverem comentários importantes dos revisores que possam contribuir para as pesquisas do autor.

DIRETRIZES PARA A ORGANIZAÇÃO DE MANUSCRITOS

Os autores deverão organizar o manuscrito na seguinte forma:

Manuscrito

Formatar o manuscrito, baseando-se em artigos recentemente publicados em BJPP. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, inclusive figuras e tabelas. As linhas de cada página deverão ser numeradas para facilitar o trabalho de revisão. Na primeira página, inclua o título do manuscrito (em negrito, fonte 16, justificado à esquerda, com inicial maiúscula apenas para a primeira palavra - quando aplicável), os nomes dos autores (em negrito, fonte 12, justificado à esquerda) e afiliação (em itálico, fonte 12, justificado à esquerda). O autor correspondente deverá ser indicado por um asterisco. O "Abstract" não deve conter mais que 250 palavras. Os autores devem sugerir de três a seis palavras-chave (em ordem alfabética) que não constem no título. O texto deve ser digitado em espaço duplo, fonte "Times New Roman" (fonte 12) em apenas um lado do papel, com margens de 3 cm. Os manuscritos devem ser divididos em Introdução; Materiais e métodos; Resultados; Discussão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Legenda para figuras; e Figuras. Partes principais (e.g., Introdução, Resultados etc.)

deverão estar em negrito, com letras maiúsculas e separadas do texto. Dentro dessas partes, subdivisões deverão estar em itálico, com apenas a letra inicial maiúscula. Apresentação conjunta de "Resultados e Discussão" só será aceita em circunstâncias excepcionais. A "Discussão" não deve conter repetição da descrição dos resultados. Nomes científicos deverão ser escritos em itálico. O nome científico completo (gênero, espécie, autoridade, e cultivar, quando apropriado) deverá ser citado para cada organismo, após a sua primeira menção. O epíteto genérico deverá ser abreviado após a primeira menção, desde que não resulte em conflito com abreviaturas para outros gêneros com a mesma letra inicial. Quando nomes comuns forem utilizados, deverão ser acompanhados dos respectivos nomes científicos após a primeira menção. Nomes de equipamentos especializados mencionados em "Material e métodos" deverão ser acompanhados de detalhes do modelo, fabricante, cidade e país de origem. Os nomes de enzimas deverão ser acompanhados de seu EC ("Enzyme Commission") após a primeira menção. Números de zero a nove deverão ser escritos por extenso, a menos que sejam acompanhados de uma unidade. Acima de dez, números deverão ser escritos com algarismos arábicos, exceto quando em início de frases. Datas deverão estar na forma "20 May 2006", e horas, na forma de 1200 h. Citações de literatura, ao longo do texto, deverão aparecer em ordem cronológica e, então, ordenadas por autor e ano (e.g., Styles, 1978; Meier and Bowling, 1995; Meier et al., 1997; Silva et al., 2004a, b). Não use "et al." em itálico. Sempre insira espaço entre um numeral e a unidade (por exemplo, 1 mL), com exceções de %, ‰ e °C (e.g., 1%). Apenas utilize o termo "in press" para artigos já aceitados para publicação, caso contrário, utilize a expressão "unpublished results". Observações não-publicadas ou comunicações pessoais devem ser mencionadas no texto (e.g., "T. Carter, personal communication"; "T. Carter and J. Spanning, unpublished results"). Evite citar teses. Títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o "*Bibliographic Guide for Editors and Authors - BIOSIS*". O último fascículo de cada volume de BJPP contém abreviaturas para a maioria dos periódicos científicos relacionados à fisiologia vegetal e áreas afins.

"Short Communications"

"Short Communications" poderão ser publicadas, mas sem a intenção de publicação de resultados preliminares. Devem ser concisas e conter resultados significantes. Não devem ter mais que 10 páginas digitadas em espaço duplo, incluindo tabelas e figuras. Devem ser enviadas com a primeira página seguindo as orientações para manuscritos regulares, mas sem subdivisões. As referências deverão seguir o texto.

"Minireviews"

Em "Minireviews", os autores são livres para sugerir a estrutura do artigo, mas tabelas e figuras deverão seguir as diretrizes para a publicação de manuscritos em BJPP. "Minireviews" serão também avaliadas por revisores. Deverão ser apresentadas concisamente, com foco em assuntos relevantes de pesquisa em que se evidencie o estado-da-arte das informações disponíveis, devendo ainda servir de referência para estudos futuros. "Minireviews" deverão ser apresentadas em espaço duplo, contendo não mais que 20 páginas.

Referências

Referências de periódicos

Carelli MLC, Fahl JI, Ramalho JDC (2006) Aspects of nitrogen metabolism in coffee plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 18:9-21.

Referências de livros

Salisbury FB, Ross CW (1992) Plant Physiology. 4th ed. Wadsworth Publishing Company, Belmont.

Referências de capítulos de livros

Fujiwara K, Kozai T (1995) Physical and microenvironment and its effects. In: Aitken-Christie A, Kozai T, Smith MAL (eds), Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, pp.301-318. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Anais de conferências e resumos publicados

Prisco JT, Pahlich E (1989) Recent advances on the physiology and salt stresses. In: Annals (or Proceedings/Abstracts) of the II Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal. Piracicaba, Brazil, pp.23-24.

Teses

Melotto E (1992) Characterization of endogenous pectin oligomers in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruit. Davis, University of California. PhD thesis.

Tabelas e Figuras

Figuras e tabelas não devem repetir dados e devem ser reduzidas ao mínimo necessário. Devem ser numeradas consecutivamente, com números arábicos e, no texto, menções para tabelas e figuras devem aparecer na forma de "Table 1", "Figure 1", "Figure 1A"...Títulos para figuras e tabelas deverão estar também em espaço duplo. Utilize a formatação de tabelas usando células, não utilizando as teclas "tab" ou teclas de espaço para formatação. Utilize apenas linhas horizontais para a divisão das tabelas. Notas de rodapé para tabelas devem ser feitas com fonte de tamanho 10 e indicadas por meio de letras sobrescritas minúsculas, começando com a em cada tabela. Cada tabela e figura deve ser apresentada em página separada do manuscrito, e nunca devem ser incluídas no texto. Títulos de figuras devem ser digitados em uma página separada, antecedendo às páginas das figuras. Textos e números nas ordenadas das figuras não devem ser digitados com fonte de tamanho inferior a 10. Todas as figuras deverão ter tamanho que permita reprodução direta para impressão. Fotografias eletrônicas devem ser submetidas no tamanho desejado de impressão (85 mm de largura para uma coluna e até 175 mm para acompanhar a largura da página). BJPP reserva-se ao direito de reduzir o tamanho das figuras.

Unidades, símbolos e abreviaturas

O Sistema Internacional (SI) de unidades deve ser usado ao longo do manuscrito. Recomenda-se o livro ("Units, Symbols and Terminology for Plant Physiology", editado por F.B. Salisbury, Oxford University Press, Oxford) para uma descrição detalhada e útil sobre unidades, símbolos e terminologia utilizados em fisiologia vegetal e ciências afins. Resumidamente, use pascal (Pa) para pressão, L para litro, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para irradiância, becquerel (Bq) para radioatividade, gn (*g* em itálico) para aceleração devido à gravidade, s para segundo, min para minuto, h para hora, Da para indicar massa molecular, que é representada por *m* (massa molecular relativa de proteínas é o mesmo que peso molecular, *Mr*, e não deve ser acompanhado por Da; e.g., a massa molecular relativa *Mr* = 10,000), ψ_w para potencial hídrico, (ψ_p para potencial de pressão, ψ_s para potencial osmótico, e ψ_m para potencial mátrico. O último fascículo de cada volume de BJPP contém vários símbolos e unidades usadas em fisiologia vegetal. Recomendam-se abreviaturas apenas para unidades de medida, símbolos químicos (e.g., Fe, Na), nomes de substâncias químicas (e.g., ATP, MES,

HEPES, H₂SO₄, NaCl, CO₂), procedimentos corriqueiros (e.g., PCR, PAGE, RFLP), terminologia molecular (e.g., bp, SDS) ou termos estatísticos (e.g., ANOVA, SD, SE, *n*, *F*, teste *t* e *r*²). Outras abreviaturas devem ser escritas por extenso após a primeira menção, não devendo ser utilizadas em início de frases. Abreviações de termos científicos não devem ser seguidas de ponto. Use o índice *menos* para indicar "por" (e.g., m⁻³, L⁻¹, h⁻¹), exceto nos casos "por planta", "por vaso". O autor poderá fornecer, caso julgue conveniente, uma lista de abreviaturas, como um Apêndice.

Ilustrações

Fotografias devem ter alta qualidade e incluídas no fim do texto. O número de fotografias deve ser reduzido ao mínimo. Linhas nas figuras devem ter espessuras uniformes. Texto e números devem ter dimensões apropriadas.

Provas de imprensa

Autores devem devolver as provas de imprensa de seus manuscritos dentro de três dias após o recebimento. Não serão aceitas alterações extensas.

Separatas

Os autores receberão um arquivo em formato PDF como separata.

Custos de página

Não há custos para os autores ao publicarem seus manuscritos em BJPP.