

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**MECANISMOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA CANA-DE-
AÇÚCAR SOB ESTRESSES INDUZIDOS POR DEFICIÊNCIA
HÍDRICA E PARAQUAT**

CLAUDIANA MOURA DOS SANTOS

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para a obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP

Março – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**MECANISMOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA CANA-DE-
AÇÚCAR SOB ESTRESSES INDUZIDOS POR DEFICIÊNCIA
HÍDRICA E PARAQUAT**

CLAUDIANA MOURA DOS SANTOS

Orientador: Prof. Dr. **Marcelo de Almeida Silva**

Co-orientadora: Profa. Dra. **Giuseppina Pace Pereira Lima**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de
Botucatu, para a obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Agricultura).

BOTUCATU - SP

Março – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S237m Santos, Claudiana Moura dos, 1982-
Mecanismos fisiológicos e bioquímicos da cana-de-açúcar sob estresses induzidos por deficiência hídrica e paraquat / Claudiana Moura dos Santos. - Botucatu : [s.n.], 2013 xiii, 93 f. : il. Color., fots. color., gráfs., tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2013
Orientador: Marcelo de Almeida Silva
Co-orientadora: Giuseppina Pace Pereira Lima
Inclui bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Plantas - Efeito da seca. 3. Paraquat. 4. Cana-de-açúcar - Efeito do stress. 5. Cana-de-açúcar - Efeito fisiológico. 6. Plantas - Efeito dos herbicidas. 7. Plantas - Resistência a seca. 8. Stress oxidativo. 9. Drought-tolerant. I. Silva, Marcelo de Almeida. II. Lima, Giuseppina Pace Pereira. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

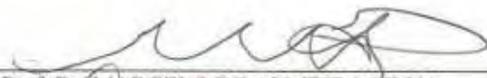
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

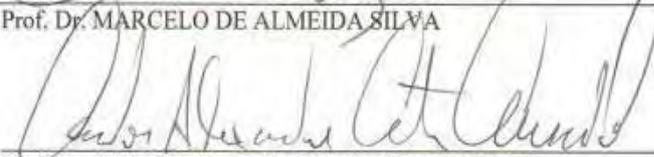
TÍTULO: MECANISMOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA CANA-DE-
AÇÚCAR SOB ESTRESSES INDUZIDOS POR DEFICIÊNCIA
HÍDRICA E PARAQUAT

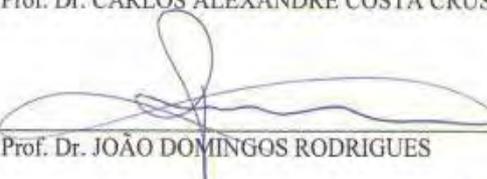
ALUNA: CLAUDIANA MOURA DOS SANTOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCELO DE ALMEIDA SILVA
CO-ORIENTADORA: Profª. Dra. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

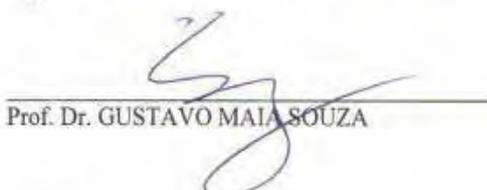
Aprovado pela Comissão Examinadora


Prof. Dr. MARCELO DE ALMEIDA SILVA


Prof. Dr. CARLOS ALEXANDRE COSTA CRUSCIOL


Prof. Dr. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES


Prof. Dr. LAURÍCIO ENDRES


Prof. Dr. GUSTAVO MAIA SOUZA

Data da Realização: 27 de março de 2013.

Aos meus queridos pais Quitéria Carlos dos Santos e Cícero Moura dos Santos, pela dedicação e apoio ao longo de minha formação, e pelo contínuo estímulo à realização dos meus sonhos.

As minhas irmãs Claudia Moura dos Santos e Claudenice Moura dos Santos tão importantes em todos os momentos da minha vida.

Dedico

...Toda vitória é ALCANÇADA com luta e sofrimento. Porém, a luta passa, o sofrimento é apenas temporário, e a VITÓRIA que se consegue PERMANECE...

James Allen

AGRADECIMENTOS

A Deus, infinitamente bom, que o Vosso nome seja bendito pelos benefícios que me concedestes;

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Agricultura, UNESP-FCA, Departamento de Agricultura e Melhoramento Vegetal, pela oportunidade da realização do Curso de Doutorado;

Ao Prof. Dr. Marcelo de Almeida Silva pelo incentivo, orientação, dedicação, ensinamentos, compreensão, confiança e amizade, a minha eterna gratidão;

A Profa. Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima pela co-orientação, pelo suporte técnico-científico, e valiosos ensinamentos, paciência, compreensão e amizade;

Ao Prof. Dr. Niranjan Baisakh- Louisiana State University Agricultural Center, pelo acolhimento, amizade e ensinamento e por permitir que mais um sonho fosse concretizado;

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de Doutorado e Doutorado Sanduíche concedidas;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo financiamento do projeto;

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA, da cidade de Jaú - SP, por conceder instalação e infra-estrutura para a realização do experimento;

A minha querida equipe Marcela Cristina Brunelli, Fernanda Bortolheiro, Lucas Almeida de Holanda, Rodrigo Oliver, Marcel Tomás Arantes, Magno Abreu e Paula Sorrilla pela ajuda na condução do experimento, momentos de descontrações e companheirismo;

A todos os amigos que fiz ao longo da minha caminhada do doutorado em especial Eumenens Tavares, Clíssia Barbosa, Roselaine Araldi, Thaíse Ribeiro, Adriana Tanaka, Natália Corniani, Anthony Almeida, Renata Marques, Renata Pincelli, Bárbara Rodrigues, Luciana Borges, Ilca Puertas, Ana Carolina Kummer e Pedro Bento por todo apoio, paciência, conselhos e amizade;

Aos meus pais Cícero e Quitéria, minhas irmãs Cláudia e Claudenice, meus cunhados Flávio e Alberto e aos meus queridos sobrinhos Matheus e Lara pelo apoio incondicional, pelo estímulo, amor e carinho.

A todos meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | VII |
| LISTA DE FIGURAS..... | IX |
| LISTA DE TABELAS..... | XII |
| 1 RESUMO..... | 1 |
| 2 SUMMARY..... | 3 |
| 3 INTRODUÇÃO..... | 5 |
| 4 REVISÃO DE LITERATURA..... | 8 |
| 4.1 A importância do uso de atributos fisiológicos e bioquímicos na seleção de cultivares tolerantes à seca..... | 8 |
| 4.2 Ações dos sistemas antioxidantes enzimáticos em resposta ao estresse oxidativo induzido pela deficiência hídrica em cana-de-açúcar e outras culturas agrícolas..... | 11 |
| 4.3 Efeitos do paraquat na atividade de enzimas antioxidantes e danos no cloroplasto.... | 16 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 5.1 Condução do experimento e material vegetal..... | 20 |
| 5.2 Experimento I (Deficiência hídrica e Reidratação)..... | 21 |
| 5.3 Avaliações de atributos morfológicos e fisiológicos..... | 23 |
| 5.4 Experimento II (Estresse oxidativo induzido pelo herbicida Paraquat)..... | 25 |
| 5.4.1 Experimento II, parte I: Avaliação de atributos fisiológicos..... | 25 |
| 5.4.2 Experimento II, parte II: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos em discos foliares após Paraquat..... | 25 |
| 5.5 Análises bioquímicas..... | 26 |
| 5.5.1 Determinação de conteúdo de pigmentos fotossintéticos..... | 27 |
| 5.5.2 Determinação dos teores de prolina livre..... | 27 |
| 5.5.3 Determinação de Carboidratos Totais Solúveis..... | 28 |
| 5.5.4 Extração e atividade das enzimas antioxidantes..... | 28 |
| 5.5.4.1 Superóxido dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1)..... | 28 |
| 5.5.4.2 Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6)..... | 29 |
| 5.5.4.3 Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)..... | 29 |
| 5.5.5 Determinação de Proteínas solúveis..... | 30 |
| 5.6 Análise estatística..... | 30 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 31 |

| | |
|--|----|
| 6.1 Experimento I: Alterações fisiológicas e bioquímicas em cultivares de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica e reidratação..... | 31 |
| 6.1.1 Efeito da deficiência hídrica nos atributos morfológicos em cana-de-açúcar..... | 31 |
| 6.1.2 Variação diurna das variáveis fisiológicas em resposta a deficiência hídrica..... | 35 |
| 6.1.2.1 Déficit de pressão de vapor DPV _(folha-ar) | 35 |
| 6.1.2.2 Condutância estomática (gs)..... | 37 |
| 6.1.2.3 Temperatura foliar | 40 |
| 6.1.2.4 Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II..... | 43 |
| 6.1.3 Teor relativo de água na folha (TRA) e Potencial hídrico foliar (Ψ_w)..... | 46 |
| 6.1.4. Estimativa do conteúdo de clorofia (índice SPAD)..... | 48 |
| 6.1.5 Teor de pigmentos fotossintéticos..... | 51 |
| 6.1.6 Efeito da deficiência hídrica nas concentrações de solutos orgânicos em cana-de-açúcar..... | 54 |
| 6.1.7 Resposta das enzimas antioxidante ao estresse oxidativo induzido por deficiência hídrica em cana-de-açúcar..... | 58 |
| 6.2 Experimento II: atributos fisiológicos e bioquímicos de tolerância a deficiência hídrica associada a tolerância ao paraquat em cana-de-açúcar..... | 64 |
| 6.2.1 Respostas dos atributos fisiológicos ao estresse oxidativo induzidos pela deficiência hídrica e paraquat..... | 64 |
| 6.2.2 Teores de pigmentos fotossintéticos em discos foliares em cana-de-açúcar sob estresse oxidativo induzidos pela deficiência hídrica e paraquat..... | 69 |
| 6.2.3 Comparação de danos oxidativos em solutos orgânicos em cana-de-açúcar submetida a estresse induzido por deficiência hídrica e paraquat..... | 73 |
| 6.2.4 Resposta das enzimas antioxidantes ao estresse oxidativo induzido por deficiência hídrica ou paraquat em cana-de-açúcar..... | 76 |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 81 |
| 8 CONCLUSÕES..... | 82 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 83 |
| ANEXO 1..... | 93 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF- área foliar

APX- Ascorbato Peroxidase

ASC- ascorbato

CAT- Catalase

Car- carotenóides

Cytb₆/f - Complexo de citocromo

Chl *a*- clorofila *a*

Chl *b*- clorofila *b*

Chl *total*- clorofila *total*

cm- centrimetro

DH- NADH desidrogenase

DPV_{f_{olha}-ar} - déficit de pressão de vapor

-D- sem deficiência

+D- com deficiência

DAT- dias após o início dos tratamentos

EROs- espécies reativas de oxigênio

EDTA - Ácido Tetracético Etilenodiamidina

e_f -pressão de vapor na câmara subestomática da folha

e_{ar} - pressão de vapor no ar atmosférico

Fd - ferredoxina

FN - ferredoxina NADP redutase

F_v/F_m- eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II

g- Grama

gs- condutância estomática

kPa- quilo pascal

GPOX- guaiacol peroxidase

GR- glutationa redutase

H₂O- água

H₂O₂- peróxido de hidrogênio

HO[•]- radical hidroxilo

índice SPAD- estimativa do conteúdo de clorofila via leitura SPAD

MDHA- monodeidroascorbato
Mf- massa fresca
mg- Micrograma
mL- Mililitro
mM- Milimolar
Mpa- Megapascal
Mt- massa túrgida
Ms- massa seca
nM- nanomolar
NADP- nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT- Cloreto de Azul de Nitroblutetrazólio
O₂ - oxigênio molecular
¹O₂- oxigênio singleto
O₂^{•-} - radical superóxido
POD- Peroxidase
+PQ- Paraquat
PSII- Fotossistema II
PSI- Fotossistema I
PVP- Polivinilpirrolidona
pH- potencial hidrogeniônico
RAF- Radiação fotossinteticamente ativa
SOD- Superóxido Dismutase
T_{ar} - temperatura do ar
T_F- temperatura foliar
TRA- teor relativo de água
TFK- tampão fosfato de potássio
UR_{ar}- umidade relativa da câmara porométrica
Ψ_w- potencial hídrico foliar
μg- Micrograma
μL- Microlitro
μM- Micromolar
μmol- micromoles

LISTA DE FIGURAS

| | Páginas |
|---|---------|
| Figura 1. Esquema do sistema antioxidante enzimático em defesa contra espécies reativas de oxigênio no cloroplasto..... | 14 |
| Figura 2. Sítio de ação do herbicida paraquat no cloroplasto..... | 17 |
| Figura 3. Médias diárias da umidade relativa do ar e temperatura média (A), radiação fotossinteticamente ativa, RFA (B) na casa de vegetação durante o experimento e teor de umidade do substrato ao longo do estresse (sem deficiência = -D, e com deficiência = +D) para todas as cultivares (C)..... | 22 |
| Figura 4. Discos foliares de cana-de-açúcar imersos em solução de paraquat por 24h em placas de Petri (A), sintomas de discos foliares tratados com paraquat +PQ, e controle, -PQ, após 24h e exposição a luz (B) e câmara de crescimento (C)..... | 26 |
| Figura 5. Número de folhas verde por colmo (A, D, G e J), Altura de colmos (B,E,H e K) e Área foliar (C, F, I e L) em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... | 34 |
| Figura 6. Déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar, DPV (folha-ar) ao longo do dia nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse (A, D, G e J), deficiência hídrica (B, E, H e K) e reidratação (C, F, I e L). Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... | 36 |
| Figura 7. Condutância estomática (gs) ao longo do dia nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse (A, D, G e J), deficiência hídrica (B, E, H e K) e reidratação (C, F, I e L). Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio padrão..... | 39 |
| Figura 8. Temperatura foliar ao longo do dia nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D), em três períodos de avaliação, antes do estresse (A, D, G e J), deficiência hídrica (B, E, H e K) e reidratação (C, F, I e L). Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... | 42 |
| Figura 9. Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) ao longo do dia nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D), em três períodos de avaliação, antes do estresse (A, D, G e J), deficiência hídrica (B, E, H e K) e reidratação (C, F, I e L). Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... | 45 |
| Figura 10. . Teor relativo de água na folha, TRA (A), e potencial hídrico foliar, Ψ_w (B), | |

nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse (zero dias), 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... 47

Figura 11. Estimativa do conteúdo de clorofia (índice SPAD) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D), em três períodos de avaliação, antes do estresse (zero dias), 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... 49

Figura 12. Teores de proteína solúveis totais (A), carboidrato solúvel totais(B) e prolina (C) em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse (zero dias), 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... 56

Figura 13. Enzimas antioxidantes, Superoxido dismutase, SOD, EC 1.15.1.1, (A, D, G e J), Catalase, CAT, EC 1.11.1.6, (B, E, H e K) e Ascorbato peroxidase, APX, EC 1.11.1.11, (C, F, I e L) em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias (cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão)..... 62

Figura 14. Variação diurna da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D), deficiência hídrica (+D) e exposta a concentração de 150 μ M de Paraquat (+PQ) mensuradas no dia seguinte da aplicação, no intervalo de tempo de 13h a 24h após +PQ. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... 65

Figura 15. . Condutância estomática, gs (A) e estimativa do conteúdo de clorofia, índice SPAD (B) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D), deficiência hídrica (+D) e a concentração de 150 μ M de Paraquat (+PQ) por 24h. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... 68

Figura 16. Teores de clorofila a (A), clorofila b (B), clorofila total (C) e carotenóides (A) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D), deficiência hídrica (+D) e a concentração de 150 μ M de Paraquat (+PQ) por 24h. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... 71

Figura 17 Discos foliares de cana-de-açúcar em placas de Petri, tratados com solução de Paraquat 150 μ M por 24h de exposição sob intensidade luminosa de 120 μ mol m⁻²s⁻¹ (+PQ) e controle (-PQ) em câmara de crescimento..... 72

Figura 18. Teores de proteínas solúveis totais (A), carboidratos solúveis totais (B) e prolina livre (C) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) e a concentração de 150 μ M de Paraquat (+PQ) por 24h. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... 75

Figura 19. Enzimas antioxidantes superóxido dismutase, SOD, EC 1.15.1.1, (A), catalase, CAT, EC 1.11.1.6, (B) e ascorbato peroxidase, APX, EC 1.11.1.11, (C) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) e a concentração de 150 μ M de Paraquat (+PQ) por 24h. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão..... 79

LISTA DE TABELAS

| | Páginas |
|--|---------|
| Tabela 1. Atributos morfológicos de número de folhas verdes por colmo, altura de colmos (cm) e área foliar (cm ²) em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias..... | 32 |
| Tabela 2. Análise de variância dos atributos fisiológicos condutância estomática (gs), temperatura foliar (TF), potencial hídrico foliar (Ψ_w), teor relativo de água na folha (TRA), eficiência fotoquímica máxima II (F_v/F_m) e teor estimado de clorofila (índice SPAD) em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias..... | 40 |
| Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson entre os atributos fisiológicas em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos adequado (Controle) e deficiência hídrica (Estresse) em 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias..... | 50 |
| Tabela 4. Análise de variância do conteúdo de clorofilas a (Chl a), b (Chl b), Clorofila total (Chl total) e carotenóides em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias. | 51 |
| Tabela 5. Teores de clorofilas a (Chl a), b (Chl b), clorofila total (Chl total) e carotenóides (Car) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias..... | 53 |
| Tabela6. Análise de variância de teores de proteína solúveis totais, carboidratos solúveis totais e prolina livre em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias..... | 54 |
| Tabela 7. Análise de variância das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias..... | 58 |
| Tabela 8. Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis enzimas antioxidantes e atributos fisiológicos em cana-de-açúcar submetidas aos regimes hídricos: adequados (Controle) e deficiência hídrica (Estresse) em 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias..... | 63 |

| | |
|---|----|
| Tabela 9. Análise de variância dos atributos fisiológicos eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), condutância estomática (gs) e teor estimado de clorofila (índice SPAD) em cana-de-açúcar submetida aos regimes de estresse controle (-D), deficiência hídrica (+D) e Paraquat (+PQ) após 24h de aplicação..... | 66 |
| Tabela 10. Análise de teores de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenóides em cana-de-açúcar submetida aos regimes de estresse controle (-D), deficiência hídrica (+D) e Paraquat (+PQ)..... | 69 |
| Tabela 11. Análise de variância de teores de proteína, carboidrato solúvel e prolina em cana-de-açúcar submetida aos regimes de estresse controle (-D), deficiência hídrica (+D) e Paraquat (+PQ)..... | 73 |
| Tabela 12. Análise de variância das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em cana-de-açúcar submetida aos tratamentos controle (-D), deficiência hídrica (+D) e Paraquat (+PQ)..... | 76 |

1 RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica no mundo. No Brasil, sua expansão tem sido impulsionada para novas áreas agrícolas não tradicionais que apresentam deficiência hídrica. Estudos que visam à seleção de cultivares que apresentem tolerância aos estresses ambientais se constituem numa alternativa viável para aumentar a produtividade nessas regiões. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar de maneira comparativa as respostas fisiológicas e bioquímicas em cana-de-açúcar cultivada sob deficiência hídrica bem como analisar os efeitos fisiológicos do herbicida Paraquat, visando constituir uma alternativa para caracterizar cultivares tolerantes em programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar. Para isso, experimentos foram conduzidos em vasos em casa de vegetação e no laboratório da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento da APTA em Jaú (SP). Foram utilizadas quatro cultivares de cana-de-açúcar RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 em cada experimento. Para o estudo de deficiência hídrica, a primeira avaliação foi realizada nas plantas sem estresse após 85 dias do plantio, em seguida foram implementados dois tratamentos, sem deficiência (-D) e com deficiência (+D) por suspensão da rega por 15 dias e posterior reidratação por 12 dias. Para os estudos com herbicida Paraquat (PQ) um segundo experimento foi instalado dividido em duas partes. Na primeira, foi pulverizado Paraquat, na dose de 150 μM , 24 horas antes das avaliações em plantas conduzidas simultaneamente ao experimento de deficiência hídrica. Na segunda parte, segmentos foliares das cultivares foram cortados em discos e imersos em solução de Paraquat em placas de Petri e analisados quanto à degradação de clorofila. Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x2 (quatro cultivares x dois regimes hídricos, sem e com deficiência hídrica) ou 4x3 (quatro cultivares x três regimes de estresse, sem e com deficiência hídrica e com PQ), em quatro repetições. Nos experimentos em vasos foram feitas avaliações de análise de crescimento, fisiológicas e bioquímicas. Nas cultivares SP83-2847 e IAC91-5155 foram observadas menores reduções nas taxas de altura do colmo, número de folhas verdes, área foliar, teor relativo de água (TRA), déficit de pressão de vapor ($DPV_{\text{folha-ar}}$), temperatura foliar (TF), condutância estomática (gs), eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), índice SPAD e pigmentos fotossintéticos quando submetidas à deficiência hídrica. As mesmas cultivares quando tratadas com paraquat tiveram respostas semelhantes à deficiência hídrica para gs, F_v/F_m , índice SPAD e teor de clorofila. Já as cultivares RB92579 e SP81-3250 apresentaram susceptibilidade para a maioria das variáveis em ambos os estresses. A cultivar

SP81-3250 foi a mais sensível do grupo não apresentando recuperação durante a reidratação. Sob deficiência hídrica também pode-se observar aumento de taxa de prolina em todas cultivares. O aumento de carboidrato também foi verificado, com exceção da cultivar SP81-3250 que apresentou redução sob estresse. O paraquat teve efeito fitotóxico, induzindo a degradação de prolina, carboidratos e proteínas nas cultivares. A deficiência hídrica e o estresse induzido por paraquat também promoveram o aumento na atividade das enzimas SOD e APX em todas as cultivares. A CAT foi a enzima mais afetada, com resposta dependente da cultivar. Pôde-se evidenciar maiores danos fisiológicos e bioquímicos do estresse oxidativo nas cultivares RB92579 e SP81-3250. Devido aos menores danos causados pela seca e estresse induzido por paraquat na fisiologia e bioquímica das cultivares SP83-2847 e IAC91-5155, estas têm maior potencial de tolerância ao estresse oxidativo. Este estudo sugere que o Paraquat tem potencial para ser utilizado como ferramenta de seleção de cultivares tolerantes à deficiência hídrica, porém novos estudos deverão ser realizados para confirmar esse papel, principalmente no sentido de melhor definição da concentração e metodologias a serem empregadas.

Palavras chave: *Saccharum* spp., seca, atributos fisiológicos, dano oxidativo, enzimas antioxidantes, metil violágeno.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL MECHANISMS IN SUGARCANE UNDER STRESSES INDUCED BY DROUGHT AND PARAQUAT

Botucatu, 2013, 93 p. Tese (Doutorado em Agronomia / Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: CLAUDIANA MOURA DOS SANTOS

Adviser: Prof. Dr. MARCELO DE ALMEIDA SILVA

Co-adviser: Profa. DRa GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA

2 SUMMARY

Sugarcane is one of the most economically important crops used in the production of sugar and of bioethanol. In Brazil, this plant has been introduced to non-traditional agricultural areas, with adverse agro-climatic conditions where water deficit is highlighted. Studies aimed at selecting drought-tolerant cultivars are a viable alternative to increase the productivity of these regions. The main goal of this research includes to study comparatively the physiological and biochemical responses in sugarcane under drought stress and recovering as well as analyzing the physiological effects induced by the herbicide paraquat, aiming to establish a scoring system for selecting sugarcane drought tolerant cultivars in breeding programs. The experiments were carried out in a greenhouse located in the Unit of Research and Development of APTA, Jaú, SP., where the cultivars RB92579, SP81-3250, SP83-2847 and IAC91-5155 were grown in pots and used for each set of experiments. For the study of water stress, the first assessment was done in plants without stress after 85 days of planting, and after that two treatments were implemented, i.e. without water deficit (-D) and with water deficit (+D) by withholding in the water supply for 15 days and rewatering for 12 days after the stress period. For the study of paraquat (PQ), another set of experiments were carried out simultaneously to the water stress experiments. Two different experimental methods were used for spraying the PQ solution (150 μ M). In the first one, the PQ solution was sprayed onto leaves of the sugarcane plants and the assessments took place 24 hours after spraying. In the second experiment, leaf disks were floated in PQ solutions for 24 hours for analyzing chlorophyll degradation. All experimental designs were completely randomized in 4x2 factorial scheme (four sugarcane cultivars \times two water regimes, without and with water deficit) or 4x3 (four sugarcane cultivars \times without or with water deficit and with PQ), with four replications. In the pot experiments assessment of growth analysis, physiological and biochemical were done. The cultivars SP83-2847 and IAC91-5155 showed higher values for stalk height, green leaf number, leaf area, relative water content (RWC), vapor pressure deficit between the leaf and the air, $VPD_{(leaf-air)}$, leaf temperature (LT),

stomatal conductance (g_s), maximum quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_m), SPAD index and photosynthetic pigments under drought stress. The same cultivars treated with PQ showed similar performance to the drought stress for g_s , F_v/F_m , SPAD index, chlorophyll content. However, cultivars RB92579 and SP81-3250 showed higher susceptibility to these variables in both stresses. The cultivar SP81-3250 was the most drought sensitive of the group and showed no recovery during the rewatering period. It was observed increase of proline rate in all cultivars under drought stress. The increase of carbohydrate was also verified, with except the cultivar SP81-3250 that decreased under stress. Paraquat exercised phytotoxic effects by inducing the degradation of proline, carbohydrates and proteins in the cultivars. Antioxidant enzyme activities SOD and APX were promoted by both drought and herbicide-induced stresses in all cultivars, while the CAT was the most affected enzyme and the response was cultivar-dependent. We could also characterize major occurrence of oxidative stress in cultivars RB92579 and SP81-3250. Furthermore, the minor damages caused by both drought and paraquat-induced stress in the physiological and biochemical traits of the cultivars SP83-2847 and IAC91-5155, show their better performance for both stresses, reflecting in the greater ability to tolerate oxidative stress. These findings suggest that the paraquat has potential to be used as tool for rapid selection of drought-tolerant cultivars. However, new studies should be done to confirm this function, principally in order to better determine about concentration and methodologies to be applied.

Key words: *Saccharum* spp., drought, physiological attributes, antioxidative response, antioxidant enzyme, methyl violagen.

3 INTRODUÇÃO

Entre os estresses ambientais, a deficiência hídrica constitui um dos grandes problemas da atualidade, que afeta boa parte das áreas de cultivo de cana-de-açúcar em todo mundo, sendo o principal fator de limitação da produtividade dessa cultura, provocando prejuízos socioeconômicos na produção de alimento em todo mundo. No entanto o aumento dos efeitos da seca é esperado com as alterações climáticas e a crescente escassez de água. Assim, estudos que visam à seleção de cultivares tolerantes à seca se constituem numa alternativa viável para aumentar a produtividade, além de uma necessidade para o futuro na agricultura sustentável.

A cana-de-açúcar ganha destaque por ser uma cultura de grande importância econômica mundial devido à sua utilização na indústria de alimentos, e também como fonte valiosa na produção de biocombustível renovável. Esta cultura é adaptada a diversas condições de clima e solo, exigindo precipitações entre 1500 a 2500 mm por ciclo vegetativo, e considera-se de 25°C a 33°C a faixa de temperatura base para o seu bom desempenho (SILVA et al., 2010). A cultura é cultivada em mais de 90 países em todo o mundo, que abrange regiões tropicais e subtropicais, onde as maiores áreas de produção estão no Brasil e na Índia (AMALRAJ et al., 2010).

No Brasil, as regiões produtoras de cana-de-açúcar estão concentradas no Centro-Sul e Norte-Nordeste, porém nos últimos anos as fronteiras agrícolas dessa cultura vêm sendo ampliadas nas regiões no oeste de São Paulo, e em áreas de cerrado de Goiás, Triângulo Mineiro e Mato Grosso do Sul, regiões predominantemente ocupadas por pastagens e caracterizadas por um inverno seco, com períodos de deficiência hídrica bastante pronunciada em comparação às regiões tradicionalmente produtoras (NOBREGA;

DORNELAS, 2006; CONAB, 2012). Em contrapartida a viabilidade da cultura canavieira nestas áreas ainda é baixa por apresentarem pouca disponibilidade de cultivares comerciais adaptadas à deficiência hídrica. Dessa forma, a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca nas cultivares de cana-de-açúcar permitirá direcionar os cruzamentos em programas de melhoramento, visando à obtenção de progênies com mais tolerância à deficiência hídrica para serem cultivadas nessas regiões de expansão.

De modo geral, a tolerância da cana-de-açúcar à deficiência hídrica envolve uma série de adaptações morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares que as conduzem a economizar água para uso em períodos posteriores, levando assim as plantas a tentarem atingir a maior estabilidade da produtividade. Dentre essas adaptações pode-se destacar o menor crescimento da planta, a redução da área foliar, controle estomático da transpiração, manutenção da capacidade fotossintética (MACHADO et al., 2009), e do status hídrico da planta por meio de ajustes osmóticos e acúmulo de solutos orgânicos (QUEIROZ et al., 2011), além do aumento da atividade de enzimas antioxidantes (CIA et al., 2012). Essas respostas têm sido amplamente estudadas como características de seleção de cultivares mais eficientes no uso de água.

Por ser uma planta do tipo C_4 , a cana-de-açúcar possui alta eficiência fotossintética a ponto luminoso elevado, no entanto essa eficiência é reduzida durante a deficiência hídrica pelo fechamento estomático e causa desequilíbrio entre as fases fotoquímicas e redução do carbono, ocorrendo a diminuição da fotossíntese e da produtividade conseqüentemente (LAWLOR; TEZARA, 2009). Outra conseqüência da limitação para a fotossíntese durante a deficiência hídrica é a exposição da planta ao excesso de energia, que, se não for dissipada de forma segura, pode causar uma sobre-excitação dos centros de reação dos Fotossistema II e I elevando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos cloroplastos (CARVALHO et al., 2008). Para proteger-se dos efeitos prejudiciais das EROs produzidos durante o estresse oxidativo, as plantas desenvolveram um complexo mecanismo de defesa antioxidativo constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes. Destacam-se entre as enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato Peroxidase (APX) bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores do estresse (SHARMA et al., 2012).

Efeitos de fitotóxicos nos cloroplastos também podem ser provocados pelo estresse induzido pelo herbicida Paraquat (PQ), o qual em contato com a planta age aceitando elétrons do receptor primário do Fotossistema I. A interceptação de elétrons no fotossistema I paralisa a redução da ferredoxina, assim interferindo na redução do $NADP^+$ a

NADPH no estroma o qual seria utilizado no ciclo de Calvin para reduzir CO₂ (EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2009). Como consequência, também há a formação de EROs, as quais causam estresse oxidativo, o que provoca danos em membranas, proteínas e degradação da clorofila (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2011).

O paraquat, além de ser usado amplamente como herbicida dessecante, tem sido uma ferramenta muito útil na pesquisa de biologia básica de plantas na simulação de estresse oxidativo, e vem sendo relatado com sucesso em milho (SHAHRTASH et al., 2011), trigo (SEDIGHEH et al., 2011), arroz (ZHENFEI et al., 2007), além de espécies hortícolas tais como pepino (LIN et al., 2011). Esses trabalhos avaliaram danos oxidativos como a perda da atividade fotossintética e fotoinibição, a quebra de proteína, redução de pigmentos fotossintéticos e clorose associados a atividades de as enzimas antioxidantes. O que vem permitindo uma melhor compreensão de diversos mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo, como também está sendo proposto nesse estudo. Em adição, alguns estudos comparativos entre os efeitos causados pela deficiência e o estresse artificial induzido por paraquat sobre a fisiologia das plantas já foram relatados em ervilha (ITURBE-ORMAETXE et al., 1998), trigo (ALTINKUT et al., 2001) e café (PINHEIRO et al., 2004).

Até o momento estudos independentes de efeitos do estresse oxidativo induzido por paraquat em cana-de-açúcar já foram realizados, porém estudos comparativos entre estresse induzidos por deficiência hídrica e paraquat que envolvam respostas fisiológicas, incluindo a atividade de enzimas antioxidante, ainda não foram constatados em cana-de-açúcar, o que torna esse trabalho de grande relevância.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar as semelhanças das respostas fisiológicas e bioquímicas da cana-de-açúcar cultivada sob deficiência hídrica e após aplicação do herbicida Paraquat. O estabelecimento dessa interação em cana-de-açúcar pode ser de grande valor, visando obter uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos associados aos agentes antioxidantes que ajudem na proteção contra o estresse oxidativo e que possam ser utilizados na indicação de plantas mais tolerantes a esses estresses abióticos.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 A importância do uso de atributos fisiológicos e bioquímicos na seleção de cultivares tolerantes à seca

O conhecimento mais detalhado do desenvolvimento da cultura, em função das alterações da relação fonte-dreno, torna-se um importante instrumento para contribuir na busca de explicação para o baixo potencial produtivo da cultura sob deficiência hídrica. Além disso, o entendimento de mecanismos fisiológicos pode fornecer informações avançadas sobre algumas estratégias para serem usadas em programas de melhoramento genético para seleção de cultivares tolerantes à seca (AMUDHA; BALASUBRAMANI, 2011; SILVA et al., 2012).

As plantas diferem largamente quanto à habilidade de tolerar a deficiência hídrica. Nas sensíveis, os processos fisiológicos são adversamente afetados devido à redução na hidratação dos tecidos; nas mais tolerantes, suas propriedades fisiológicas as capacitam para manter um alto grau de hidratação dos tecidos mesmo sob limitado suprimento hídrico (BARTELS; SUNKAR, 2005; SOREN et al., 2010). Essas respostas podem ser complexas, e dependem da cultivar e do estágio de desenvolvimento da planta, além da duração e da severidade do estresse.

Em cana-de-açúcar, dentre os estádios fenológicos, as fases de perfilhamento juntamente com a de grande crescimento, também conhecidas como fase de formação, têm sido identificadas como um período crítico por demanda de água (RAMESH; MAHADEVASWANY, 2000; SILVA et al., 2010). Portanto, é neste período onde os danos causados pela deficiência hídrica são mais prejudiciais à produção. De acordo com LARCHER

(2004), durante a fase principal de crescimento, fase vegetativa, as plantas estão no pico de suas atividades metabólicas. É durante essa fase que se manifestam as características da plasticidade fenotípica e, sobretudo, as adaptações modificativas em relação às condições do habitat.

De uma forma geral a adaptação e a aclimatação ao estresse ambiental resultam em eventos integrados, graças a mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares que permitem a planta a tolerar ambientes estressantes (TAIZ; ZEIGER, 2009; SOREN et al., 2010). Dentre esses eventos destaca-se a limitação da perda de água pela planta, que inclui a regulação mediada pelo ácido abscísico e o fechamento dos estômatos. Na fase inicial do estresse por falta de água os estômatos se fecham em resposta tanto ao declínio do turgor das células da folha, à queda no potencial da água nas folhas ou à baixa umidade do ar, o que resulta na redução da fotossíntese (YORDANOV et al., 2003; LAWLOR; TEZARA, 2009).

Neste sentido, estudos sobre deficiência hídrica têm apresentado alguns indicativos de culturas mais tolerantes ao estresse, tais como menores decréscimos da condutância estomática e da taxa fotossintética, e relacionadas a maior produtividade em diferentes culturas, como cana-de-açúcar (MACHADO et al., 2009; SILVA; COSTA, 2009), milho (WANG et al., 2008) e soja (GILBERT et al., 2011), propondo assim que em plantas tolerantes o movimento dos estômatos pode ser regulado, de forma que o seu fechamento parcial em determinado nível de deficiência hídrica do solo pode levar a um aumento da eficiência do uso da água.

Quando a planta é exposta à condição de seca, outros componentes do processo fotossintético também são afetados, tais como, inibição da biossíntese de clorofilas ocorrendo a diminuição da eficiência de absorção da energia luminosa (SILVA et al., 2007a). Essas respostas podem ser interpretação dos sinais da fluorescência que refletem a intensidade da fotoinibição (MAXWELL; JOHNSON, 2000; BAKER; ROSENQVIST, 2004). A fotoinibição pode ser avaliada pela redução na máxima eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m), essa razão reflete a máxima eficiência com que a luz absorvida pelo complexo antena do fotossistema II é convertida em energia química (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Trata-se de um método rápido não destrutivo de triagem de genótipos de cana-de-açúcar quanto a tolerância à seca (SILVA et al., 2007a; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2013), e também tem mostrado boa referência para diagnosticar a integridade do sistema fotossintético em outras culturas sob condições de estresse, tais como milho (EFEOĞLU et al., 2009) e trigo (ALMESELMANI et al., 2012) dentre outras.

Outros atributos fisiológicos também podem ajudar no entendimento fisiológico do processo em condições de seca em diferentes culturas. Em estudos sobre teor relativo de água da folha (EFEOĞLU et al. 2009; SILVA et al., 2011; ALMESELMANI et al., 2012; GHOLAMI et al., 2012), potencial hídrico foliar (ENDRES et al., 2010; GHOLAMI et al., 2012; SILVA et al., 2012), estimando o teor de clorofila presente na folha (índice SPAD) (SILVA et al., 2007a; ALMESELMANI et al., 2012; SILVA et al., 2013), pigmentos fotossintéticos (JANGPROMMA et al., 2010a; FARHAD et al., 2011; GHOLAMI et al., 2012), observa-se maior eficiência dessas variáveis fisiológicas em cultivares tolerantes quando submetidas a deficiência hídrica, sendo assim propostas como critério de seleção para triagem de cultivares que apresentam maior eficiência no uso da água.

A adaptação bioquímica comum na planta durante a seca é a regulação osmótica, que é o resultado de determinados metabólitos recém sintetizado. Estes são moléculas que apresentam o comportamento altamente hidrofílico solúvel, capaz de produzir uma superfície de solvatação, que capturam as moléculas de água para posterior disponibilização durante a limitação de água (BARTELS; SUNKAR, 2005). O acúmulo de metabólitos ou solutos orgânicos, também chamados de substâncias osmoticamente ativas ou osmoprotetores, pode ser importante na resistência da planta aos ambientes estressantes. Dentre as alterações metabólicas sob deficiência hídrica destacam-se os estudos de diferentes culturas para o acúmulo de solutos orgânicos como a glicina betaína, prolina, aminoácidos solúveis e açúcares solúveis (BARTELS; SUNKAR, 2005; FARHAD et al., 2011). Tais solutos podem acumular-se em grandes quantidades em condições de baixo potencial hídrico, protegendo as células contra desidratação e contribuindo para o ajustamento osmótico (TAIZ; ZEIGER, 2009; ZHOU; YU, 2010).

Dentre esses solutos, a prolina é o mais estudado. Este metabólito atua como mediador do ajustamento osmótico, na integridade e proteção da membrana plasmática, como fonte de carbono e nitrogênio (HEMAPRABHA et al., 2013), e como agente antioxidante, removendo espécies reativas de oxigênio durante o estresse oxidativo, como verificado em diferentes estudos (MOLINARI et al., 2007; CARLIN; SANTOS, 2009; QUEIROZ et al., 2011; CIA et al., 2012) em que os autores sugerem que cultivares de cana-de-açúcar com maiores teores de prolina apresentam maior tolerância à seca. Maiores teores de prolina também foram verificados em outras plantas consideradas tolerantes à deficiência hídrica, dentre elas trigo (MARALIAN et al., 2010) e batata (FARHAD et al., 2011).

Assim, para fins de produção agrícola, abordagens fisiológicas e bioquímicas têm uma grande importância na busca de compreender respostas sobre

mecanismo de tolerância à desidratação quando o potencial hídrico da planta é extremamente baixo, o que vem a contribuir para a seleção de novos cultivares.

4.2 Ações dos sistemas antioxidantes enzimáticos em resposta ao estresse oxidativo induzido pela deficiência hídrica em cana-de-açúcar e outras culturas agrícolas

A deficiência hídrica, juntamente com fatores adicionais como excesso de temperatura e alta irradiância, provoca redução na fotossíntese, levando a diminuição no uso da radiação incidente, acarretando acúmulo de poder redutor (NADPH) e redução no pool do acceptor final da cadeia de transporte de elétrons (NADP⁺). Esse excesso de poder redutor pode levar a superredução da cadeia de transporte de elétrons. Nesse processo pode haver escape de elétrons, que por sua vez reagem com o oxigênio molecular (O₂), formando assim, as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) (CARVALHO, 2008; CAVATTE et al., 2012).

As EROs são produzidas normalmente em várias vias metabólicas das plantas dentre elas nos cloroplastos, nas mitocôndrias, nos peroxissomas, em particular na fotossíntese e na respiração, em quantidades muito baixas (APEL; HIRT, 2004). No entanto, quando as plantas estão sujeitas a um ou mais fatores de estresse, ocorrem alterações das vias metabólicas, que podem levar a um aumento dramático da produção destas EROs, denominado de estresse oxidativo em plantas (ASADA, 2006; GILL; TUTEJA, 2010). O papel da produção de EROs durante a deficiência hídrica parece que têm um duplo efeito sob condições de estresses que dependem da sua quantidade total celular. Se mantido em níveis relativamente baixos, é provável que funcione como componentes de uma via de sinalização de estresse, desencadeando defesa ao estresse ou respostas de aclimação (CARVALHO, 2008).

No entanto, ao chegar a certo nível de fitotoxicidade as EROs tornar-se extremamente prejudicial, situação na qual o organismo é incapaz de metabolizar efetivamente o excesso de EROs, e estas irão provocar uma imediata peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, inibição enzimáticas e danos ao DNA e RNA (APEL; HIRT, 2004; GILL; TUTEJA, 2010). Estes danos conduzem a disfunção celular, lesões necróticas ou ainda morte celular (FOYER; NOCTOR, 2009; SHARMA et al., 2012). Como consequência, os danos oxidativos traduzem-se nas folhas pelo aparecimento de áreas cloróticas que, em muitos casos, evoluem para necrose e abscisão foliar (CAVATTE et al., 2012). A conversão do

oxigênio molecular em espécies reativas de oxigênio resulta na redução parcial de oxigênio atmosférico (O_2) por metabolismo aeróbio. São subprodutos que resultam da inversão do spin de um elétron do O_2 para formar oxigênio singlete (1O_2) ou da transferência de um, dois ou três elétrons do O_2 para formar, respectivamente, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou o radical hidroxilo (HO^{\bullet}) (MITTLER, 2002; APEL; HIRT, 2004; POSPÍŠIL et al., 2009).

Para mitigar os danos oxidativos causados pelas EROs, as plantas possuem um complexo sistema antioxidativo de defesa, envolvendo antioxidantes de baixa massa, composto por moléculas hidrofílicas como o ácido ascórbico e a glutatina reduzida, ou lipofílicas como o α -tocoferol e os caratenóides, e por enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX), peroxidase não específicas (POX), redutase da glutathione (GR), monodesidroascorbato redutase (MDHA) e desidroascorbato redutase (DHAR) (ASADA, 2000; ASADA, 2006; GILL; TUTEJA, 2010). Além disso, as enzimas do sistema antioxidante são bastante sensíveis às condições de estresse ambientais servindo como sinalizadores do estresse, como também podem indicar que a planta está mais estressada. Assim, o papel das enzimas antioxidantes em situações de estresse é o de controlar a acumulação de EROs e assim limitar os danos oxidativos (MITTLER, 2002; SHARMA et al., 2012).

A enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) é considerada a primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo (APEL; HIRT, 2004), é uma metaloproteína multimérica, única enzima, das plantas, capaz de eliminar o poder tóxico causado pelo radical $O_2^{\bullet-}$, formando-se H_2O_2 que é posteriormente eliminado pela CAT ou através da APX (CARVALHO, 2008; SHARMA et al., 2012). A SOD encontra-se presente em todos os compartimentos celulares, sejam mitocôndrias, cloroplastos, glioxissomas, peroxissomas, apoplasto e citosol, sendo produzido em todos locais onde a cadeia transportadora de elétrons encontra-se presente (APEL; HIRT, 2004; GILL; TUTEJA, 2010).

O segundo sistema de prevenção é muito mais simples, sendo formado pela enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) que atua na dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água. É uma enzima tetramérica que contém um grupo heme (MITTLER, 2002). Em plantas, a CAT é encontrada nos peroxissomos, glioxissomos, citosol e mitocôndrias, porém a sua localização é quase restringida aos peroxissomos onde funciona essencialmente para remover o H_2O_2 formado durante a fotorespiração, o que limita dessa forma a sua capacidade para manter os teores de H_2O_2 baixos o suficiente para prevenir danos

noutros compartimentos celulares, como nos cloroplastos (GARA, 2004; ASADA 2006; CARVALHO, 2008).

A ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) são membros de classe I da super-família de heme-peroxidases, cujo grupo prostético é a protoporfirina e são reguladas por sinal redox de H_2O_2 . A APX apresenta alta especificidade por ascorbato como substrato redutor e catalisa a redução de H_2O_2 onde ocorre a oxidação de ascorbato, reação que resulta em monodeidroascorbato (MDHA) e H_2O (ASADA, 1999; GARA, 2004; SHARMA et al., 2012). A regeneração do ascorbato é mediada no ciclo Halliwell-Asada. As APXs são encontradas em plantas superiores, clorófitas e algas vermelhas. Apresentam-se localizadas no citosol, em membranas dos peroxissomos e em cloroplastos (estroma e membranas dos tilacóides) (ASADA, 1999; GILL; TUTEJA, 2010).

Elementos antioxidantes não-enzimáticos como ascorbato (ASC) e a glutatona (GSH) são cruciais na defesa contra estresse oxidativo, exercendo papel de tampões antioxidantes (MITTLER, 2002). Esses mantidos no seu estado reduzido por um conjunto de enzimas dependentes de ATP e NADPH, participam do processo de detoxicação de H_2O_2 catalisado pela enzima ascorbato peroxidase (APX), essas reações em conjunto, formam uma das vias antioxidantes mais importantes presentes na plantas, o ciclo do ascorbato-glutationa conhecido também por ciclo Halliwell-Asada (MITTLER, 2002; GARA, 2004; ASADA, 2006).

Em adição, diferentemente da maioria dos organismos, as plantas têm múltiplos genes que são codificados de acordo com a enzima chave originando diferente isoformas. Essas são especificamente orientadas para cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, bem como para o citosol e apoplasto, as quais participam também dos mecanismos de defesas contra as EROs e desempenham papéis fisiológicos distintos nas organelas (APE; HIRT, 2004; GILL; TUTEJA, 2010).

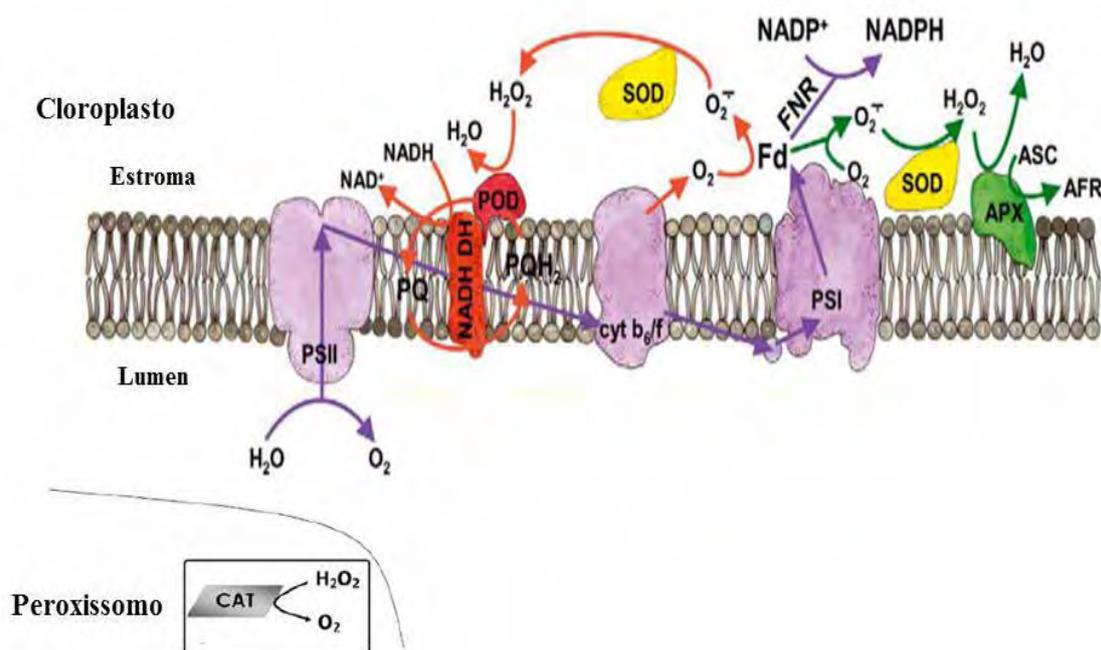


Figura 1. Esquema do sistema antioxidante enzimático em defesa contra espécies reativas de oxigênio no cloroplasto. Os complexos fotossintéticos e fluxo de elétrons são indicados em cor roxa. Sistema adaptado de GARA (2004) modificado após ASADA (1999; 2000). Fd (ferredoxina), FN (ferredoxina NADP redutase), DH (NADH desidrogenase), Cytb₆/f (Complexo de citocromo), PQ (Plastoquinona), PSII (Fotossistema II), PSI (Fotossistema I), NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), ASC (ascorbato), AFR (radicais livres de ascorbato), MDHA (monodehidroascorbato), O₂^{•-} (radical superóxido), H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), SOD (Superóxido Dismutase), CAT (Catalase), APX (Ascorbato Peroxidase) e POD (Peroxidase).

Pesquisas sobre a importância das enzimas antioxidantes no sistema de defesa em cana-de-açúcar sob diferentes condições de estresses, têm recebido atenção de vários colaboradores na busca da melhor compreensão da atuação dessas enzimas no sistema de defesa contra o estresse oxidativo, dentre essas se pode relatar CIA et al. (2012), que em estudos de cultivares tolerantes e sensíveis à deficiência hídrica, constataram que as atividades das enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) e glutathione redutase (GR) nas folhas variaram de acordo com a cultivar e a intensidade do estresse, porém na cultivar tolerante manteve altas taxas de CAT e APX e diminuição de peroxidação de lípidos ao longo do experimento.

JANGPROMMA et al. (2010b) verificaram que cultivares de cana-de-açúcar tolerantes a seca apresentaram sob deficiência hídrica elevados níveis de SOD e de clorofilas em concordância com um alto nível de expressão de genes da proteína de p18 indicadora de tolerância à seca. GOMATHI; RAKKIYAPAN (2011), em estudo de estresse salino em folhas de cana-de-açúcar, evidenciaram na cultivar tolerante aumento das enzimas SOD, CAT, APX e GR, e maior estabilidade de membrana, de clorofilas e de carotenóides, enquanto na sensível houve reduções das enzimas e degradação de membranas e pigmentos fotossintéticos, assim os autores sugeriram que a maior estabilidade de membrana e a concentração de pigmentos, estão relacionadas com altos níveis de atividade de enzimas antioxidantes.

Em cana-de-açúcar sob estresse hídrico induzido por inundação foram constatados aumento da atividade das enzimas SOD, APX, peroxidase (POD) e suas isoformas em cultivares mais tolerantes, o que contribuiu para integridade da membrana celular durante o estresse (GOMATHI et al., 2012). SRIVASTAVA et al. (2012) estudaram 71 cultivares de cana-de-açúcar sob estresses térmicos e observaram que altas temperaturas induziram a alterações na atividade de CAT e APX e suas isoenzimas, correspondendo ao nível de tolerância das cultivares. Maiores taxas das enzimas foram relacionadas a menores lesões pelo calor. Os autores sugeriram que essas enzimas antioxidantes podem ser utilizadas para identificar populações de plântulas e germoplasma de tolerância à temperatura elevada em cana-de-açúcar.

CHUGH et al. (2011) encontraram que em folha de milho a deficiência hídrica provocou o aumento das enzimas APX e CAT nas cultivares tolerantes, enquanto para SOD foi verificada redução nas cultivares sensíveis e manteve-se inalterada nas tolerantes e que ambas cultivares apresentaram aumento da POD durante o estresse. Essas respostas indicaram a ativação significativa dos mecanismos de defesa antioxidante correlacionados com a tolerância à seca. Ainda em milho sob deficiência hídrica, BENESOVÁ et al. (2012) constataram hipersensibilidade estomática na cultivar sensível, conduzindo à inibição da fotossíntese, efeitos que foram relacionados a redução de síntese de proteínas protetoras, seguida da redução das enzimas como CAT e APX, enquanto na cultivar tolerante houve aumento desses fatores em resposta a limitação hídrica. GE et al. (2006), em folha e raiz de milho sob deficiência hídrica, demonstraram aumento da atividade SOD, CAT e POD nas fases de crescimento prófase e metáfase com declínio na maturidade fisiológica.

Em trigo sob deficiência hídrica, SHARIFI et al. (2012) constataram em cultivares tolerantes e sensíveis que a atividade da enzima CAT em condição de estresse

permaneceu estável ou diminuiu e não apresentou relação específica entre a atividade dessa enzima e resistência à seca. No entanto, os autores observaram que a enzima POD na condição de deficiência hídrica promoveu a estabilidade de membrana celular e aumentou o teor de clorofila em cultivares tolerantes, apresentando relação com a tolerância à essa condição.

4.3 Efeitos do paraquat na atividade de enzimas antioxidantes e danos no cloroplasto

O paraquat (metil violágeno) é uma bipyridina, cátion forte, com alta solubilidade em água, é um herbicida de contato que apresenta rápida absorção foliar (OLIVEIRA JUNIOR, 2011). Quando paraquat é pulverizado sobre as folhas verdes, move-se através da cutícula para dentro das células, principalmente dentro dos cloroplastos interferindo nos processos fotossintéticos (SEDIGHEH et al., 2011).

O paraquat age aceitando elétrons do aceptor primário do fotossistema I na fotossíntese, tornam-se mono-cátions, atuando muito próximo à ferredoxina o que indica que o doador imediato de elétrons para o paraquat seja um grupamento ferro-enxofre (OLIVEIRA JUNIOR, 2011). A interceptação de elétrons no fotossistema I paralisa a redução da ferredoxina, assim interferindo na redução do NADP^+ a NADPH no estroma o qual seria utilizado no ciclo de Calvin para reduzir CO_2 (TAIZ; ZEIGER, 2009). Quando o paraquat é fotoreduzido no fotossistema I, e exerce seus efeitos fitotóxicos catalisando a transferência de elétrons do fotossistema II a partir do fotossistema I e, em seguida, é novamente oxidado por transferência de elétrons para O_2 na presença de luz. Ao receber elétrons, o paraquat reage com oxigênio molecular, gerando o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), resultando na acumulação de radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$, nos cloroplastos, o que desencadeia o estresse oxidativo na planta (ITURBE-ORMAETXE et al., 1998; DARKÓ et al., 2009; SOOD et al., 2011).

Os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) são então enzimaticamente alterados para outras espécies reativas de oxigênio. A exemplo estes radicais superóxidos ($\text{O}_2^{\bullet-}$) passam por processo de dismutação pela enzima SOD, para formarem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MITTLER, 2002; SEDIGHEH et al., 2011; SOOD et al., 2011). Este composto, na presença de Mg, rapidamente, também produz radicais hidroxila (OH^{\bullet}) (OLIVEIRA JUNIOR, 2011). Esses radicais por serem instáveis rapidamente sofrem alteração formando outras espécies reativas de oxigênio (EROs). A presença das EROs nos cloroplastos promovem a degradação das membranas (peroxidação de lipídios), ocasionando o vazamento do conteúdo

celular e a morte do tecido, e podem afetar todas as plantas (MASCHER et al., 2005, LIN et al., 2011). De acordo com OLIVEIRA JUNIO (2011), poucas horas após a aplicação desses herbicidas, na presença de luz, verifica-se severa injúria nas folhas das plantas tratadas (necrose do limbo foliar). Os sintomas aparecem rápido e com maior intensidade quanto maior for a intensidade luminosa. Após a aplicação pode ocorrer a morte da planta em 1 a 2 dias.

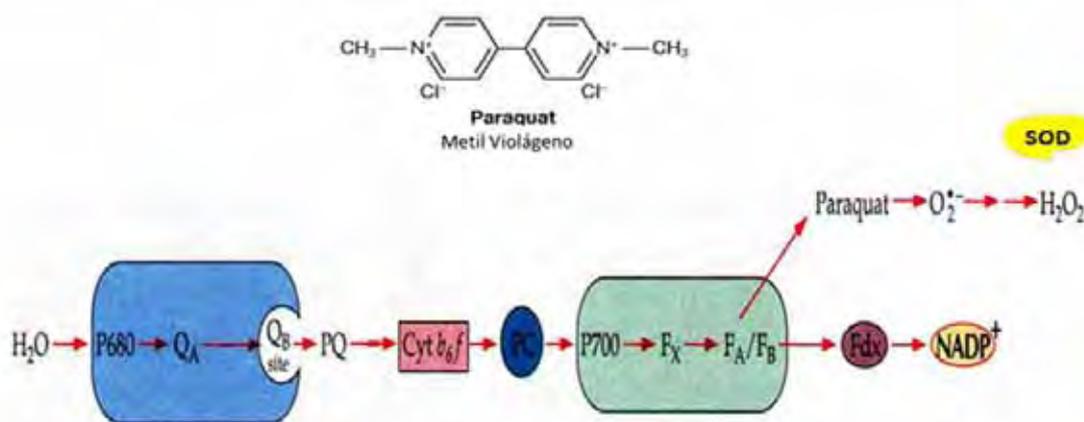


Figura 2. Sítio de ação do herbicida paraquat no cloroplasto (adaptação de BUCHANAN et al., 2000). Simulação representa como o paraquat atua como falso aceptor, desviando o fluxo de elétrons no fotossistema I para produção de radicais de ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$), em que os radicais superóxidos passam por processo de dismutação pela enzima SOD, para formarem H_2O_2 .

Para proteger o maquinário fotossintético, contra o estresse oxidativo induzido pelo paraquat, ocorre a atuação do sistema de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático. A exemplo das enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX, peroxidases não específicas, dentre outras (CHAGAS et al., 2008; LIU et al., 2009; SOOD et al., 2011), as quais atuam na redução das EROs, amenizando os danos oxidativos na célula vegetal, como já discutido anteriormente.

Aumento da atividade de enzimas que desintoxicam espécies reativas de oxigênio tem sido proposta como um mecanismo de resistência ao paraquat em estudos com diferentes culturas como cana-de-açúcar (CHAGAS et al., 2008), trigo (EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005; ROBERT et al., 2009), arroz (ZHENFEI et al., 2007), além de espécies

hortícolas como pepino (LIU et al., 2009; LIN et al., 2011) e abóbora (YEOL YOON et al., 2011).

Várias evidências indicam também que o mecanismo de tolerância a determinados estresses podem estar associados ao estresse oxidativo como o ocasionado pelo paraquat. Estudos dessa natureza usam o paraquat como comparativo de estresse oxidativo, como os relatados por LIU et al. (2009) em folhas de pepino pré-tratadas com quaraquat (PQ) e em seguida submetidas ao estresse salino. Os autores constataram que o paraquat contribui para o aumento de atividades das enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPX, APX, MDHAR e GR reduzindo danos na membrana durante o estresse salino.

SHAHRTASH et al. (2011), observaram em folha de milho pulverizadas com paraquat 10 mM por 24h, com ou sem ácido salicílico que o paraquat apresentou efeito inibitório no crescimento das plantas, reduziram os teores de clorofila, carotenóides, proteína total da folha e aumentaram a peroxidação lipídica, prolina livre e atividade da catalase. Esses efeitos foram reduzidos quando houve tratamento com paraquat e ácido salicílico, com possível papel mediador desse último na toxicidade do paraquat. SEDIGHEH et al. (2011) usaram paraquat para induzir a senescência artificialmente em folha de trigo, na concentração 600 μ M de PQ em 3h. O estresse oxidativo provocado pelo paraquat induziu o aumento da senescência, a produção de EROs e reduziu a atividade da APX, o que resultou na acumulação de peróxido de hidrogênio no cloroplasto, tendo efeito também na atividade da Rubisco com a sua desativação e degradação.

Em adição, o uso comparativo de tolerância ao paraquat correlacionada com as características associadas a tolerância à deficiência hídrica também foi evidenciado em alguns estudos, ITURBE-ORMAETXE et al. (1998) verificaram em folha de ervilha comportamento semelhante entre o estresse induzido por paraquat e deficiência hídrica, e os autores constataram que ambos os estresses provocaram danos oxidativos como redução da proteína solúvel, do conteúdo de clorofila total e da fotossíntese. ALTINKUT et al. (2001) investigaram a correlação entre as características associadas à seca e o estresse por paraquat em discos foliares de trigo e cevada, na concentração de 100 μ M PQ 24h, e encontraram que a tolerância a o paraquat foi correlacionada com o menor tamanho da folha e aumento no teor relativo de água, isto é, duas características também observadas nas cultivares tolerantes à deficiência hídrica.

PINHEIRO et al. (2004) usaram o paraquat como mediador de estresse oxidativo em discos foliares de café, em plantas tolerantes e sensíveis à deficiência hídrica, evidenciaram que a cultivar tolerante apresentou maior capacidade fotossintética sob

condições de seca e paraquat. MOLINARI et al. (2007) estudaram estresse oxidativo mediado por paraquat em cana-de-açúcar ao longo da deficiência hídrica, e verificaram que em plantas transgênicas transformadas com o gene P5CS indutor da produção de prolina, permaneceram verdes quando tratadas com paraquat na doses de 5 μM , apresentando maiores teores de clorofilas e prolina, sendo consideradas tolerantes, enquanto as plantas controle apresentaram grande decréscimo nessas variáveis, evidenciando os efeitos protetores da prolina para os danos causados pelo paraquat e deficiência hídrica.

SILVA et al. (2007b) avaliaram a degradação da clorofila em discos foliares em cana-de-açúcar nas soluções PQ (0 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM), em diferentes períodos (0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h). Os autores encontraram a concentração de 150 μM PQ em 24h como confiável para ser usada na triagem de cultivares tolerantes ao estresse, uma vez que desencadeou mudanças quantificáveis no conteúdo de clorofila. SILVA; CAPUTO (2009) estudaram quatro cultivares contrastantes de cana-de-açúcar quanto a tolerância à seca submetidos à deficiência hídrica e ao estresse fotooxidativo induzido por paraquat, e constataram que as cultivares tolerantes tiveram menores porcentagens de redução da clorofila em ambos os estresses. Estes estudos supracitados reforçam a ideia que o paraquat possa simular estresse oxidativo nas plantas em um período de tempo menor, para uma rápida avaliação de parâmetros fisiológicos em diferentes culturas, podendo indicar a sensibilidade e a tolerância ao estresse oxidativo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Condução do experimento e material vegetal

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação localizada na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Polo Centro-Oeste, Jaú, SP (22° 15' Latitude Sul e 48° 33' Longitude Oeste e Altitude 580 m). As cultivares foram escolhidas entre as mais representativas em cultivo a região Centro-Sul do Brasil, segundo CHAPOLA et al. (2009). Foram utilizadas quatro cultivares de cana-de-açúcar RB92579, SP83-2847, SP81-3250 e IAC91-5155, em que a IAC91-5155 foi considerada como padrão tolerante à deficiência hídrica (QUEIROZ et al., 2011).

As plantas foram obtidas por meio de brotação das gemas provenientes de toletes de mesma idade. Os toletes foram cultivados em vasos de 22 litros, preenchidos com substrato Plantmax® (produto estéril elaborado a base de vermiculita expandida e material orgânico, contendo macro e micronutrientes necessários ao desenvolvimento inicial das mudas) misturados a 40 g de sulfato de amônia e 55 g do fertilizante formulado nitrogênio: fosfato: potássio (NPK, 8-28-16, p/p/p) por vaso.

Em cada vaso foram plantados dois mini toletes com gemas individuais de cada cultivar, posteriormente houve desbaste, deixando apenas uma única planta. Nesta planta apenas o perfilho primário foi mantido para a avaliação, para eliminar efeitos varietais de perfilhamento e ocupação desigual dos vasos. Durante o experimento dentro da casa de vegetação, temperatura e umidade relativa do ar e radiação fotossinteticamente ativa (RFA) foram medidas diariamente utilizando os aparelhos

termohigrômetro portátil (marca Acurite, China) e medidor quantum apogee (Logan, Utah, EUA), respectivamente. A média diária para temperatura média do ar, ao longo do experimento, foi de $27,4 \pm 5$ °C, e umidade relativa de 62,8% (Figura 3A), enquanto a média diária da RFA foi de $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 3B). Para o monitoramento da umidade nos vasos, utilizou-se do medidor ECH2O (Decagon, Washington, EUA), por se tratar de um aparelho bastante eficiente neste controle (PARSONS; BANDARANAYAKE, 2009). Para tanto, sensores dielétricos Echo Check (Decagon, Washington, EUA) de 10 cm de comprimento foram inseridos nos vasos, na quantidade de um por vaso.

5.2 Experimento I (Deficiência hídrica e Reidratação)

Após 85 dias do plantio foi realizada a primeira avaliação antes do estresse (zero dias), em seguida cada cultivar foi separada em dois tratamentos, sem deficiência hídrica (-D) em que as plantas foram hidratadas com quantidade necessária para manter o teor de umidade ideal no substrato, em torno de 22% (que corresponde a 100% da capacidade de campo) e com deficiência (+D) por 15 dias de suspensão da rega, quando o teor de umidade no substrato atingiu valores inferiores a 10% no décimo quinto dia (Figura 3C). A reidratação foi imposta após os 15 dias de estresse, e consistiu em reirrigar todas as plantas por 12 dias até a recuperação, sendo considerados assim três períodos de avaliação: aos 0 dias (antes do estresse), 15 dias (deficiência hídrica) e 27 dias (reidratação) após o início dos tratamentos (DAT), nesse período foram coletados dados fisiológicos e bioquímicos. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4×2 , sendo os fatores: quatro cultivares, dois regimes hídricos (sem deficiência = -D, e com deficiência = +D), com quatro repetições.

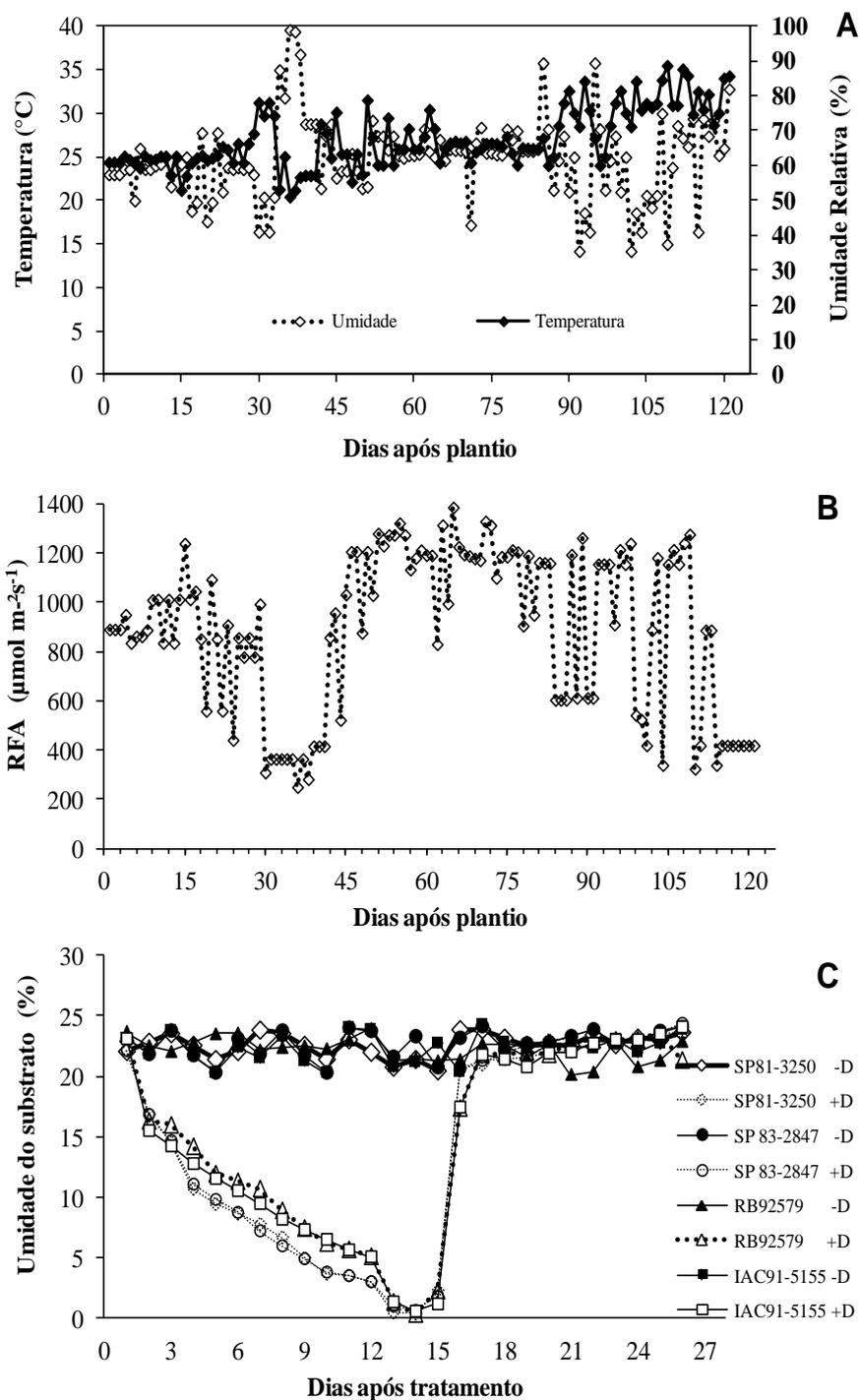


Figura 3. Médias diárias da Umidade relativa do ar e temperatura média (A), Radiação fotossinteticamente ativa, RFA (B) na casa de vegetação durante o experimento e Teor de umidade do substrato ao longo do estresse (sem deficiência = -D, e com deficiência = +D) para todas as cultivares (C).

5.3 Avaliações de atributos morfológicos e fisiológicos

5.3.1 atributos morfológicos

Na determinação da altura do colmo, apenas o perfilho primário foi mantido e seu crescimento foi monitorado nas três datas de avaliação no experimento I, por meio de uma fita métrica, da superfície do solo até a folha +1. Na contagem do número de folhas foram consideradas as folhas com pelo menos 20% de área foliar verde. A área foliar por planta foi determinada por meio da contagem do número de folhas verdes (folha totalmente expandida com o mínimo de 20% de área verde, contada a partir da folha +1) e pelas medições nas folhas +3, sendo obtidos o comprimento e a largura da folha na porção mediana, segundo metodologia descrita por HERMANN; CÂMARA (1999):

$$AF = C \times L \times 0,75 \times (N + 2)$$

Em que C é o comprimento da folha +3, L é a largura da folha +3, 0,75 é o fator de correção para área foliar da cultura, e N é o número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde.

5.3.2 Atributos fisiológicos

A condutância estomática (gs , $mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$) foi determinada por intermédio de um porômetro (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, EUA). As leituras foram realizadas na região mediana da folha +1 na parte abaxial totalmente expandida, avaliadas ao longo do dia das 7 as 16 h em intervalos de 3 h, medindo-se uma folha por planta. O porômetro permitiu, também, a medida da temperatura das folhas (T_f), temperatura do ar (T_{ar}) e da umidade relativa da câmara porométrica (UR_{ar}) no nível da folhagem, sendo calculado o déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar, $DPV_{(folha-ar)}$. O $DPV_{(folha-ar)}$ foi obtido conforme LOBO et al. (2007), calculando-se a diferença entre as pressões de saturação (e_s) e real (e) do ar, utilizando-se medidas de T_f , T_{ar} e UR_{ar} . Assim, $DPV_{(folha-ar)} = (e_f - e_{ar})$, em KPa, onde e_f = pressão de vapor na câmara subestomática da folha (kPa), e_{ar} = pressão de vapor no ar atmosférico (kPa). Portanto:

$$dpv = 0,61078 \times 10^{\left(\frac{17,5 \times T_f}{237,5 + T_f}\right)} - \frac{0,61078 \times 10^{\left(\frac{17,5 \times T_{ar}}{237,5 + T_{ar}}\right)} \times UR_{ar}}{100}$$

Em que: T_f = temperatura da folha (°C), T_{ar} = temperatura do ar atmosférico (°C) e UR_{ar} = umidade relativa do ar atmosférico (%).

A eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) foi determinada por meio de um fluorômetro portátil (Opti-Sciences, Inc., Hudson, NH, EUA) após adaptar as folhas ao escuro por 30 minutos utilizando-se cliques foliares. As leituras foram realizadas com pulsos de luz saturantes de 1 s, para promover o fechamento dos centros de reação do PSII, de acordo com o método descrito por MAXWELL; JOHNSON (2000). As leituras foram realizadas na região mediana da folha +1 totalmente expandida, também ao longo do dia entre 7 e 16 h com intervalos de 3 h, medindo-se uma folha por planta.

A estimativa do conteúdo de clorofila via leitura SPAD (índice SPAD) foi determinada usando um clorofilômetro SPAD-502 (Minolta Corp., Ramsey, NJ, EUA). Para a média da parcela (vaso) foram consideradas três leituras na folha +2. A leitura SPAD corresponde ao teor de cor verde na folha, e seu valor é equivalente à quantidade de luz transmitida pela folha em duas regiões de comprimento de onda vermelho e infravermelho, a quantidade de luz vermelha absorvida indica a quantidade de clorofila, enquanto que a quantidade de luz absorvida ao infravermelho serve como uma referência interna na compensação da espessura da folha (TORRES NETTO et al., 2005).

O potencial hídrico foliar (Ψ_w) foi avaliado entre 10 e 12 h usando uma câmara de pressão Scholander (SoilMoisture Equipment, Santa Bárbara, CA, EUA). A leitura foi determinada na extremidade (ponta) da folha +2 do perfilho primário, onde foi aplicada pressão até ocorrer a exsudação pelo corte feito no pecíolo da folha. O teor relativo de água na folha (TRA) foi obtido conforme a metodologia apresentada por Jamaux et al. (1997), em que foram determinadas as massas fresca (M_f), túrgida (M_t) e seca (M_s) em discos foliares extraídos da folha +2. Em seguida, os valores das massas foram substituídos na fórmula:

$$TRA = [(M_f - M_s) \times (M_t - M_s)^{-1}] \times 100$$

5.4 Experimento II (Estresse oxidativo induzido pelo herbicida Paraquat)

Aos 85 dias após o plantio simultaneamente ao início do tratamento com deficiência hídrica, foi conduzido o experimento II com tratamento de paraquat (+PQ), distribuído em duas partes. A concentração de paraquat 150 μM utilizada nesse estudo foi baseada no estudo preliminar realizado por SILVA et al. (2007b).

5.4.1 Experimento II, parte I: Avaliação de atributos fisiológicos

Na primeira etapa, o paraquat foi pulverizado em toda a planta de cada parcela, na concentração de paraquat 150 μM e avaliado o efeito depois de 24h da aplicação. O paraquat foi pulverizado em toda a planta de cada parcela, na concentração de paraquat 150 μM e avaliado o efeito fisiológico depois de 24h da aplicação. As plantas tratadas com paraquat foram representadas como +PQ.

Entre os atributos fisiológicos, a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) foi realizada leitura na região mediana da folha +1 no segundo dia após a aplicação do paraquat, também com curva ao longo do dia entre 7 e 16 h com intervalos de 3 h, medindo-se uma folha por planta. A condutância estomática e estimativa do conteúdo de clorofila via leitura SPAD, foram medidas 24h após aplicação de paraquat em folha +1, e ao término das avaliações essas folhas foram coletadas para realização de análises bioquímicas. Os atributos fisiológicos do tratamento com +PQ foram comparados com os obtidos com 15 dias sob deficiência hídrica (+D) e controle (-D).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x3, sendo os fatores: quatro cultivares e três regimes de estresse (controle= C, com deficiência = +D, e paraquat +PQ), com quatro repetições.

5.4.2 Experimento II, parte II: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos em discos foliares após Paraquat

A segunda parte do experimento II foi realizado com segmentos foliares coletados também aos 85 dias após o plantio para avaliar a degradação de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides). As folhas foram cortados em discos (0,69 cm^2) e imersos em solução de Paraquat por 24 h em placas de Petri, com 150 μM dissolvidos em 30 ml de água deionizada. Em seguida foram dispostas em câmara de crescimento (Figura 4)

mantida a 27 °C e intensidade de luz contínua de 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por 24 h. Foi considerada plantas tratadas com paraquat (+PQ) e controle (-PQ ou -D). Os resultados foram comparados aos dos discos foliares das plantas submetidas a 15 dias de deficiência hídrica (+D). Dessa forma o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4 cultivares x 3 regimes de estresse), com quatro repetições.

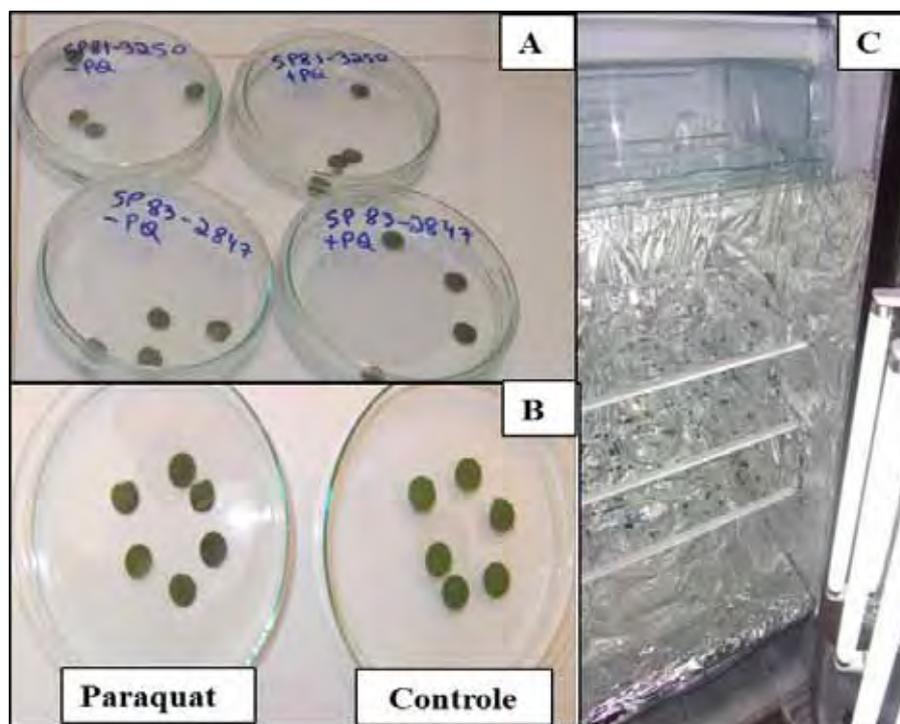


Figura 4. Discos foliares de cana-de-açúcar imersos em solução de Paraquat por 24h em placas de Petri (A), sintomas de discos foliares tratados com paraquat +PQ, e controle, -PQ, após 24h e exposição a luz (B) e câmara de crescimento (C).

5.5 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas nos experimentos I e II, no Laboratório do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP-IB. No experimento I foram realizadas coletas a partir de folhas +1 nas mesmas plantas em que foram avaliados os atributos fisiológicos, sendo considerado a partir dos 85 dias após o plantio três pontos de coletas, para o experimento deficiência hídrica e reidratação: zero dias (Antes do estresse), aos 15 dias (período de deficiência hídrica) e 27 dias após o início dos tratamentos (reidratação por 12 dias) submetidos aos regimes hídricos

adequado (-D) e deficiência hídrica (+D). No experimento II, estresse oxidativo induzido por paraquat, folhas +1 foram coletadas após sua exposição na concentração de 150 μM PQ por 24 h de aplicação, considerando sem paraquat, ou seja, regime hídrico adequado (-D) e com paraquat (+PQ), os resultados foram comparados ao tratamento +D. As amostras foliares de folha +1 foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -20°C para posteriores análises enzimáticas, de proteínas, prolina e carboidrato. Amostras de folhas +2 também foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração para análise de pigmentos foliares em ambos os estresses.

5.5.1 Determinação de conteúdo de pigmentos fotossintéticos

Foi analisado a degradação de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), clorofila *total* (Chl *total*) e carotenóides (*Car*) segundo o método descrito por LICHTENTHALER (1987), em que o extrato de clorofila foi obtido à partir da utilização de discos foliares de $0,69\text{ cm}^2$, incubados em 2 ml do solvente dimetilformamida, realizou-se a leitura de absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 480, 647 e 664 nm.

5.5.2 Determinação dos teores de prolina livre

O extrato para a determinação de prolina livre foi obtido a partir de 100 mg de material foliar seco com adição de 8 mL de ácido sulfossalicílico a 3%, sendo a mistura mantida em agitação constante por uma hora à temperatura ambiente (25°C). Após esse período, o homogenato foi centrifugado a 3.000 g por 10 minutos, à temperatura ambiente, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante usado para a determinação de prolina livre pelo método descrito por BATES et al. (1973), através da reação com a solução de ninhidrina ácida (na proporção de 1,25g de ninhidrina, em 30 mL de ácido acético glacial, e 20 mL de ácido fosfórico 6M). Após repouso e formação da mistura bifásica, a fase superior foi retirada para a quantificação dos níveis de prolina livre, através de medidas de absorbância em 520 nm. Como padrão foi utilizado a prolina pura e os resultados expressos em $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$.

5.5.3 Determinação de carboidratos solúveis totais

Na determinação de carboidratos solúveis foi usado 100 mg de material foliar seco, e realizada a obtenção do extrato segundo descrito por DUBOIS et al. (1956). Em seguida adicionou-se a tubos de ensaio comum 500 μ L do sobrenadante + 500 μ L de fenol 5% + 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada vigorosamente, em seguida deixada em repouso por cerca de 20 minutos em bandeja contendo água com gelo, para resfriamento e fixação da cor. A leitura no espectrofotômetro foi feita a 490 nm, como padrão foi utilizado a D (+) glicose anidra e os resultados expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS.

5.5.4 Extração e atividade das enzimas antioxidantes

5.5.4.1 Superóxido dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com método descrito por BEAUCHAMP; FRIDOVICH (1973). O extrato foi obtido a partir de 300 mg de tecido foliar fresco, e foram adicionados em 3 mL do tampão de extração contendo 50 mM tampão fosfato de potássio (TFK; pH 7,8), 100 mg de Polivinilpirrolidona (PVP) e água destilada. Após a centrifugação a 14000 g por 15 minuto a 4°C, foi retirada uma alíquota de 100 μ L de extrato vegetal, a qual foi colocada no meio de reação. Sendo este preparado com TFK à 50 mM (pH 7,8); EDTA 100nM; Cloreto de Azul de Nitroblutetrazólio (NBT) 75 μ M; Metionina 13 mM e Riboflavina 2 μ M, com volume final de 3mL. Os tubos contendo o meio de reação foram colocados em uma câmara escura com luz fluorescente a 20 watts por 10 minutos, para ocorrência da reação. Os tubos considerados brancos receberam os mesmos reagentes, porém foram mantidos cobertos por papel alumínio.

Após esse período, as leituras realizadas em espectrofotômetro a 560 nm. A determinação da atividade da SOD é dada pelo fato da enzima inibir a fotorredução do Cloreto de Azul de Nitroblutetrazólio (NBT). Deste modo, observou-se a formação da formazana proveniente da redução do NBT em presença de luz. Com isso, as unidades SOD foram calculadas, e uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT. Os valores expressos em unidades de SOD mg^{-1} de proteínas.

5.5.4.2 Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada segundo metodologia adotada por HAVIR et al. (1987), com algumas modificações. O extrato foi obtido de acordo com a metodologia de KAR; MISHRA (1976) a partir de 400 mg de material foliar fresco e foram adicionados em 5 mL do tampão de extração contendo 50 mM TFK (pH 6,8), 100 mg de Polivinilpirrolidona (PVP) e água destilada. Após a centrifugação à 14000 g, por 15 minutos, à 4 °C, foi retirada uma alíquota de 150 µL e colocada no meio de reação, com 50 mM TFK (pH 7,0) e H₂O₂ a 50 mM com volume final de 3mL. A reação iniciou-se após a adição do extrato vegetal na cubeta de quartzo. As leituras foram realizadas na absorvância de 240 nm, durante um minuto, observando-se o decréscimo da concentração de H₂O₂. Foi adotado um coeficiente de extinção do H₂O₂ de 36 mM⁻¹ cm⁻¹ a 240 nm. Os valores foram expressos em unidade de CAT mg⁻¹ g⁻¹ de proteína.

5.5.4.3 Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi determinada segundo metodologia adotada por NAKANO; ASADA (1981) com algumas modificações. O extrato foi obtido a partir de 20 mg de material foliar fresco, e foram adicionados em 2 mL do tampão de extração contendo 50 mM TFK (pH 7,5); EDTA 2 mM; Ascorbato de Sódio 20 mM; Triton X 100 à 0,1%; 100 mg de Polivinilpirrolidona (PVP) completando-se com água destilada. Após a centrifugação 14000 g, por 15 minutos, a 4 °C, foi retirada uma alíquota de 30 µL e colocada no meio de reação. Sendo este preparado com 50 mM TFK (pH 7,5); H₂O₂ a 0,05 mM e Ascorbato de Sódio a 0,5 mM, completado-se o volume com água destilada para 3 mL. Os reagentes do meio de reação foram colocados a 25 °C, em banho-maria, exceto o extrato que ficou no gelo a 4 °C. A reação foi iniciada após a adição do extrato vegetal na cubeta de quartzo. As leituras de absorvância foram realizadas a 290 nm, por um minuto, observando decréscimo na concentração do ascorbato. Foi utilizado um coeficiente de extinção do ascorbato de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ a 290 nm, os valores foram expressos em unidades de APX mg⁻¹.g⁻¹ proteína.

5.5.5 Determinação de proteínas solúveis totais

A determinação quantitativa de proteínas solúveis foi feita através do método de BRADFORD (1976). Para tanto, foram utilizados 50 μL do extrato enzimático, no qual foi completado para 2,5 mL da solução Coomassie Brilliant Blue G-250. As proteínas, então, foram estimadas pelas medidas de absorvância em 595 nm. Como padrão foi utilizado a caseína, os resultados expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{MF}$.

5.6 Análise estatística

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância (teste F), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ou desvio padrão. Foi utilizada a correlação de Pearson (r) (BRUSSAB; MORETTIN, 1986) para verificar a relação entre as variáveis fisiológicas e os componentes bioquímicos no período de estudo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Experimento I: Alterações fisiológicas e bioquímicas em cultivares de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica e reidratação

A resposta da cana-de-açúcar ao estresse por deficiência hídrica é um mecanismo complexo devido à variação genética das cultivares, do estágio de desenvolvimento da planta, além da duração e da severidade do estresse (HEMAPRABHA et al., 2013). Neste sentido, na primeira parte desse estudo alguns desses mecanismos como atributos fisiológicos, solutos orgânicos e enzimas antioxidantes foram analisados a fim de diferenciar cultivares tolerantes das sensíveis à seca.

6.1.1 Efeito da deficiência hídrica nos atributos morfológicos em cana-de-açúcar

De modo geral, pôde-se verificar que o número médio de folhas verdes por colmo foram aumentos de 8 para 12 folhas entre 85 e 112 dias após o plantio nas planta bem hidratadas (Figura 5 A, D, G e J). De acordo com MILLER; GILBERT (2009), o número de folhas por colmo é pequeno em plantas jovens e aumenta à medida que o colmo cresce, atingindo um número máximo de 10 ou mais folhas por colmo, dependendo da cultivar e condições de crescimento.

Após 15 dias sob deficiência hídrica pôde-se constatar paralisação na emissão foliar e maiores aumentos na senescência foliar nas cultivares RB92579 e SP81-3250 de 50% e 32%, respectivamente. As mesmas cultivares não apresentaram recuperação durante

a reidratação permanecendo com reduções no número de folhas de 44 % para RB92579 e de 22% para SP81-3250 (Figura 5 A e D). Nas cultivares IAC91-5155 e SP83-2847 foram encontrados pouca senescência foliar no período de estresse (Figura 5 G e J), inferindo que as mesmas apresentam grau de tolerância à seca para essa variável.

Tabela 1. Atributos morfológicos de número de folhas verdes por colmo, altura de colmos (cm) e área foliar (cm²) em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias.

| Fonte de variação | GL | Atributos morfológicos | | |
|----------------------------|----|------------------------|-------------------|--------------------------------|
| | | Nº de folhas verdes | Altura (cm) | Área foliar (cm ²) |
| Antes do estresse | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 20,0** | 137,0** | 25,4** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 0,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} |
| C x Rh | 3 | 1,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} |
| CV% | | 6,3 | 4,5 | 16,0 |
| Deficiência hídrica | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 10,3** | 66,6** | 43,5** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 138,3** | 53,6** | 259,3** |
| C x Rh | 3 | 39,6** | 8,2** | 36,5** |
| CV% | | 6,7 | 5,8 | 10,1 |
| Reidratação | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 32,7** | 335,8** | 71,2** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 123,0** | 126,7** | 126,6** |
| C x Rh | 3 | 31,6** | 12,3** | 37,2** |
| CV% | | 6,2 | 3,0 | 5,0 |

G.L.: graus de liberdade; ns: não significativo; *: significativo (P>0,05); **: significativo (P<0,01); C.V.: coeficiente de variação.

Estes resultados estão de acordo com PINCELLI; SILVA (2012) que encontraram forte redução do número de folhas por colmo em cultivares sensíveis sob deficiência hídrica em casa-de-vegetação. Os autores sugerem que a manutenção de números de folhas verdes durante a deficiência hídrica pode ser um indicativo de tolerância à seca. MACHADO et al. (2009) também constataram em cana-de-açúcar uma acentuada senescência foliar e restrição ao surgimento de novas folhas no período de seca. Segundo SMIT; SINGELS (2006), durante a deficiência hídrica em cana-de-açúcar, a senescência foliar e redução da área foliar é atribuída à estratégia para diminuir a superfície transpirante e o gasto metabólico para a manutenção dos tecidos.

Em relação à altura de colmo, constatou-se que a deficiência hídrica promoveu paralização do crescimento em todas as cultivares, com maiores reduções da altura nas cultivares RB92579 (31%) e SP81-3250 (18%) (Figura 5B e E), enquanto nas cultivares IAC91-5155 e SP83-2847 essas reduções foram de 4,7 % e 12,2%, respectivamente (Figura 5H e K), evidenciando a manutenção do crescimento dessas plantas durante a deficiência hídrica. Durante a reidratação as cultivares RB92579 e SP81-3250 apresentaram crescimento lento com baixo incremento na altura das plantas quando comparado ao controle, o que sugere que as plantas foram mais sensível e não se recuperaram completamente.

Redução significativa do crescimento de cultivares sensíveis de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica também foram encontrados por MACHADO et al. (2009) e PINCELLI (2010). INMAN-BAMBER; SMITH (2005) também constataram que a altura de colmos é fortemente afetada sob condições de seca em cana-de-açúcar. SILVA et al. (2008), estudando 78 cultivares de cana-de-açúcar submetidas a deficiência hídrica em condições de campo, verificaram menores reduções de altura de colmos para as cultivares tolerantes as quais estavam associadas a alta produtividade, de acordo com os autores, a variação na altura do colmo é um indicativo de tolerância ou susceptibilidade da cana-de-açúcar à deficiência hídrica.

Quanto a área foliar, maiores reduções foram encontradas com 15 dias de deficiência hídrica nas cultivares RB92579 (64%) e SP81-3250 (42,5%) (Figura 5C e F), podendo-se evidenciar que o crescimento da área foliar foi lento durante a reidratação onde as cultivares permaneceram com reduções significativas de RB92579 (40%) e SP81-3250 (21%), o que pode ser um indicativo de maior sensibilidade dessas cultivares à restrição hídrica. Neste sentido, acrescenta que em condições de seca, essas cultivares podem ser mais prejudicadas por reduzirem sua área foliar.

Quando submetidas a deficiência hídrica, as cultivares IAC91-5155 e SP83-2847 apresentaram reduções na área foliar de 40% e 18,2% (Figura 5I e L), respectivamente, porém observou-se recuperação plena nessas cultivares durante a reidratação. Pôde-se também observar características de estreitamento das folhas na cultivar IAC91-5155 ao longo de todo experimento, o que sugere que a manutenção de menor área foliar dessa cultivar pode ser um mecanismo adaptativo de defesa aos estresses abióticos. Segundo TAIZ; ZEIGER (2009), um ajustamento da área foliar é uma mudança importante a longo prazo, que beneficia a adequação da planta a um ambiente com limitação hídrica.

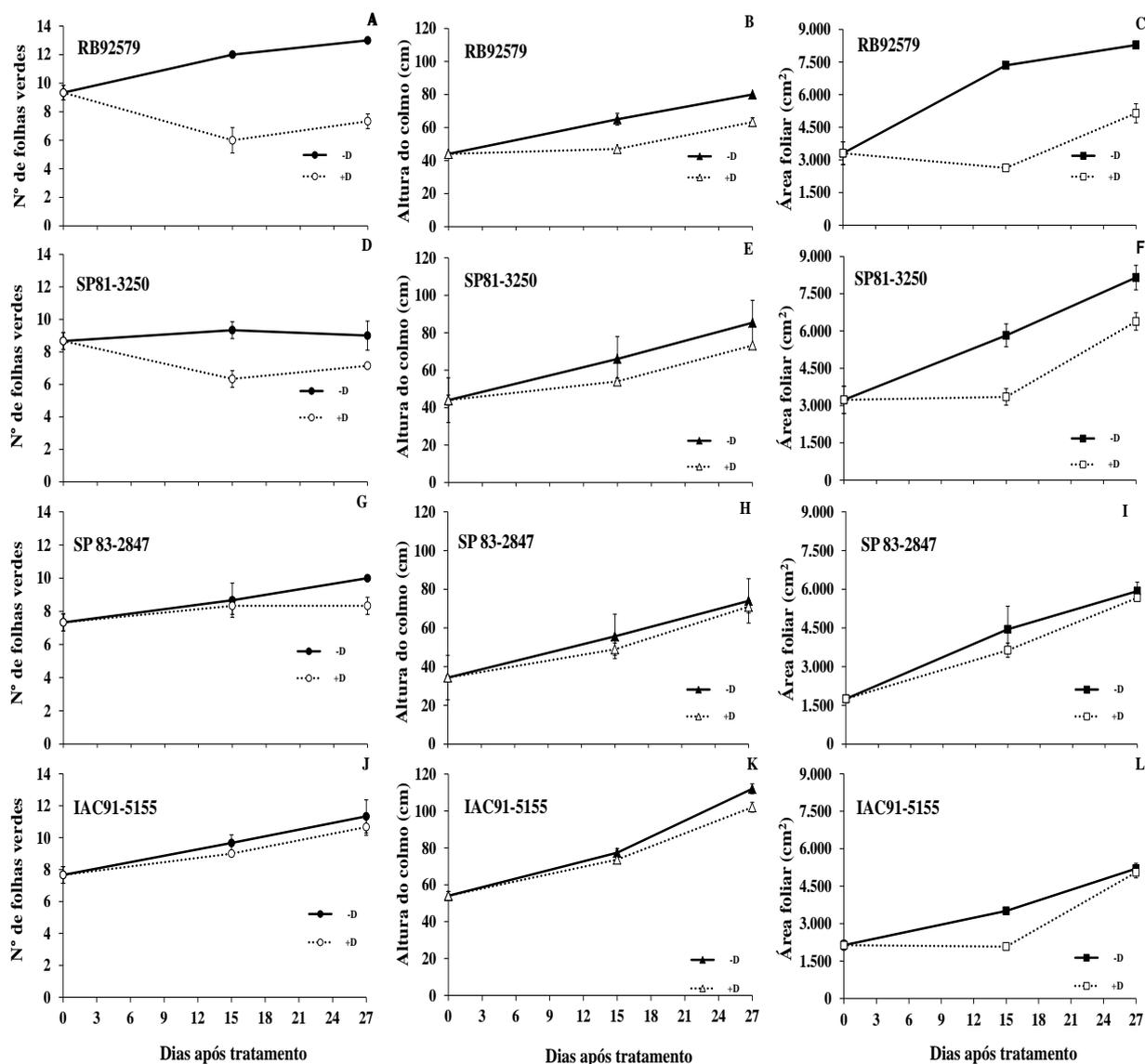


Figura 5. Número de folhas verde por colmo (A, D, G e J), Altura de colmos (B,E,H e K) e Área foliar (C,F,I e L) em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

De acordo com FARIAS et al. (2008), um efeito de particular importância em resposta a deficiência hídrica em cana-de-açúcar é a limitação à expansão da área foliar, esse redução pode ser considerada uma primeira linha de defesa contra à seca. Fato que se deve ao efeito primário do estresse hídrico no decréscimo do alongamento celular, devido à diminuição do turgor da célula influenciando negativamente a área foliar (TAIZ; ZEIGER, 2009).

SMIT; SINGELS (2006) e PINCELLI; SILVA (2012), em estudo com cana-de-açúcar submetida a deficiência hídrica, encontraram maiores reduções na área foliar em cultivares sensíveis ao estresse. Maiores reduções de área foliar em cana-de-açúcar em período de deficiência hídrica também foram relatados por (INMAM-BAMBER; SMITH, 2005; ALMEIDA et al., 2008; FARIAS et al., 2008). Em adição, estudos mostram que a área foliar da cana-de-açúcar aumenta no período de grande crescimento da cultura, quando verifica-se os maiores índices de área foliar e números de folhas nesse período, ou seja, alta eficiência fotossintética em plantas hidratadas (SMIT; SINGELS, 2006).

6.1.2 Variação diurna das variáveis fisiológicas em resposta a deficiência hídrica

6.1.2.1 Déficit de pressão de vapor $DPV_{(folha-ar)}$

Uma das variáveis ambientais mais importantes a qual o estômato responde é o déficit de pressão de vapor, $DPV_{(folha-ar)}$. A resposta da condutância estomática em relação ao $DPV_{(folha-ar)}$ foi um importante fator em relação à quantidade de água utilizada pela cana-de-açúcar nesse estudo. Valores baixos de $DPV_{(folha-ar)}$ foram verificados antes do estresse, ou seja, sem restrição hídrica, os quais variaram entre 1,0 e 1,6 KPa para todas as cultivares ao longo do dia (Figura 6A, D, G e J).

O aumento da pressão de vapor foi observada nas cultivares estressadas durante o período de 15 dias sob deficiência hídrica, com maior variação para nas cultivares RB92579 e SP81-3250, com picos entre 10 h e 13 h. Constatou-se nesse período maior aumento da variação do $DPV_{(folha-ar)}$ quando comparado com o controle, para cultivar RB92579 de 2,2 a 3,8 KPa e em SP81-3250 de 2,5 a 3,6 KPa (Figura 6H e K). o que pode ter contribuído na diminuição acentuada em gs e aumento da temperatura foliar para essas cultivares como será discutido nos próximos tópicos.

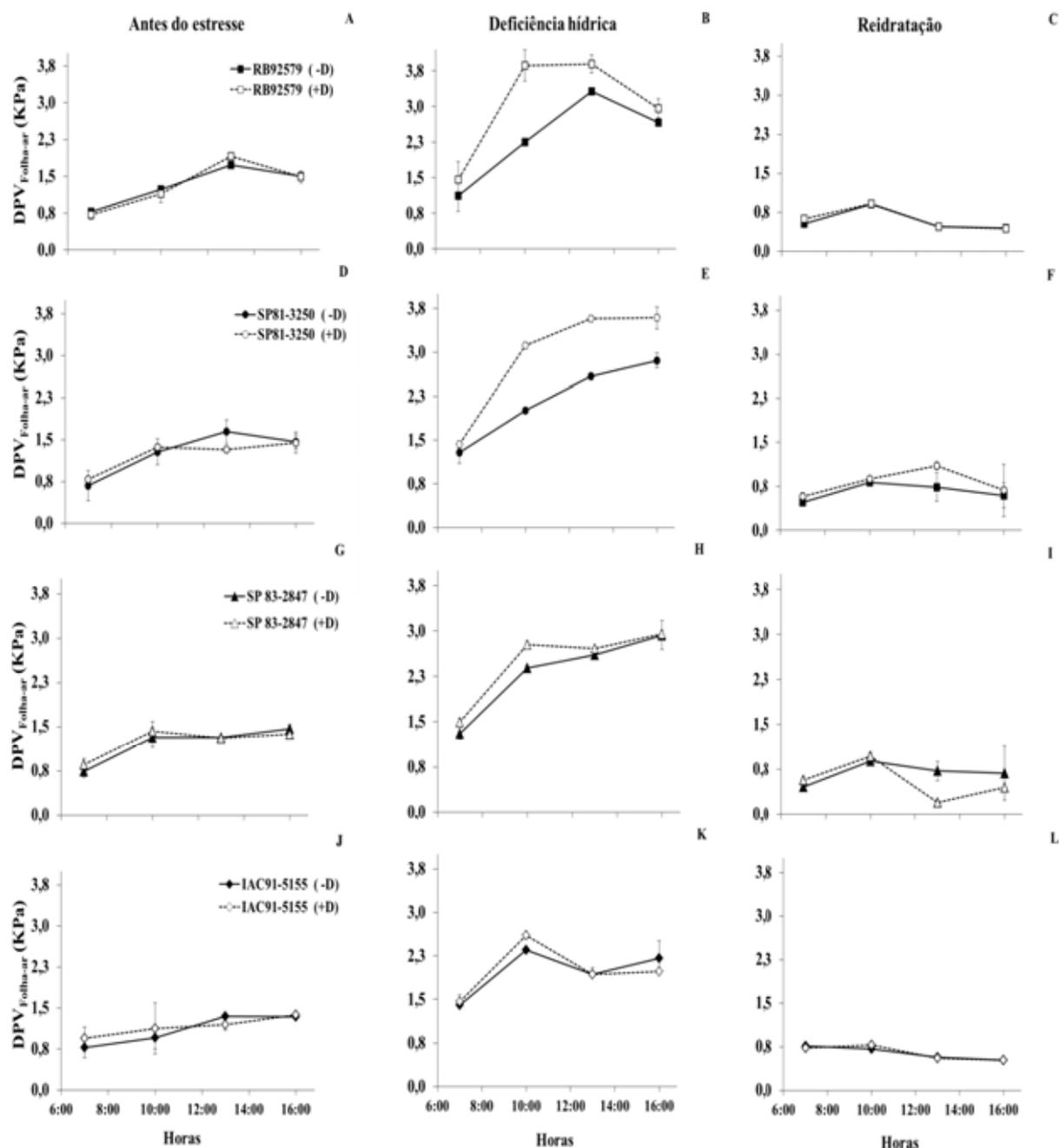


Figura 6. Déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar, $DPV_{(folha-ar)}$ ao longo do dia nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse (A, D, G e J), deficiência hídrica (B, E, H e K) e reidratação (C, F, I e L). Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

Em outras espécies C_4 , tais como milho (LOPES et al., 2009) e capim-elefante anão (ARAÚJO et al., 2010), também foi verificada em condição de baixa

disponibilidade hídrica do solo e elevado $DPV_{(folha-ar)}$ redução na condutância estomática, provavelmente pelo efeito do déficit de pressão de vapor no fechamento estomático. Em estudo com cana-de-açúcar em condições de campo foi verificado que valores de $DPV_{(folha-ar)}$ acima de 3 KPa apresentaram forte correlação negativa com a eficiência do uso da água em diferentes genótipos (ENDRES et al., 2010).

Fato que não foi verificado nas demais cultivares que mantiveram o $DPV_{(folha-ar)}$ com pouca variação no período de deficiência hídrica, como para SP83-2847 que teve variação de 2,3 a 2,7 KPa e para a IAC91-5155 que variou de 2,3 a 2,6 KPa (Figura 6H e K), o que sugeri maior capacidade de resfriamento foliar e menor sensibilidade estomática a esta variável. Todas as cultivares reduziram o $DPV_{(folha-ar)}$ na reidratação, com valores médios de 1,0 KPa no tratamento de deficiência hídrica e controle, ocasião em que foram registrados os maiores valores de condutância estomática (Figura 6 e 7).

6.1.2.2 Condutância estomática (gs)

Na busca da melhor compreensão sobre o comportamento estomático, os valores de condutância estomática (gs) foram avaliados na parte abaxial foliar, onde a cana-de-açúcar apresenta maior densidade de estômatos (PINCELLI; SILVA, 2012). Na fase inicial dos tratamento, ou seja, sem deficiência hídrica e baixo $DPV_{(folha-ar)}$ ao longo do dia, quando as plantas apresentavam 85 dias de crescimento, a curva ao longo do dia oscilou na faixa de 400 a 2000 $mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$ para a maioria das cultivares, com picos de abertura estomática as 10 h (Figura 7A, D, G e J).

Os valores mais baixos de condutância estomática ao longo do dia foram verificados com 15 dias de deficiência hídrica em todas as cultivares (Figura 7B, E, H e K). A partir das 10 h da manhã foi observado fechamento estomático semelhante nas cultivares RB92579 e SP81-3250, devido aos valores de condutância estomática estarem próximos de 40 $mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$ (Figura 7 B e E) coincidindo com os horários de maior $DPV_{(folha-ar)}$ (Figura 7B e E) fato que deve ter contribuído para maior sensibilidade estomática nessa cultivares. O fechamento estomático reduz a transpiração, diminuindo a capacidade de refrigeração da folha e aumentando a temperatura deste órgão, uma vez que a folha continua recebendo luz, causando elevação no $DPV_{(folha-ar)}$ (ARAÚJO et al., 2010).

No mesmo período de deficiência hídrica os valores de condutância estomática apresentaram menores reduções para as cultivares SP83-2847 e IAC91-5155 (Figura 7H e K). Os menores valores gs foram encontrados às 10 h da manhã 115 e 110

$\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente, mantendo valores mais elevados ao longo do dia, o que demonstra que essas cultivares apresentam controle estomático mais eficiente em condições de limitado suprimento hídrico no solo, quando comparada com as demais cultivares. Segundo LAWLOR; TEZARA (2009), em situação de deficiência hídrica, as plantas mantêm os estômatos fechados como uma forma da planta minimizar a perda de água e manter certo turgor foliar, o que é uma importante característica de tolerância à seca.

As plantas submetidas à deficiência hídrica severa por 15 dias de suspensão da rega apresentaram decréscimo significativo da condutância estomática (gs) em relação às plantas-controle (Figura 7). Porém, foi observado maior decréscimo de gs às 10 h da manhã na RB92579, com 97% , SP81-3250 com 98% e SP83-2847 a redução foi de 94% e menores reduções na IAC91-5155 de 74%, que manteve maior condutância estomática quando comparada com as demais cultivares sob restrição hídrica.

Diferentes pesquisas em cana-de-açúcar reportaram que maiores fechamentos estomáticos foram encontrados em cultivares sensíveis à deficiência hídrica (SILVA; COSTA, 2009; GRAÇA et al., 2010; SILVA et al., 2012), sugerindo que esse mecanismo é uma estratégia da planta para diminuir a perda de água pela transpiração, na tentativa de manter a atividade fotossintética na planta, assim identificado gs como um dos mecanismos fisiológicos responsáveis pela tolerância à seca.

No período de reidratação também pôde-se verificar comportamento semelhante com maiores abertura estomática ao longo dia, em que a gs oscilou na faixa de 400 a 2400 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a maioria das cultivares, com picos as 10 h da manhã (Figura 7), o que evidencia que todas as cultivares apresentaram recuperação da deficiência hídrica para gs. Além do mais, a manutenção dos estômatos parcialmente fechados ao longo de todo estudo na cultivar IAC91-5155 pode ser uma evidência do mecanismo de adaptativo a diferentes condições de estresse. Já as maiores taxas de condutância estomática para RB92579 quando bem hidratadas em comparação as demais cultivares, sugere que essa cultivar é mais eficiente ao uso da água em condições normais de cultivo.

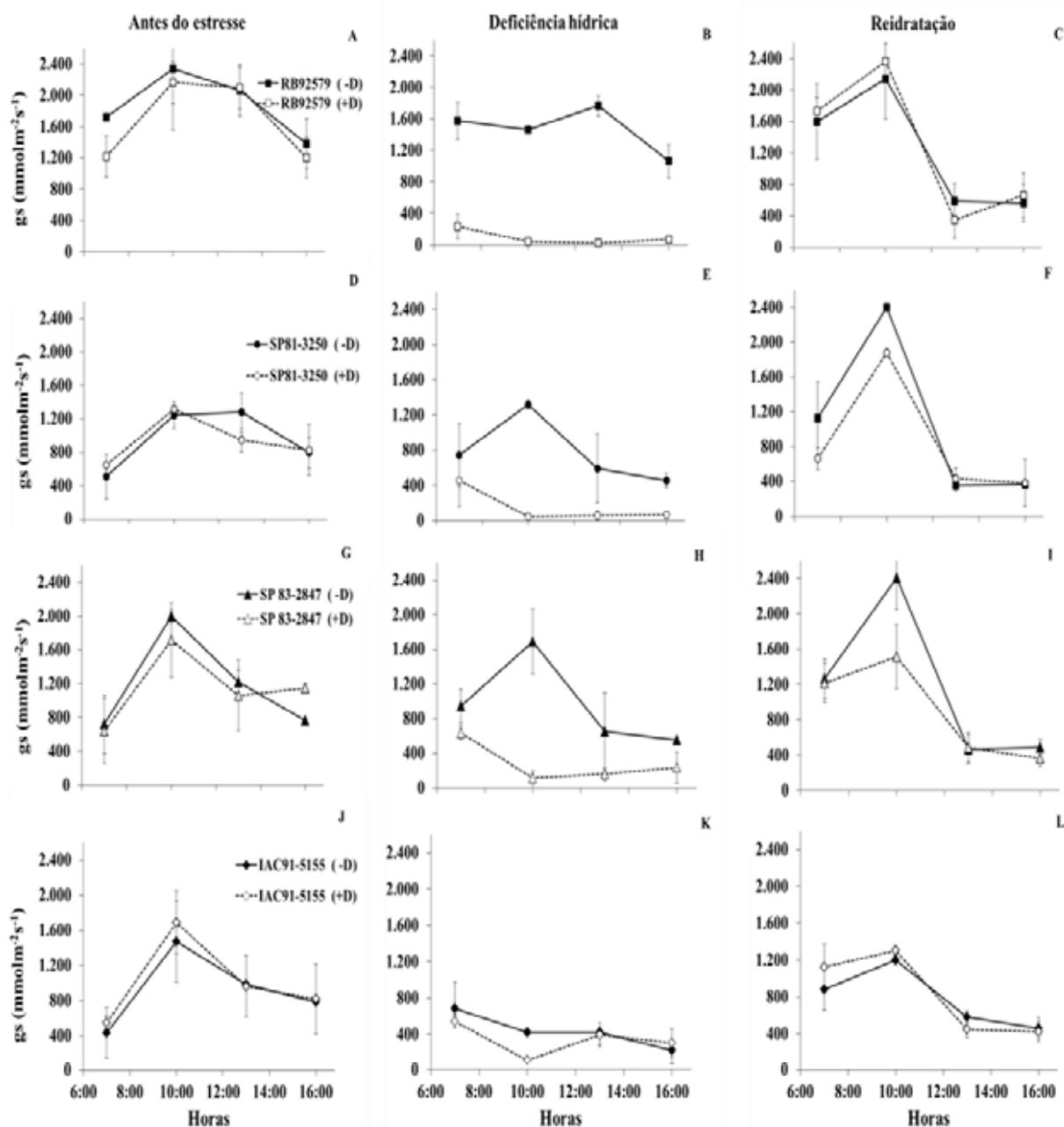


Figura 7. Condutância estomática (gs) ao longo do dia nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos adequado: (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse (A, D, G e J), deficiência hídrica (B, E, H e K) e reidratação (C, F, I e L). Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

Tabela 2. Análise de variância dos atributos fisiológicos condutância estomática (gs), temperatura foliar (TF), potencial hídrico foliar (Ψ_w), teor relativo de água na folha (TRA), eficiência fotoquímica máxima II (F_v/F_m) e teor estimado de clorofila (índice SPAD) em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias.

| Fonte de variação | GL | Atributos fisiológicos | | | | | |
|----------------------------|----|------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | gs (10-12h) | TF (10-12h) | F_v/F_m (10-12h) | Ψ_w | TRA | Índice SPAD |
| Antes do estresse | | | | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 40,0** | 86,0** | 2,8* | 35,7** | 3,0* | 6,8** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 6,6** | 0,0 ^{ns} | 0,6 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,3 ^{ns} |
| C x Rh | 3 | 2,1 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,6 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,1 ^{ns} |
| CV% | | 12,7 | 1,2 | 1,4 | 6,4 | 3,7 | 6,3 |
| Deficiência hídrica | | | | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 164,3** | 343,6** | 17,0** | 31,1** | 14,9** | 47,5** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 3271,9** | 583,8** | 114,6** | 1089,8** | 87,4** | 290,3** |
| C x Rh | 3 | 192,2** | 110,3** | 20,5** | 23,0** | 5,5** | 59,4** |
| CV% | | 8,6 | 0,7 | 3,0 | 8,8 | 4,3 | 5,3 |
| Reidratação | | | | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 33,6** | 24,4** | 5,8** | 90,0** | 2,6 ^{ns} | 26,6** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 0,06 ^{ns} | 0,33 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 48,7** | 3,4 ^{ns} | 5,7* |
| C x Rh | 3 | 5,0** | 30,7** | 1,8 ^{ns} | 3,5* | 0,9 ^{ns} | 12,4** |
| CV% | | 12,0 | 1,5 | 2,2 | 6,0 | 6,7 | 4,0 |

G.L.: graus de liberdade; ns: não significativo; *: significativo ($P>0,05$); **: significativo ($P<0,01$); C.V.: coeficiente de variação.

6.1.2.3 Temperatura foliar

Neste estudo, observou-se um padrão de resposta para a variável temperatura foliar semelhante ao $DPV_{(folha-ar)}$. Os valores de temperatura foliar na fase inicial apresentaram médias próximas de 30°C para as quatro cultivares ao longo do dia (Figura 8A, D, G e J) sendo essa temperatura indicativa de condições ideais de crescimento e hidratação.

De acordo com ALMEIDA et al. (2008), a faixa de 25°C a 33°C são as mais favorável ao desenvolvimento vegetativo em cana-de-açúcar.

Todas as cultivares consideradas sensíveis neste estudo apresentaram maiores aumento na temperatura foliar as 10 h da manhã no tratamento de deficiência hídrica, com valores para RB92579 de 38,6°C e SP81-3250 de 36°C, o que correspondeu a aumentos de 4,1°C e 2°C, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 8B e E), também foi verificado relação inversa entre TF e gs ($r = -0,67^*$) durante a deficiência hídrica (Tabela 3), o que sugere que o aumento da temperatura foliar teve influência negativa sobre a condutância estomática nessas cultivares. De acordo com TAIZ; ZEIGER (2009), em geral plantas C₄ podem rapidamente ter elevadas em 4 a 5°C a temperatura foliar em relação à temperatura do ambiente, sob luz solar plena e deficiência hídrica do solo. De acordo com os autores, as folhas transpiram ativamente e mantém a sua temperatura, em geral, mais baixa do que a temperatura do ar, mas a deficiência hídrica restringe a transpiração e causa o superaquecimento e estresse por calor.

As cultivares SP83-2847 e IAC91-5155 apresentaram menores aumento, com manutenção da temperatura ao redor de 35°C as 10 h (Figura 8H e K), ou seja, com médias próximas ao controle, fato que sugere que esses cultivares mantiveram-se protegidos de faixas térmicas muito elevadas e sua capacidade de resfriamento foliar. Durante a reidratação todas as cultivares apresentaram a manutenção da temperatura foliar semelhantes e igual ao controle com temperatura foliar média variando de 27°C 30°C (Figura 8C).

Estes efeitos também foram encontrados por SILVA et al. (2007a) que verificaram maior aumento da temperatura foliar em cultivares sensíveis de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica, com média de TF (~ 37°C) e nas tolerantes médias (~ 35°C). SILVA et al. (2013), estudando 78 cultivares de cana-de-açúcar em condições de sequeiro, constataram que o aumento da temperatura foliar foi associado à diminuição da produtividade. Os autores sugerem que o crescimento da cana-de-açúcar é afetado nas plantas que não possuem controle eficiente da temperatura na folha durante um período de seca, considerando assim a temperatura foliar como uma ferramenta confiável na seleção para tolerância à seca.

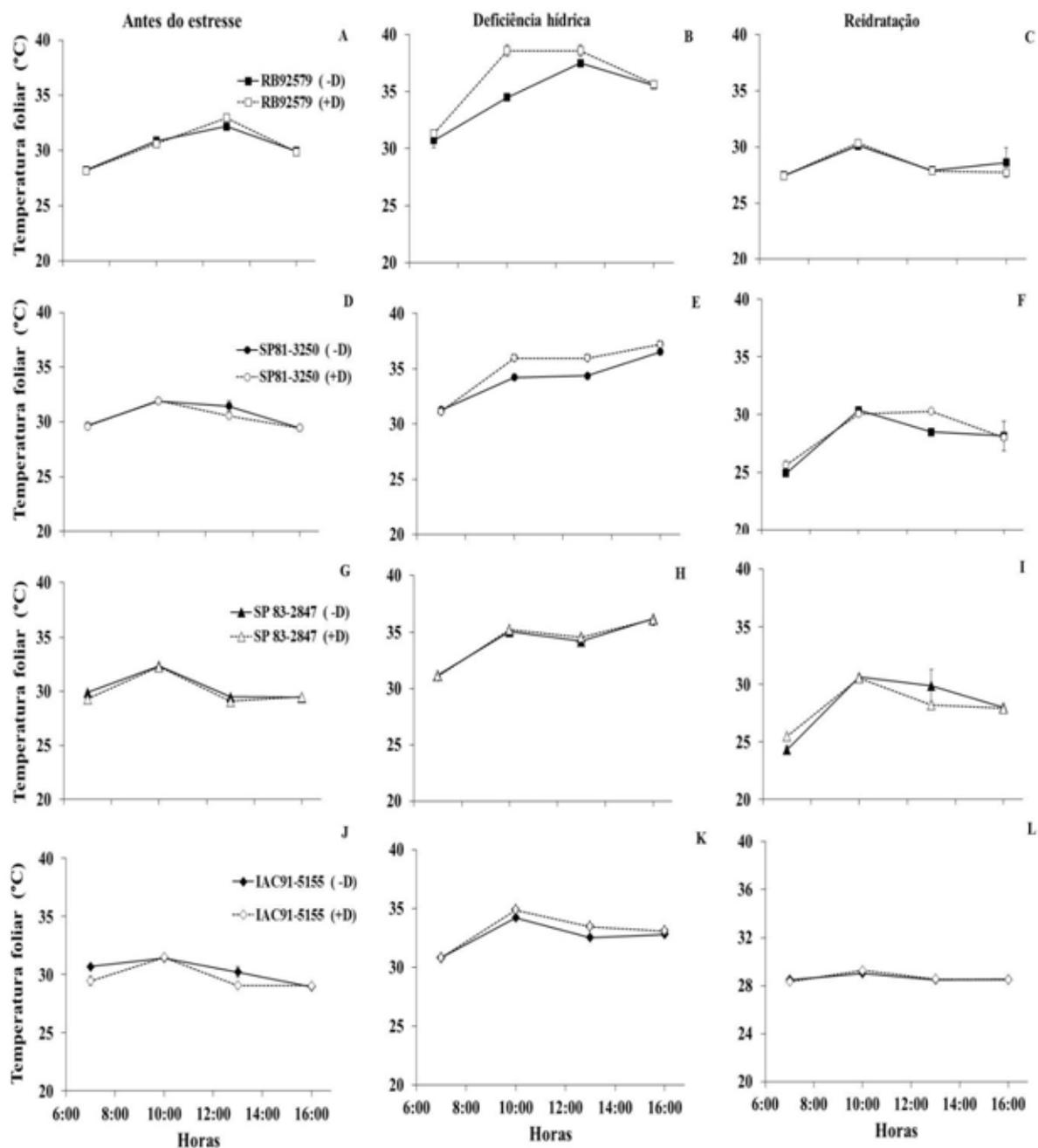


Figura 8. Temperatura foliar ao longo do dia nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D), em três períodos de avaliação, antes do estresse (A, D, G e J), deficiência hídrica (B, E, H e K) e reidratação (C, F, I e L). Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

6.1.2.4 Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II

eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II, representada pela razão F_v/F_m , foi verificada variação entre 0,8 a 0,76 antes do estresse e pouco reduziu ao longo do dia (Figura 9A, D, G e J), sendo um bom indicativo de alta eficiência fotossintética nesse período. Durante os 15 dias de deficiência hídrica, a cultivar IAC91-5155 teve variação da relação F_v/F_m de 0,8 a 0,75, apresentando médias próximas ao tratamento sem deficiência hídrica, o que sugere que essa cultivar manteve uma melhor captura de luz pelo sistema antena do fotossistema durante a deficiência hídrica. A habilidade da cana-de-açúcar em manter valores semelhantes de F_v/F_m sob estresse hídrico pode indicar alta eficiência no uso da radiação, possivelmente pelas reações de assimilação de carbono (SILVA et al., 2007a).

Na cultivar SP83-2847 foi verificada pouca redução de F_v/F_m , que variou de 0,76 a 0,72 (Figura 9 H e K). Nessa cultivar pode-se sugerir que essa redução de F_v/F_m representa uma pequena fotoinibição, sendo considerada um mecanismo de fotoproteção, devido à diminuição da pressão energética nos fotossistemas em condições de excesso de energia. Assim, nesse caso a fotoinibição não deverá ser vista como um dano, mas sim como um mecanismo de proteção que permite dissipar o excesso de energia termal (LONG et al., 1994).

Maiores reduções nos valores de F_v/F_m durante a deficiência hídrica foram constatadas nas cultivares RB92579, com valores ao longo do dia de 0,67 a 0,5, e SP81-3250, com valores de 0,66 a 0,59 aos 15 DAT (Figura 9 B e E). Os valores mínimos de F_v/F_m foram de 0,5 as 16 h para RB92579 e de 0,59 as 14 h para SP81-3250. Essas cultivares permaneceram com F_v/F_m reduzido no final da tarde, o que indica um marcante efeito fotoinibitório nas plantas.

A intensa redução de F_v/F_m nas cultivares RB92579 e SP81-3250 deve estar relacionada com severa restrição hídrica que conduziu à extrema redução de g_s , seguida da forte elevação da temperatura foliar tornando, assim, a planta sensível à fotoinibição, que implicou na redução atividade fotoquímica durante a deficiência hídrica. Essa sequência de eventos é evidenciada pela correlação positiva entre F_v/F_m e g_s (0,64*), clorofila total (0,64*), índice SPAD (0,64*), Ψ_w (0,77**), TRA (0,81**), e correlação inversa com temperatura foliar (-0,82**) durante o período de seca (Tabela 3).

Da mesma forma, os períodos longos de desidratação, seja suave ou severa, elevadas temperaturas e altas irradiâncias podem resultar na inibição regulatória ou dano do aparato fotossintético, uma vez que, quando a fotossíntese está limitada, seja por

limitação do suprimento de CO₂, seja por inibição direta do transporte de elétrons, o excesso de excitação poderá causar fotodanos ao PSII, além de gerar espécies reativas de O₂, o que causa grave estresse oxidativo com danos na célula vegetal (LONG et al., 1994; MAXWELL; JOHNSON, 2000, ARAÚJO; DEMINICIS, 2009).

Reduções mais severas de F_v/F_m , que levaram a valores abaixo de 0,75, foram evidenciados em cultivares de cana-de-açúcar suscetíveis à condição de seca em casa-de-vegetação (GRAÇA et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; PINCELLI, 2010, SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012). Redução de F_v/F_m também foi verificada em cana-de-açúcar quando exposta ao estresse salino (CHA-UM; KIRDMANEE, 2009; GOMATHI; RAKKIYAPAN, 2011). De acordo com MAXWEL; JOHNSON (2000), valores inferiores a 0,75 de F_v/F_m indicam situação da planta sob algum tipo de estresse e, portanto, redução do seu potencial fotossintético. O que está de acordo com SILVA et al. (2013), que encontraram razões de F_v/F_m inferiores a 0,75 em cultivares de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica no campo as quais correlacionaram com menores produtividades. Assim a razão F_v/F_m constitui em um parâmetro sensível e eficiente de triagem de cultivares de cana-de-açúcar quanto a tolerância à seca.

Na reidratação todas as cultivares apresentaram aumentos nos valores de F_v/F_m próximos de 0,8, o que evidencia boa recuperação do aparato fotoquímico, quando as plantas voltaram a condições hídricas ideais. Fato que é reforçado pela correlação positiva de F_v/F_m com a clorofila total (0,85**) e índice SPAD (0,57*) e inversa com temperatura foliar (0,84**) (Tabela 3), o que significa que com o retorno das temperaturas a condições favoráveis contribuiu para as plantas recuperarem da máxima eficiência fotoquímica do fotossistema II.

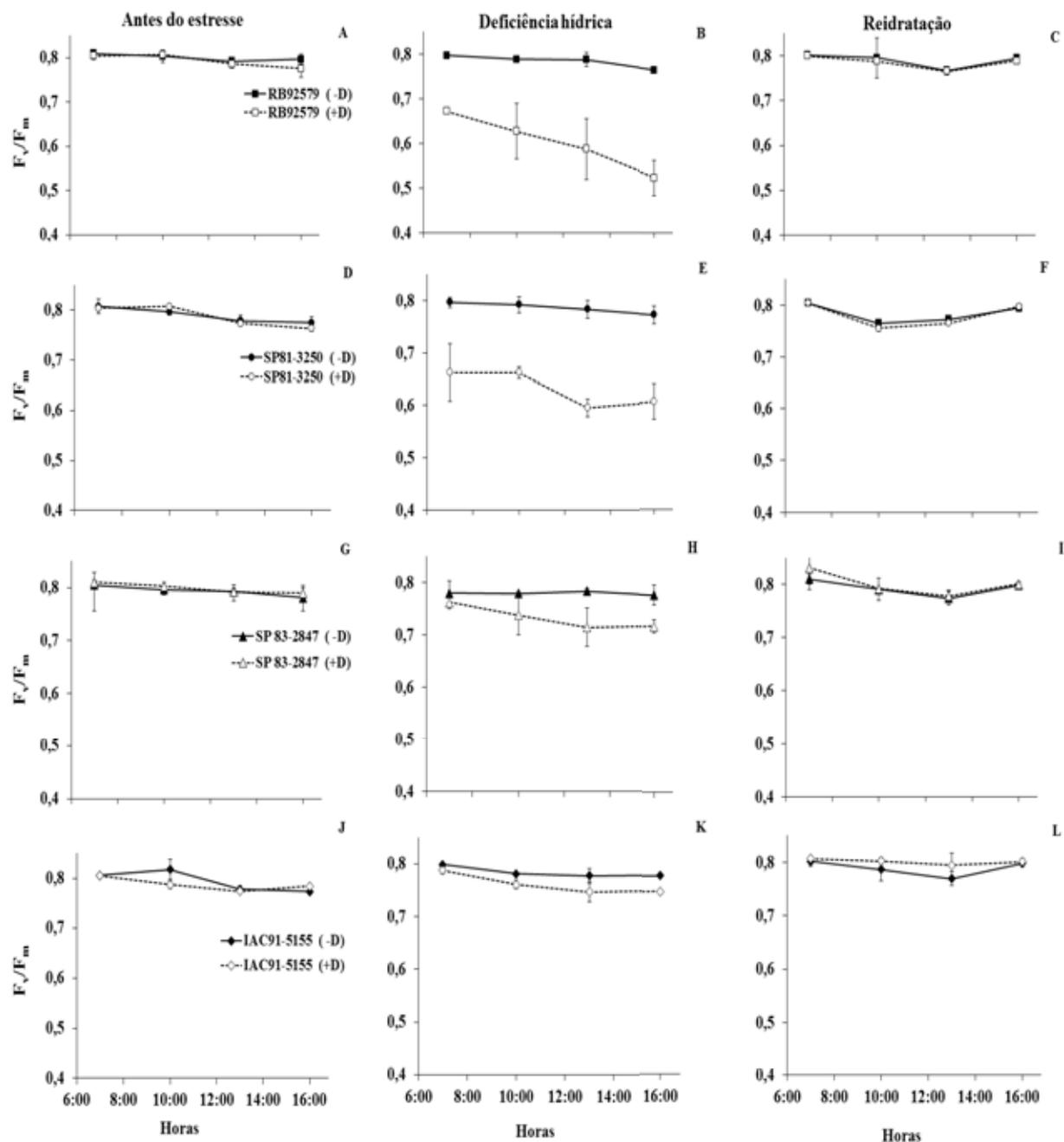


Figura 9. Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) ao longo do dia nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D), em três períodos de avaliação, antes do estresse (A, D, G e J), deficiência hídrica (B, E, H e K) e reidratação (C, F, I e L). Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

6.1.3 Teor relativo de água na folha (TRA) e Potencial hídrico foliar (Ψ_w)

Após 15 dias de supressão da água foram observadas reduções de TRA na maioria das cultivares com exceção da IAC91-5155 que não apresentou variação ao longo do experimento (Figura 10A), o que sugere que essa cultivar possui maior capacidade de economizar água durante o período de seca. A manutenção do TRA é um indicador do grau de hidratação das células e do tecido foliar, sendo um fator crucial para o ótimo funcionamento fisiológico da planta como o controle estomático (GORAI et al., 2010). O que pode ser explicado nesse estudo pela correlação positiva entre TRA com Ψ_w (0,70**) e g_s (0,57*) sob condições de seca (Tabela 3).

Entretanto, o maior efeito da deficiência hídrica foi verificado na RB92579 que apresentou a menor média de TRA, 74%, seguida da SP81-3250 com valor de TRA de 77,3%, enquanto na SP83-2847 apresentou menores reduções, resultando no valor de 84,5% (Figura 10A). GRAÇA et al. (2010), estudando a cultivar SP83-2847 sob condições de seca, também observaram pequena redução do TRA, sugerindo que o decréscimo do teor relativo de água estimulou o ajustamento da capacidade fotossintética da planta para tolerar as mudanças da disponibilidade hídrica. Após 12 dias de reidratação, as cultivares RB92579 e SP81-3250 atingiram valores de TRA próximos de 85% e 83,4% respectivamente, enquanto a cultivar SP83-2847 teve TRA ao redor de 90% (Figura 10A).

O declínio progressivo no TRA com variação entre 80 a 60% em cultivares sensíveis de cana-de-açúcar submetidos à deficiência hídrica também foi relatado por PATADE et al. (2011); SILVA et al. (2011); CIA et al. (2012); SILVA et al. (2013). RODRIGUES et al. (2009) verificaram que a diminuição do TRA foi mais pronunciada na variedade de cana-de-açúcar sensível, que teve valores médios de 60%, e, ainda, evidenciaram que no mesmo período de avaliação a maioria dos genes expressos nas cultivares tolerantes em resposta à seca tinha sido reprimida nas plantas sensíveis. Estes estudos têm mostrado que cultivares de cana-de-açúcar que mantêm valores de TRA relativamente altos durante a escassez de água possuem forte indicativo de tolerância.

Em relação ao potencial da água na folha (Ψ_w), as cultivares apresentaram variação de Ψ_w entre -0,4 a -0,8 MPa durante o período de hidratação (Figura 10B). Após 15 dias de suspensão da irrigação, o decréscimo no Ψ_w foi mais acentuado na cultivar SP81-3250, -2,3 MPa, portanto significativamente mais afetada pela deficiência hídrica, seguida da SP83-2847, -1,8 MPa, RB92579, -1,7 MPa e IAC91-5155, -1,7 MPa (Figura 10B). Após a reidratação todas as cultivares tiveram seu status hídrico restabelecidos,

apresentando valores próximos ao controle, isto é, entre -0,4 a -0,7 MPa. Diante disso pode-se verificar que a deficiência hídrica afetou o status hídrico de todas as cultivares, causando diminuição de Ψ_w , portanto, sugerindo uma sinalização hidráulica que levou ao fechamento estomático (Figura 7), o que é confirmado com a correlação positiva entre Ψ_w e g_s (0,70*, Tabela 3). SILVA et al. (2012) também encontraram em cana-de-açúcar correlação positiva entre Ψ_w e g_s sob condições de seca.

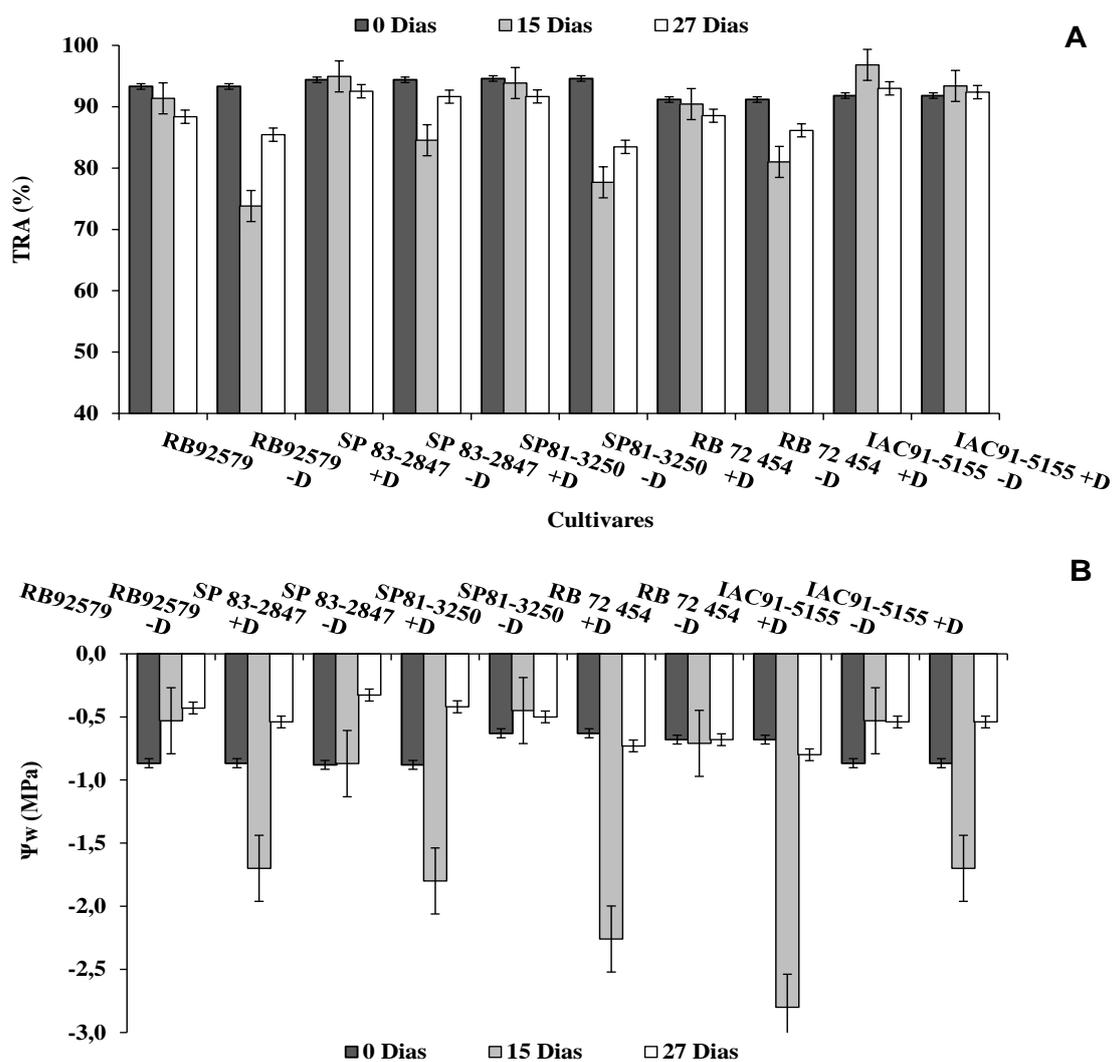


Figura 10. Teor relativo de água na folha, TRA (A), e potencial hídrico foliar, Ψ_w (B), nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse (zero dias), 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

Estudos mostraram que o potencial hídrico da cana-de-açúcar com boa disponibilidade hídrica pode atingir Ψ_w de -0,5 MPa ao meio-dia, enquanto sob deficiência hídrica apresentam valores menores entre -1,5 a -2 MPa (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005). PINCELLI (2010) encontrou valores mais negativos em cultivares sensíveis com Ψ_w próximos de -3,0 MPa com com 56 dias de deficiência hídrica em casa-de-vegetação. Maiores reduções do Ψ_w em cultivares sensíveis sob deficiência hídrica também foram verificadas por ENDRES et al. (2010) em condições de campo e SILVA et al. (2012) em casa de vegetação.

6.1.4. Estimativa do conteúdo de clorofia (índice SPAD)

No início do experimento todas as cultivares apresentaram valores médios próximos de 50 índice SPAD. Aos 15 dias sob deficiência hídrica foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos sem deficiência e com deficiência hídrica em todas as cultivares (Figura 11). Os menores valores de índice SPAD foram constatados para RB92579, com médias de 37 índice SPAD, e para SP81-3250, 21,2 índice SPAD, representando uma redução de 33% e 61%, respectivamente (Figura 11).

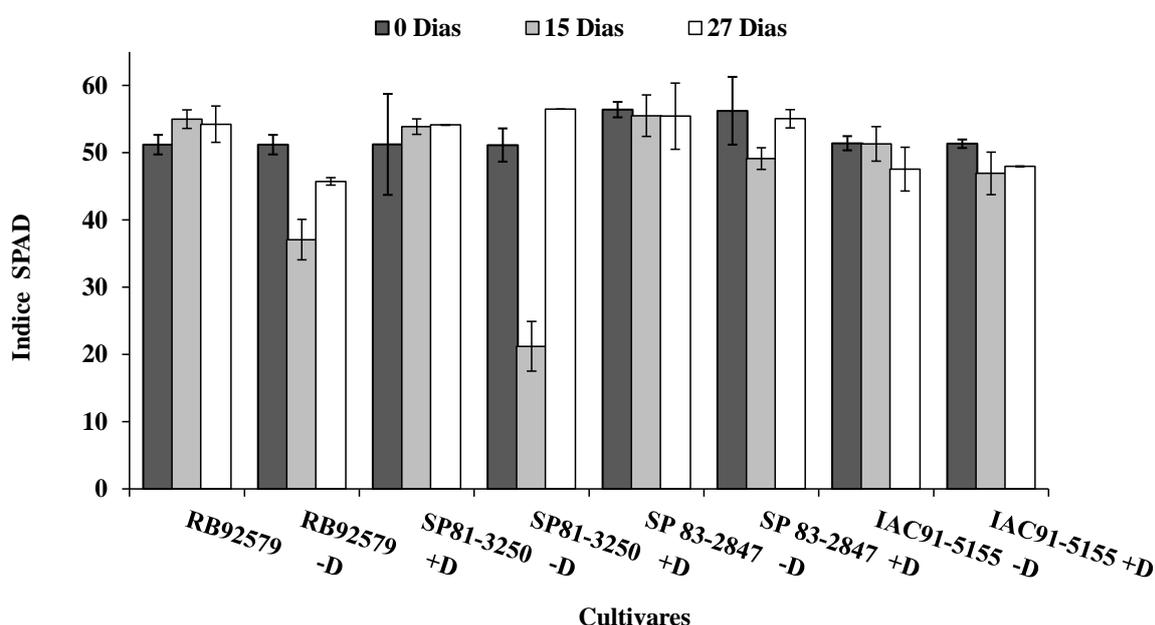


Figura 11. Estimativa do conteúdo de clorofia (índice SPAD) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D), em três períodos de avaliação, antes do estresse (zero dias), 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

Já as cultivares SP83-2847 e IAC91-5155 foi verificada pouca redução para índice SPAD, e permaneceram com médias superiores a 40 índice SPAD, o que sugere que essas cultivares apresentam maior capacidade de síntese de clorofila, portanto, maior intensidade de cor verde mesmo sob deficiência hídrica.

Esses resultados corroboram com os de PINCELLI et al. (2010), JANGPROMMA et al. (2010a), SILVA et al. (2012) e SILVA et al. (2013), que relataram valores de índice SPAD abaixo de 40 em cultivares sensíveis de cana-de-açúcar quando submetidas à condição de seca. De acordo com SILVA et al. (2011), leituras SPAD inferiores a 40 indicam o início da deficiência de clorofila, o que afeta o processo fotossintético, sendo esse parâmetro considerado um bom indicador de distúrbios causados pela deficiência hídrica em cana-de-açúcar. O índice SPAD apresentou forte correlação positiva com clorofila total (0,97**) sob deficiência hídrica, o que confirma a interação dessa variável com pigmentos fotossintéticos, estimando com ótima precisão os teores de clorofilas em cana-de-açúcar. O índice SPAD também apresentou correlação positiva com Ψ_w (0,56*) e g_s (0,57*) (Tabela 3).

Em outros estudos em cultivares de cana-de-açúcar na fase inicial de crescimento sob deficiência hídrica também foram verificadas correlações positivas entre índice SPAD e teor de clorofila (JANGPROMMA et al., 2010a) e correlação positiva entre índice SPAD com fotossíntese e potencial hídrico (SILVA et al., 2012). Em condições de campo, SILVA et al. (2013) constatam que cultivares de cana-de-açúcar com habilidade de manter maiores valores índice SPAD sob deficiência hídrica moderada durante o período de maior desenvolvimento foram mais produtivas. De acordo com os autores, o índice SPAD é um dos principais parâmetros fisiológicos que deve ser considerado como prioridade em programas de melhoramento de cana-de-açúcar com o objetivo de obter cultivares tolerantes à seca e mais produtivas.

Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson entre os atributos fisiológicos em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (Controle) e deficiência hídrica (Estresse) em 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias.

| Variáveis | Tratamentos | Ψ_w | gs | Índice SPAD | F_v/F_m | Chl <i>total</i> | C_{ar} | TF |
|----------------------------|-------------|----------|--------|-------------|-----------|------------------|----------|---------|
| Deficiência hídrica | | | | | | | | |
| TRA | Controle | 0,32 | -0,67* | -0,49 | -0,23 | -0,77** | -0,71** | -0,47- |
| | Estresse | 0,70** | 0,57* | 0,48 | 0,81** | 0,48 | 0,16 | 0,90** |
| Ψ_w | Controle | | -0,56* | -0,59* | 0,39 | 0,39 | -0,39 | -0,47 |
| | Estresse | | 0,70* | 0,56* | 0,77** | 0,56* | 0,60* | -0,89** |
| Gs | Controle | | | 0,62* | 0,14 | 0,67* | 0,85** | 0,67* |
| | Estresse | | | 0,57* | 0,64* | 0,67** | 0,85** | -0,67* |
| SPAD | Controle | | | | 0,08 | 0,69** | 0,65* | 0,42 |
| | Estresse | | | | 0,64* | 0,97** | 0,77** | -0,45 |
| F_v/F_M | Controle | | | | | 0,24 | 0,48 | 0,12 |
| | Estresse | | | | | 0,64* | 0,54* | -0,82** |
| Chl <i>total</i> | Controle | | | | | | 0,85** | 0,70* |
| | Estresse | | | | | | 0,74** | -0,46 |
| Reidratação | | | | | | | | |
| TRA | Controle | 0,57 | -0,41 | -0,11 | 0,01 | -0,40 | -0,19 | 0,30 |
| | Estresse | 0,16 | -0,03 | -0,02 | 0,41 | 0,35 | 0,29 | -0,27 |
| Ψ_w | Controle | | -0,20 | -0,12 | -0,28 | -0,13 | -0,36 | 0,67* |
| | Estresse | | -0,27 | 0,29 | 0,24 | 0,66* | 0,76** | -0,01 |
| GS | Controle | | | 0,31 | -0,2 | 0,72** | 0,73** | 0,21 |
| | Estresse | | | 0,11 | -0,07 | -0,04 | -0,29 | -0,33 |
| SPAD | Controle | | | | -0,01 | 0,67** | 0,60** | -0,08 |
| | Estresse | | | | -0,57* | -0,15 | 0,28 | 0,67* |
| F_v/F_M | Controle | | | | | 0,66* | 0,55 | -0,08 |
| | Estresse | | | | | 0,85** | 0,42 | -0,84** |
| Chl <i>total</i> | Controle | | | | | | 0,90** | 0,19 |
| | Estresse | | | | | | 0,72** | -0,71** |

* Significativo a $P < 0,05$ e ** Significativo a $P < 0,01$

Condutância estomática (gs), temperatura foliar (TF), potencial hídrico foliar (Ψ_w), teor relativo de água na folha (TRA), eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), teor estimado de clorofila (índice SPAD), clorofila total (Chl *total*) e carotenóides (C_{ar}).

6.1.5 Teor de pigmentos fotossintéticos

Tabela 4. Análise de variância do conteúdo de clorofilas *a* (Chl *a*), *b* (Chl *b*), Clorofila *total* (Chl *total*) e carotenóides em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias.

| Fonte de variação | GL | Pigmentos fotossintéticos | | | |
|----------------------------|----|---|---|---|---|
| | | Chl <i>a</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | Chl <i>b</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | Chl <i>total</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | Carotenóides ($\mu\text{g cm}^{-2}$) |
| Antes do estresse | | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 4,7** | 47,4** | 16,4** | 5,4** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 0,1 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,3 ^{ns} |
| C x Rh | 3 | 0,1 ^{ns} | 0,2 ^{ns} | 0,1 ^{ns} | 0,1 ^{ns} |
| CV% | | 7,3 | 8,0 | 6,0 | 6,7 |
| Deficiência hídrica | | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 14,3** | 4,6* | 13,3** | 9,2** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 121,0** | 18,4** | 94,0** | 40,1** |
| C x Rh | 3 | 29,2** | 8,5** | 26,3** | 17,4** |
| CV% | | 8,0 | 13,0 | 8,1 | 7,2 |
| Reidratação | | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 43,1** | 7,1** | 33,3** | 7,0** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 295,0** | 26,4** | 208,0** | 103,4** |
| C x Rh | 3 | 54,4** | 11,2** | 44,1** | 20,1** |
| CV% | | 5,0 | 8,7 | 5,1 | 7,4 |

G.L.: graus de liberdade; ns: não significativo; *: significativo ($P < 0,05$); **: significativo ($P < 0,01$); C.V.: coeficiente de variação.

Nos teores de pigmentos fotossintéticos, a cultivar IAC91-5155 e SP83-2847 não apresentam diferenças sob deficiência hídrica, com valores semelhantes ao controle (Tabela 5). Essas cultivares apresentaram maiores médias para teores de clorofila *a* e *b* e teor de clorofila *total* quando comparado as demais cultivares, e assim, melhor capacidade da manutenção dos teores de clorofila, o que sugere mecanismo mais eficiente na proteção da planta contra danos no aparato fotoquímico.

Já nas cultivares RB92579 e SP81-3250 foram verificadas diferenças significativas, em que se constatou maior redução para RB92579 nas concentrações de Chl *a*, Chl *b* e Chl *total* de 41,3%, 22%, 36,3% e para SP81-3250 de 53,5%, 46,8%, 51,6%, respectivamente (Tabela 5), o que evidencia alta degradação da clorofila sob deficiência hídrica nessas cultivares. A degradação da clorofila é uma das consequências ao estresse que pode ser o resultado da fotoinibição e diminuição da eficiência fotossintética entre outros

processos celulares, como a divisão e expansão celular (LONG et al., 1994; ARAÚJO; DEMINICIS, 2009).

Maiores reduções nos teores de clorofilas também foram encontrados em outras cultivares suscetíveis de cana-de-açúcar como consequência da deficiência hídrica (CHA-UM; KIRDMANEE, 2009; PINCELLI, 2010; JANGPROMMA et al., 2010b) e do estresse salino (GOMATHI; RAKKIYAPAN, 2011). Nestes estudos as cultivares mais tolerantes aos estresses apresentaram altos níveis de clorofilas em relação às suscetíveis. O que indica que os pigmentos fotossintéticos são bons indicadores fisiológicos na seleção de cultivares tolerantes.

A correlação positiva entre F_v/F_m e clorofila *total* (0,64*) e carotenóides (0,54*), e entre clorofila *total* e carotenóides (0,74**, Tabela 3) durante a deficiência hídrica neste estudo, implica dizer que deficiência hídrica contribuiu a alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos do FSII e possivelmente refletiu na desestabilização do centro de reação do FSII ou diminuição na capacidade fotossintética, principalmente nas cultivares de cana-de-açúcar sensíveis a seca.

No teor de carotenóide, os valores observados aos 15 dias de deficiência hídrica tiveram maior decréscimo nas cultivares RB92579, 27,4%, e SP81-3250, 29,6%, enquanto que as variedades IAC91-5155 e SP83-2847 não apresentaram redução para esse pigmento sob deficiência hídrica mantendo valores próximos ao controle (Tabela 5). O que sugere que a manutenção dos carotenóides nessas cultivares proporcionou maior proteção contra a fotooxidação durante a deficiência hídrica. Além de pigmento acessório que contribui para fotossíntese, os carotenóides têm outra função nas lamelas do tilacóides, que é a de fotoproteção, protegendo o aparelho fotossintético contra o oxigênio singlete ($^1O_2^*$) (TAIZ; ZEIGER 2009; GOMATHI; RAKKIYAPAN, 2011). Sendo, assim, importantes na prevenção da indução de danos oxidativos causados pelo estresse (WAHID, 2007).

Variações da perda de teor de carotenóides em cana-de-açúcar também foram registradas em outros estudos quando submetidas à condição de deficiência hídrica e salinização (CHA-UM; KIRDMANEE, 2009; PATADE et al., 2011), além de estresse térmico (WAHID, 2007). GOMATHI; RAKKIYAPAN (2011) observaram que o alto conteúdo de carotenóides nas cultivares tolerantes favoreceu a melhor adaptação das plantas de cana-de-açúcar sob estresse salino. Após doze dias de reidratação, não foi observada recuperação nos teores de clorofilas e carotenóides nas cultivares RB92579 e SP81-3250 (Tabela 5), o que evidencia maior sensibilidade à deficiência hídrica nessas cultivares.

Tabela 5. Teores de clorofilas *a* (Chl *a*), *b* (Chl *b*), clorofila total (Chl *total*) e carotenóides (Car) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias.

| Pigmentos fotossintéticos | | | | | | | | |
|---------------------------|---|--------|---|---------|---|---------|----------------------------------|---------|
| Tratamentos | Chl <i>a</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | | Chl <i>b</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | | Chl <i>total</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | | Car ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | |
| | -D | +D | -D | +D | -D | +D | -D | +D |
| RB92579 | | | | | | | | |
| 0 dias | 46,5aA | 46,5aA | 12,8aA | 12,8aA | 59,3aA | 59,3aA | 26,5aA | 26,5aA |
| 15 dias | 52,1aA | 30,6bB | 17,7aA | 13,8bA | 69,8aA | 44,5bB | 24,1aA | 17,5bB |
| 27 dias | 52,4aA | 32,0bB | 20,3aA | 15,2bBC | 72,7aA | 47,2bB | 22,8aA | 15,0bB |
| SP81-3250 | | | | | | | | |
| 0 dias | 40,3aA | 40,4aA | 12,5aA | 12,5aA | 52,7aBC | 52,7aBC | 23,5aA | 23,5aA |
| 15 dias | 46,3aA | 21,5bC | 17,3aA | 9,2bB | 63,7aA | 30,8bC | 23,3aA | 16,4bB |
| 27 dias | 46,2aB | 22,7bC | 20,2aA | 13,0bC | 66,4aA | 35,8bC | 22,8aA | 15,0bB |
| SP 83-2847 | | | | | | | | |
| 0 dias | 42,7aA | 42,7aA | 13,9aA | 13,9aA | 56,7aAB | 56,7aAB | 24,2aA | 24,2aA |
| 15 dias | 46,4aA | 41,3aA | 17,7aA | 16,4aA | 64,2aA | 57,8aA | 22,9aA | 20,2aA |
| 27 dias | 46,0aB | 48,0aA | 20,3aA | 20,8aA | 71,0aA | 61,8aA | 22,8aA | 18,4aA |
| IAC91-5155 | | | | | | | | |
| 0 dias | 37,3aA | 37,3aA | 8,3aB | 8,3aB | 45,7aC | 45,7aC | 22,8aB | 22,8aA |
| 15 dias | 39,4aB | 38,1aA | 15,4aA | 15,7aA | 54,9aB | 53,9aA | 16,8aB | 18,7aAB |
| 27 dias | 39,6aC | 41,4aA | 17,3aA | 17,2aAB | 56,9aB | 58,7aA | 17,3aB | 17,8aAB |

*Médias seguidas de letras iguais na mesma linha para tratamentos dentro de cultivares (letras minúsculas), e na mesma coluna entre cultivares dentro de cada tratamentos (letras maiúsculas), não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

6.1.6 Efeito da deficiência hídrica nas concentrações de solutos orgânicos em cana-de-açúcar

Tabela 6. Análise de variância de teores de proteína solúveis totais, carboidratos solúveis totais e prolina livre em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias.

| Fonte de variação | GL | Solutos orgânicos | | |
|----------------------------|----|---|--|---|
| | | Proteínas solúveis totais (mg g ⁻¹ MF) | Carboidratos solúveis totais (mg g ⁻¹ MS) | Prolina Livre (μmol g ⁻¹ MS) |
| Antes do estresse | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 261,7** | 166,0** | 136,6** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 0,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} |
| C x Rh | 3 | 0,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} |
| CV% | | 3,0 | 4,1 | 5,6 |
| Deficiência hídrica | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 15,2** | 7,6** | 19,6** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 85,5** | 61,4** | 106,4** |
| C x Rh | 3 | 9,7** | 34,4** | 30,7** |
| CV% | | 10,5 | 5,4 | 6,0 |
| Reidratação | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 7,5** | 94,3** | 30,7** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 20,0** | 1,7 ^{ns} | 47,7** |
| C x Rh | 3 | 16,2** | 14,6** | 54,1* |
| CV% | | 7,4 | 4,5 | 8,3 |

G.L.: graus de liberdade; ns: não significativo; *: significativo ($P < 0,05$); **: significativo ($P < 0,01$); C.V.: coeficiente de variação.

As concentrações de proteínas solúveis mantiveram valores próximos ao controle nas cultivares no início do estresse, ou seja, sem restrição hídrica (Figura 12A). Com 15 dias de deficiência hídrica a maioria das cultivares apresentou a redução nas concentrações de proteínas solúveis durante o período de estresse para RB92579 (33,7%), SP81-3250 (38,8%) e SP83-2847 (42%) quando comparado ao controle (Figura 12A). O que sugere que a deficiência hídrica levou a alterações do teor de proteínas, provavelmente devido à paralisação da síntese protéica. De acordo com BRITO et al. (2008), a deficiência hídrica afeta intensamente o metabolismo do nitrogênio nas plantas, o que acarreta diminuição na síntese de proteínas e acumulação

de aminoácidos, amônia e poliaminas livres. PATADE et al. (2011), estudando folhas de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica e estresse salino, também constataram reduções de proteínas solúveis. Reduções também foram verificadas por BRITO et al. (2008) em calos de cana-de-açúcar induzidos a deficiência hídrica.

Essa eventual perda de proteína durante a deficiência hídrica não foi observada pela cultivar IAC91-5155, a qual apresentou quantidade de proteínas próximas no tratamento de estresse e controle (Figura 12A). Durante a reidratação as cultivares RB92579 e SP83-2847 tiveram recuperação pronunciada com o aumento do teor de proteína a valores próximos aos tratamentos controle. Por outro lado, a cultivar SP81-3250 não apresentou recuperação do teor de proteínas solúveis mantendo reduções de 33,8% (Figura 12A).

Os carboidrato solúvel total tiveram maiores aumento na cultivar RB92579 (48,1%), menores acréscimos foram encontrados nas cultivares SP83-2847 (18%) e IAC91-5155 (25,3%) após 15 dias de suspensão da rega (Figura 12B). A cultivar SP81-3250 demonstrou que os níveis de açúcares solúveis diminuiram 14% em resposta ao tratamento de deficiência hídrica (Figura 12B). Com a reidratação, a recuperação de açúcares solúveis aos níveis do tratamento controle foram constatados para todas as cultivares (Figura 12B).

SALES et al. (2012), estudando cana-de-açúcar sob deficiência hídrica, constataram que os teores de carboidratos solúveis totais mantiveram-se constantes nas folhas e houve acréscimos na raiz. De acordo com os autores, embora as condições de estresse tenham reduzido a fotossíntese das plantas e o suprimento de carbono, a manutenção dos níveis de carboidratos solúveis nas folhas e raízes deve estar associada à degradação das reservas de amido. O aumento no teor de carboidratos solúveis totais foi também observado em cana-de-açúcar sob deficiência hídrica e estresse salino (PATADE et al., 2011). Esses estudos sugerem que o acúmulo de carboidratos solúveis participa do ajustamento osmótico.

Com 15 dias de deficiência hídrica a cultivar IAC91-5155 apresentou concentração de prolina praticamente semelhante ao controle (Figura 12C). Entretanto, as taxas de prolina aumentaram significativamente nas cultivares RB92579 (102%), SP81-3250 (20,1%) e SP83-2847 (26%) sob condições de seca (Figura 12C), ou seja, houve a necessidade de maior produção de prolina com a redução do potencial hídrico foliar. O que pode ser verificado também na correção negativa entre prolina e ΨW (-0,85**) e g_s (-0,61*) sob deficiência hídrica (Tabela 8). O que sugere que a

prolina teve uma participação na manutenção da turgescência, quando há diminuição do potencial hídrico da planta.

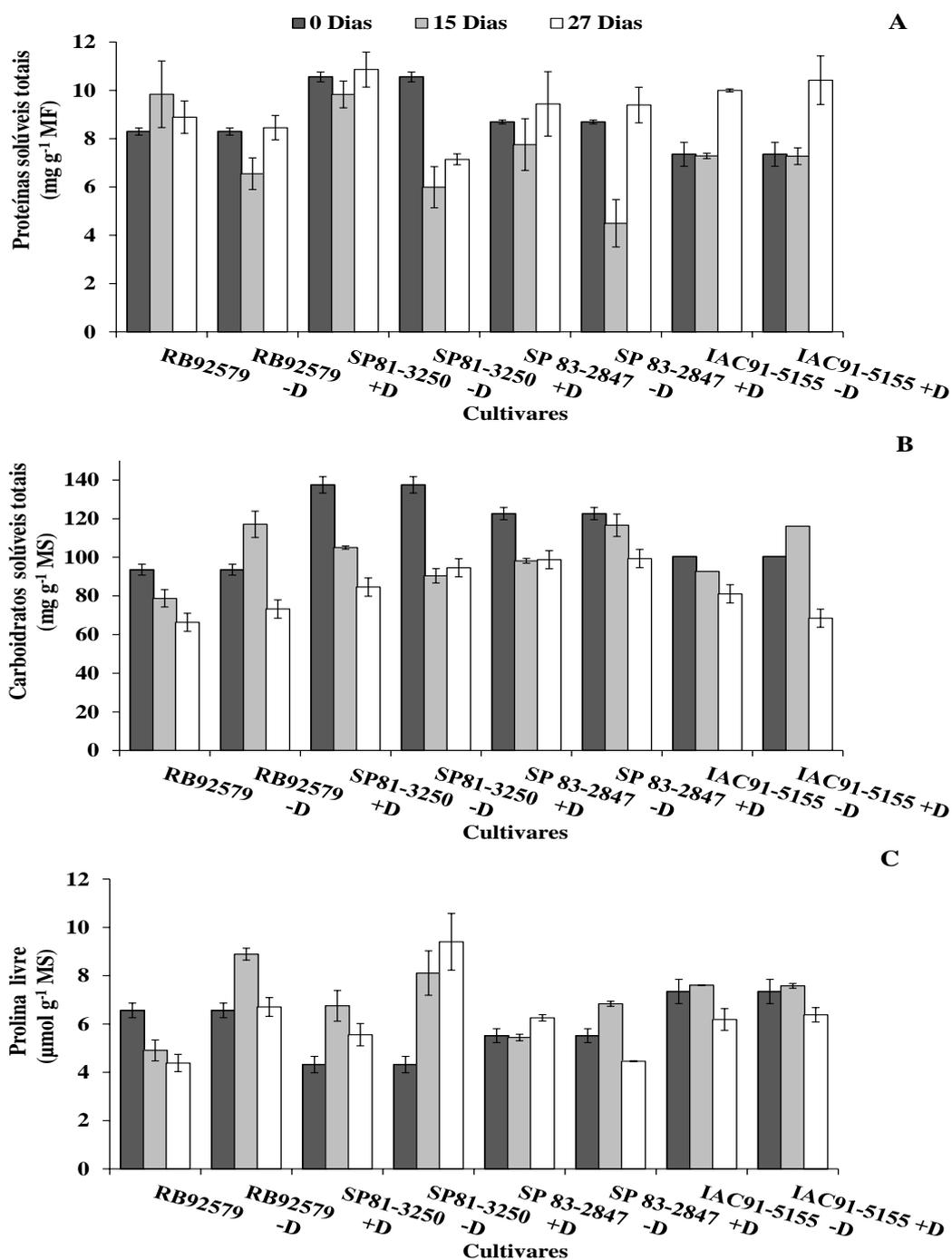


Figura 12. Teores de proteína solúveis totais (A), carboidrato solúvel totais (B) e prolina (C) em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse (zero dias), 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

O acúmulo de carboidrato e prolina durante a deficiência hídrica nas cultivares estudadas provavelmente está associado aos mecanismos para evitar perda de água na planta, através do ajuste osmótico. O ajustamento osmótico auxilia a manutenção da abertura estomática e o funcionamento do aparelho fotossintético, permitindo que este opere mesmo em condições de baixo potencial hídrico (HAYAT et al., 2012), fato evidenciado na cultivar IAC91-5155.

Em adição, pôde-se verificar correlação inversa entre prolina com F_v/F_m (-0,64*) e enzimas antioxidantes APX (-0,8**), SOD (-0,6**) (Tabela 8). Fato que pode sugerir que com decréscimo da F_v/F_m , o qual indica danos nos fotossistemas durante a deficiência hídrica, ocorre o aumento na produção de prolina, colaborando com a redução do estresse oxidativo, contribuindo com o equilíbrio fotoquímico nos cloroplastos, o que induz a redução das enzimas de defesa. O que indica, possivelmente, a prolina como agente antioxidante no período de seca. Outros estudos também sugerem que a prolina age como osmorregulador e antioxidante em cana-de-açúcar sob deficiência hídrica (MOLINARI et al., 2007; QUEIROZ et al., 2011; CIA et al., 2012; HEMAPRABHA et al., 2013). Segundo HEMAPRABHA et al. (2013), após o período de estresse, a prolina acumulada, pode ser usada como energia, com a redistribuição de nitrogênio e carbono, para a recuperação de atividades fisiológicas na planta.

No entanto, o aumento no conteúdo desse aminoácido durante a reidratação manteve-se elevado na SP81-3250 (70%) e na RB92579 (52,3%) em comparação ao controle (Figura 12C), essa continuidade no processo de acúmulo de prolina durante a reidratação sugere que as plantas permaneceram a nível celular desidratadas, mesmo com elevação do potencial hídrico nas plantas, não apresentando recuperação completa, o que reafirma a sensibilidade dessas cultivares a deficiência hídrica.

6.1.7 Resposta das enzimas antioxidante ao estresse oxidativo induzido por deficiência hídrica em cana-de-açúcar

Tabela 7. Análise de variância das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias.

| Fonte de variação | GL | Enzimas antioxidantes | | |
|----------------------------|----|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | | SOD (EC 1.15.1.1) | CAT (EC 1.11.1.6) | APX (EC 1.11.1.11) |
| Antes do estresse | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 67,7** | 52,4** | 98,0** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 0,0 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,01 ^{ns} |
| C x Rh | 3 | 0,1 ^{ns} | 0,0 ^{ns} | 0,07 ^{ns} |
| CV% | | 8,1 | 8,0 | 6,3 |
| Deficiência hídrica | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 23,4** | 25,0** | 12,4** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 66,7** | 2,2 ^{ns} | 514,4** |
| C x Rh | 3 | 0,9 ^{ns} | 10,1** | 11,2** |
| CV% | | 11,5 | 13,6 | 7,2 |
| Reidratação | | | | |
| Cultivar (C) | 3 | 60,5** | 9,7** | 43,7** |
| Regime hídrico (Rh) | 1 | 30,2** | 6,7* | 98,1** |
| C x Rh | 3 | 22,3** | 3,5* | 67,7** |
| CV% | | 7,0 | 8,0 | 5,5 |

G.L.: graus de liberdade; ns: não significativo; *: significativo ($P < 0,05$); **: significativo ($P < 0,01$); C.V.: coeficiente de variação.

As enzimas do sistema antioxidante superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) foram bastante sensíveis ao estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar neste estudo. Na fase inicial do estresse não ocorreu variação na atividade da enzima antioxidante SOD nas cultivares (Figura 13A, D, G e J), as quais apresentaram níveis baixos de atividade, o que demonstra ausência de estresse oxidativo nesse período. Entretanto, aos 15 dias de supressão da irrigação todas as cultivares apresentaram incremento na atividade da SOD, destacando-se a cultivar SP81-3250, com aumento de 40,3% (Figura 13 D). Notou-se pequeno incremento da atividade da SOD nas cultivares RB92579 (33,6%),

SP83-2847 (37,5%) e IAC91-5155 (36,6%) sob deficiência hídrica (Figura 13G, J e A), o que indica que o aumento da atividade SOD serviu como sinalizador do estresse nessas cultivares.

Com a reidratação, cultivares SP83-2847, RB92579 e IAC91-5155 apresentaram níveis baixos de atividade da SOD, com valores próximos ao controle, já a cultivar SP81-3250 ainda manteve elevado nível de atividade da enzima SOD nas plantas estressadas, com taxas de 37% (Figura 13D), fato que indica não recuperação por completo das plantas ao estresse oxidativo induzido pela deficiência hídrica.

A associação entre altos níveis de atividade da SOD e tolerância à seca em cana-de-açúcar tem sido previamente observado, por exemplo, JANGPROMMA et al. (2010b) constataram maior aumento da atividade SOD nas cultivares tolerantes sob deficiência hídrica. GOMATHI; RAKKIYAPAN (2011), estudando cana-de-açúcar sob estresse salino, constataram que a atividade da SOD teve tendência de aumento na cultivar tolerante. PATADE et al. (2011) também observaram aumento da atividade da SOD em cana-de-açúcar sob sob estresse hídrico e salino. CIA et al. (2012) verificaram que a atividade SOD permaneceu sem grandes alterações aparentes durante o período de deficiência hídrica, porém as cultivares tolerantes apresentaram perfis de isoenzimas SODs semelhantes, diferenciando da cultivar sensível.

Na atividade da enzima catalase (CAT), notou-se aumento no tratamento de restrição hídrica para SP83-2847 (43,6%), enquanto a cultivar IAC91-5155 não houve resposta (Figura 13H e K). Apesar da CAT apresentar uma taxa catalítica muito grande, possui baixa afinidade para o substrato, uma vez que a reação requer o acesso simultâneo de duas moléculas de H_2O_2 ao centro ativo da enzima (NOCTOR; FOYER, 1998). Assim, as elevadas concentrações de enzima são um pré-requisito necessário para as concentrações de H_2O_2 diminuírem (ASADA, 1999; CARVALHO et al., 2008; SHARMA et al., 2012).

A atividade da catalase foi reduzida nas cultivares RB92579 (40,3%) e SP81-3250 (25%) (Figura 13B e E) sob restrição hídrica quando comparadas ao controle. Neste caso, pode-se sugerir que a deficiência hídrica, junto com a elevada temperatura, pode ter inativado a atividade da CAT, por ser considerada uma enzima bastante sensível ao estresse. Fato que pode ser reforçado pela CAT apresentar correlação inversa com temperatura foliar (-0,76**, Tabela 8), ou seja, plantas sob

grandes elevações de temperatura foliar podem induzir a inativação da CAT em cana-de-açúcar (SRIVASTAVA et al., 2012).

Na reidratação, a atividade da CAT se manteve estável nas cultivares SP83-2847 e IAC91-5155, apresentando valores próximos do controle (Figura 13H e K), enquanto na cultivar RB92579, mesmo não diferindo do controle, pode-se verificar pequeno incremento de 13,6% de atividade CAT. Porém, a cultivar SP81-3250 apresentou maior atividade da CAT durante a recuperação com aumento de 17% (Figura 13E).

Outros estudos em diferentes cultivares em cana-de-açúcar também relatam alteração na concentração da enzima catalase sob condições de estresse. CIA et al. (2012) detectaram que a cultivar sensível exibiu ao longo da seca uma diminuição na atividade da CAT, com aumento da deficiência hídrica. SRIVASTAVA et al. (2012), em cana-de-açúcar sob estresse térmico, verificaram que elevadas temperaturas reduziram a atividade da CAT em cultivares tolerantes. Em folhas verdes de milho, BENESOVÁ et al. (2012) encontraram aumento de atividade SOD e CAT e APX na cultivar tolerante sob restrição hídrica, e aumento da SOD e redução da CAT e APX na sensível. GE et al. (2006), em folha e raiz de milho, também mostraram aumento da atividades da SOD e CAT.

A atividade da APX no início do experimento em todas as cultivares foi similar às das plantas controle (Figura 13C, F, I e L). Todas as cultivares apresentaram aumento significativo na atividade da APX quando as plantas foram submetidas a condições de seca (Figura 13 C, F, I e L). Os incrementos da atividade da APX durante a deficiência hídrica foram verificados na IAC91-5155 (58,6%), SP83-2847(86%), RB92579 (48,6%). Na reidratação, as mesmas cultivares apresentaram total recuperação com atividade de APX constantes em ambos os tratamentos, isto é, com e sem deficiência hídrica (Figura 13 L, I e C).

No caso da cultivar SP81-3250 pôde-se constatar aumento de 138% nos níveis de atividade da APX sob deficiência hídrica, e com a reidratação esse incremento permaneceu ainda elevado, com taxas de 80,7% (Figura 13F), diante disso, pode-se inferir que essa cultivar manteve elevada produção de EROs, o que induziu o aumento das atividades de SOD, CAT e APX no período de reidratação, isso baseado na não recuperação na produção de pigmentos fotossintéticos, e ainda manter reduzido o número de folhas verde, a altura de colmos e a área foliar nesse período, indicando um

desequilíbrio do sistema antioxidante da cultivar SP81-3250 no período de deficiência hídrica, assim não sendo capaz de se adaptar a nova condição ambiental imposta.

Todas as cultivares apresentaram aumento da atividade da APX quando as plantas foram submetidas a condições de seca, o que sugere que a APX desempenhou importante papel no controle de EROs induzidas durante a deficiência hídrica. Respostas semelhantes também foram encontradas em outros estudos em cana-de-açúcar quando submetida ao estresses por deficiência hídrica (PATADE et al., 2011; CIA et al., 2012), salinização (GOMATHI; RAKKIYAPAN, 2011), elevação da temperatura (SRIVASTAVA et al., 2012) e por inundações (GOMATHI et al., 2012). Pode-se constatar a importância da APX também na correlação positiva com as enzimas SOD e CAT (Tabela 3). A ação protetora da CAT é limitada devido à sua baixa afinidade por H_2O_2 , assim, para controlar níveis celulares de H_2O_2 , APX pode eliminar H_2O_2 , que é inacessível a CAT (NOCTOR; FOYER, 1998; SHARMA et al., 2012).

O aumento das enzimas SOD, CAT e APX, de modo geral, apresentou correlação positiva com F_v/F_m , gs, Ψ_w , TRA e inversa com TF sob deficiência hídrica (Tabela 8). O que sugere que as respostas dos atributos fisiológicos estão associados as enzimas antioxidantes e participam em conjunto na proteção contra o estresse causado pela seca em cana-de-açúcar.

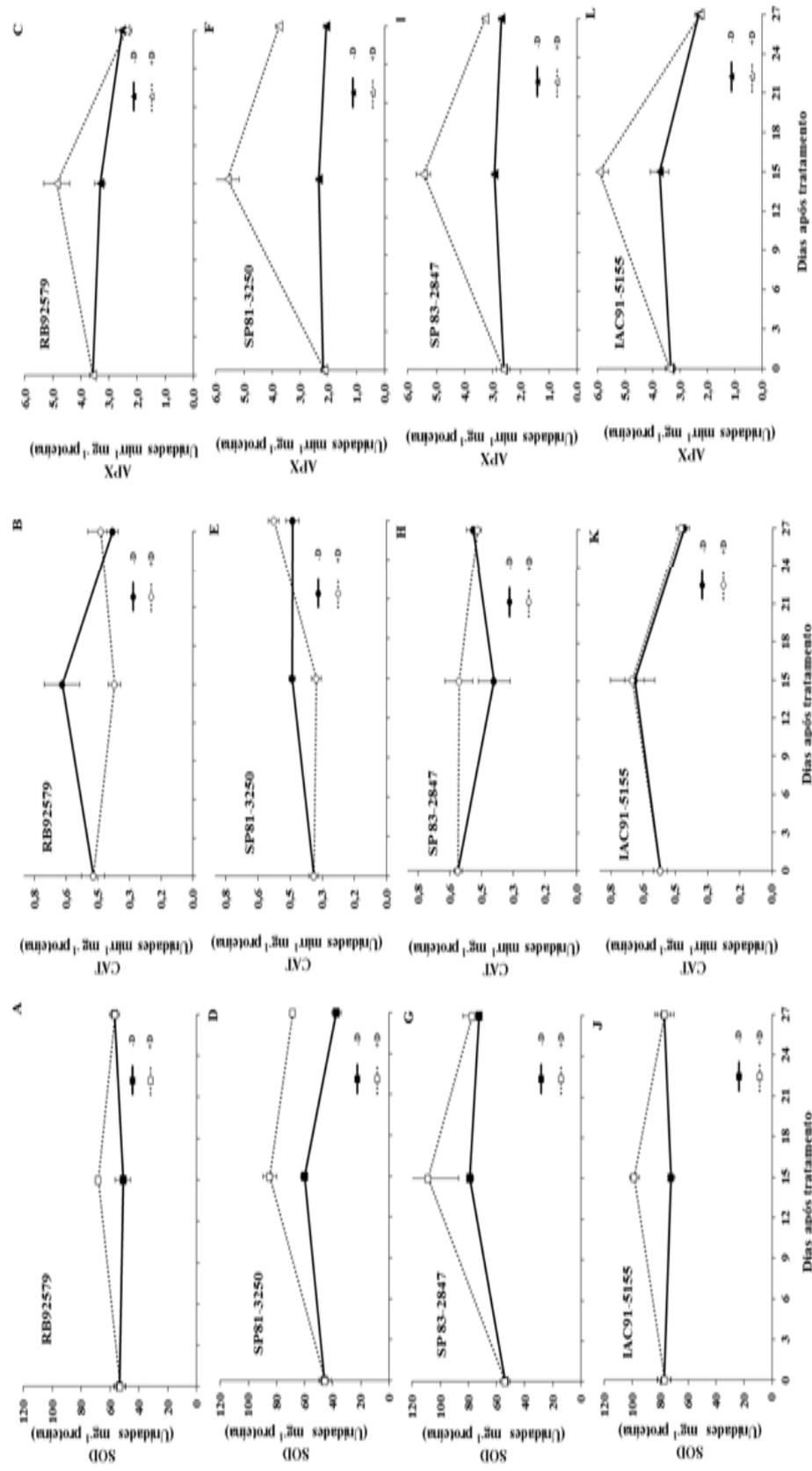


Figura 13. Enzimas antioxidantes, Superóxido dismutase, SOD, EC 1.15.1.1, (A, D, G e J), Catalase, CAT, EC 1.11.1.6, (B, E, H e K) e Ascorbato peroxidase, APX, EC 1.11.1.11, (C, F, I e L) em cana-de-açúcar submetida aos regimes hídricos: adequado (+D) e deficiência hídrica (-D) em três períodos de avaliação, antes do estresse, 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias (cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão).

Tabela 8. Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis enzimas antioxidantes e atributos fisiológicos em cana-de-açúcar submetidos aos regimes hídricos: adequado (Controle) e deficiência hídrica (Estresse) em 15 dias de deficiência hídrica e posterior reidratação por 12 dias.

| Variáveis | Tratamentos | SOD | CAT | APX | F _v /F _m | gs | TF | TRA | Ψ _w |
|----------------------------|-------------|--------|--------|--------|--------------------------------|---------|---------|--------|----------------|
| Deficiência hídrica | | | | | | | | | |
| Pro | Controle | 0,29 | 0,28 | -0,01 | 0,24 | -0,81** | -0,82** | 0,71** | 0,77** |
| | Estresse | -0,6** | -0,19 | -0,8** | -0,64* | -0,61* | 0,73** | -0,25 | -0,85** |
| SOD | Controle | | -0,42 | 0,14 | -0,63* | -0,19 | -0,67* | 0,65** | -0,21 |
| | Estresse | | 0,68** | 0,79** | 0,80** | 0,70* | -0,92** | 0,75** | 0,79** |
| CAT | Controle | | | 0,66* | -0,08 | -0,60 | 0,12 | -0,04 | 0,30 |
| | Estresse | | | 0,62* | 0,77** | 0,56* | -0,76** | 0,68** | 0,88** |
| APX | Controle | | | | -0,39 | -0,67* | -0,17 | -0,16 | -0,09 |
| | Estresse | | | | 0,77** | 0,53* | -0,68** | 0,40 | 0,63* |
| Reidratação | | | | | | | | | |
| Pro | Controle | 0,44 | 0,75* | 0,09 | -0,27 | -0,29 | 0,50 | 0,41 | 0,88** |
| | Estresse | -0,27 | -0,28 | 0,24 | -0,75** | -0,34 | 0,78** | -0,24 | -0,48 |
| SOD | Controle | | 0,70* | 0,60* | 0,29 | -0,70* | 0,31 | 0,28 | 0,36 |
| | Estresse | | 0,64* | 0,09 | 0,35 | -0,23 | -0,03 | 0,41 | 0,73* |
| CAT | Controle | | | 0,19 | 0,21 | -0,50 | 0,58* | 0,07 | 0,75** |
| | Estresse | | | -0,33 | 0,44 | -0,14 | -0,35 | 0,30 | 0,24 |
| APX | Controle | | | | 0,32 | -0,25 | 0,19 | 0,36 | -0,03 |
| | Estresse | | | | -0,72** | 0,22 | 0,65* | -0,19 | 0,22 |

* Significativo a $P < 0,05$ e ** Significativo a $P < 0,01$

Superoxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), prolina (Pro), condutância estomática (gs), temperatura foliar (TF), potencial hídrico foliar (Ψ_w), teor relativo de água na folha (TRA) e eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m).

6.2 Experimento II: atributos fisiológicos e bioquímicos de tolerância a deficiência hídrica associada a tolerância ao paraquat em cana-de-açúcar

Os resultados aqui foram discutidos em relação ao estresse oxidativo induzidos pela deficiência hídrica e paraquat, mediados pelos atributos fisiológicos, danos metabólitos e enzimas antioxidantes, aspectos de que pouca ou nenhuma informação está disponível no momento na literatura. Dessa forma deixou-se expostos a dois tipos de estresse de interesse econômico para agronomia sustentável.

6.2.1 Respostas dos atributos fisiológicos ao estresse oxidativo induzidos pela deficiência hídrica e paraquat

Na variação diurna, foram observados valores médios entre 0,80 a 0,77 para F_v/F_m no tratamento controle em todas as cultivares (Figura 14), o que indica que plantas estavam com seu aparelho fotossintético intacto nesse período. Quando as cultivares foram submetidas ao tratamento com paraquat (+PQ) foi observado declínio da razão F_v/F_m em todas as plantas ao longo do dia.

Maiores reduções de F_v/F_m foram constatadas nas cultivares RB92579 (0,63) as 16h e SP81-3250 (0,58) as 13h (Figura 14 A e B), o que sugere que essas plantas tiveram severos danos fotooxidativos após 24h de pulverização de paraquat. Sob deficiência hídrica foram constatados valores médios semelhantes de F_v/F_m para SP81-3250 (0,59) e para RB92579 (0,52), o que indica maior sensibilidade desses cultivares para ambos os estresses. As cultivares IAC91-5155 e SP83-2847 apresentaram menores reduções de F_v/F_m em ambos os estresse, mantendo valores médios próximos ao tratamento controle. No estresse induzido por +PQ, a cultivar SP83-2847 apresentou maiores decréscimo na razão F_v/F_m as 10 e as 16h alcançando valores de 0,67 e de 0,77, respectivamente, (Figura 14C), e a IAC91-5155 com valores de 0,71 as 16h (Figura 14D).

Portanto, em uma análise comparativa, as duas condições de estresse +D e +PQ após 24h propostas neste estudo promoveram maiores reduções de F_v/F_m nas cultivares RB92579, 20,2% sob +D e 19% sob +PQ, e SP81-3250, 16,4% em +D e 20,2% em +PQ (Figura 14). A SP83-2847 teve redução de apenas 5% sob +D e de 1,3% sob +PQ, e a IAC91-5155+D teve redução de 2,5% sob +D e de 9% sob +PQ (Figura 14 e 15A). Assim, essas cultivares estão propensas a ter pequenos danos fotoinibitórios provocados pelo paraquat, podendo indicar adequação ou adaptação a situação de estresse.

Essas condições de estresse podem ter sido altamente danosas à integridade funcional no cloroplasto, portanto, causando fotoinibição ou fotooxidação, com a desestabilização do centro de reação dos fotossistemas (FS) II e I (MAXWELL; JOHNSON, 2000; ARAÚJO; DEMINICIS, 2009; OLIVEIRA JUNIOR. et al., 2011).

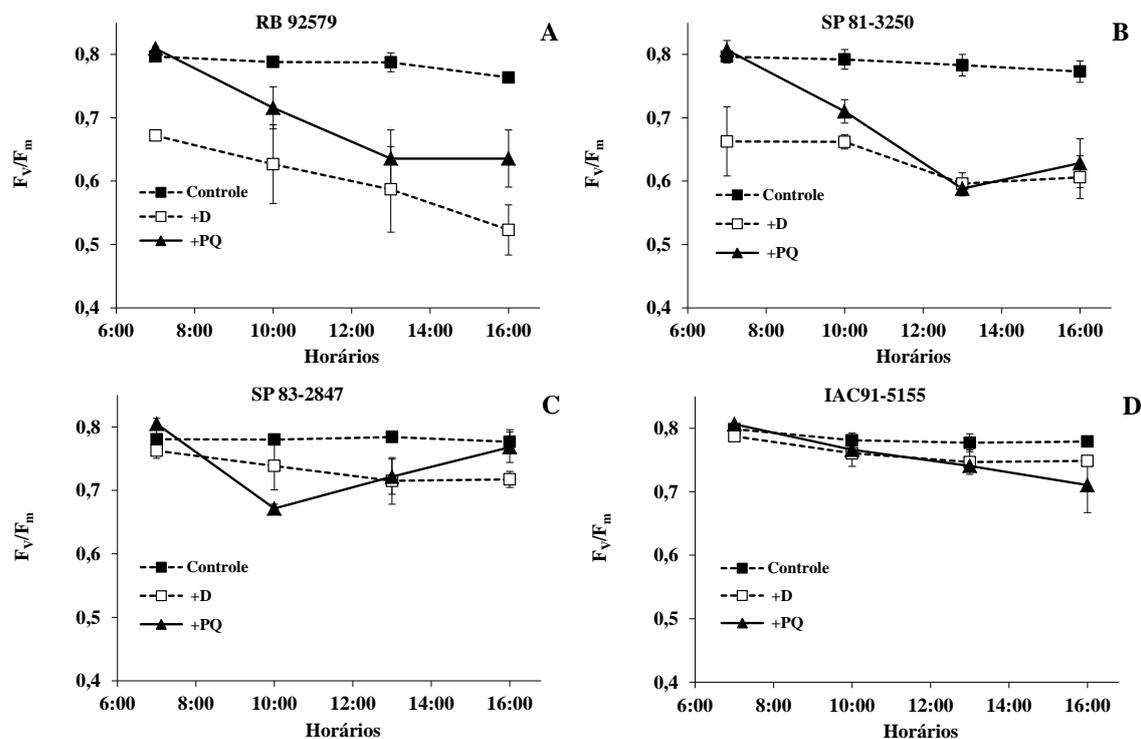


Figura 14. Variação diurna da eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D), deficiência hídrica (+D) e exposta a concentração de 150 μ M de Paraquat (+PQ) mensuradas no dia seguinte da aplicação, no intervalo de tempo de 13h a 24h após +PQ. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

CHAGAS et al. (2008) estudaram a fototoxicidade do paraquat na cultivar SP80-3280 e encontraram que concentrações de PQ acima de 2 mM após 18 h pulverização causaram danos significativos para os fotossistemas, com alta fotoinibição, F_v/F_m próximos a 0,3. Reduções de F_v/F_m , abaixo de 0,7, também foram encontradas em folhas de trigo quando submetidas ao estresse induzido por paraquat (EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005; SEDIGHEH et al., 2011) e milho (DARKÓ et al., 2009). Maiores

reduções de F_v/F_m também foram encontradas em cultivar sensível de arroz quando tratada com paraquat (ZHENFEI et al., 2007).

Em outras pesquisas de deficiência hídrica em cana-de-açúcar, cultivares com valores médios de F_v/F_m abaixo de 0,7 foram consideradas sensíveis a seca (GRAÇA et al., 2010; SILVA et al., 2007a; SILVA et al., 2013). Fato também evidenciado neste trabalho tanto sob deficiência hídrica quanto ao estresse induzido por paraquat. O que indica que o declínio da relação F_v/F_m é um bom indicador do dano fotoinibitório quando as plantas estão sujeitas ambos os estresses.

Tabela 9. Análise de variância dos atributos fisiológicos eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), condutância estomática (gs) e teor estimado de clorofila (índice SPAD) em cana-de-açúcar submetida aos regimes de estresse controle (-D), deficiência hídrica (+D) e Paraquat (+PQ) após 24h de aplicação.

| Fonte de variação | GL | Atributos fisiológicos | | |
|--------------------|----|------------------------|---------|-------------|
| | | F_v/F_m | gs | Índice SPAD |
| Cultivar (C) | 3 | 14,8** | 72,3** | 41.2** |
| Tratamentos (Trat) | 2 | 134,4** | 447,9** | 118.1** |
| C X Trat | 6 | 5,4** | 34,01** | 25.0** |
| CV% | | 15,8 | 4,4 | 5.3 |

G.L.: graus de liberdade; ns: não significativo; *: significativo ($P < 0,05$); **: significativo ($P < 0,01$);

C.V.: coeficiente de variação.

A condutância estomática (gs), reduziu em todas as cultivares submetidas à deficiência hídrica (+D) e ao +PQ (Figura 15A). Os resultados indicam maiores decréscimos de gs nas cultivares SP81-3250, com reduções de 96% sob +D e de 84,6% sob +PQ, e RB92579, 97% sob +D e 68,6% sob +PQ. No entanto, também foram observados reduções na SP83-2847, 92,6% sob +D e 36,8% sob +PQ, e na IAC91-5155, 73,8% sob +D e 47,8% sob +PQ (Figura 15A). As menores reduções de gs verificadas na SP83-2847 e na IAC91-5155

O fechamento estomático, de fato, representou a causa primária da resposta à deficiência hídrica nas cultivares. Evidência dessa natureza, para cana-de-

açúcar, também foi encontrada em outros estudos (MACHADO et al., 2009; PINCELLI, 2010; SILVA et al., 2012).

As maiores reduções da gs nas cultivares SP81-3250 e RB92579 quando tratadas com +PQ o que indica que o efeito tóxico do herbicida induziu ao estresse oxidativo causando danos nas células subestomáticas, podem ter contribuído para o fechamento ou rupturas de estômatos nessas cultivares. Comportamentos dessa natureza também foram encontrados em outras espécies vegetais, com relatos de grande redução de gs em plantas tratadas com paraquat, como em trigo (SEDIGHEH et al., 2011) e *Conyza bonariensis* (SHAALTIEL; GRESSEL, 1987). Os autores sugerem que o paraquat provocou o fechamento estomático causado por dano da membrana e perda de água a partir das células-guarda limitando a fixação de CO₂.

No conteúdo estimado de clorofila não foi verificada diferença entre os tratamentos +D e +PQ na cultivar IAC91-5155, e a cultivar SP83-2847, apesar de apresentar diferença, manteve valores médios de ~50 índice SPAD (Figura 15B), afirmando a resistência dessas plantas a ambos os estresses. Mas para as cultivares RB92579 e SP81-3250 pôde-se observar reduções de 24% e 18,5%, respectivamente, do índice SPAD sob o tratamento com Paraquat, e de 33% e 60,6%, respectivamente, sob deficiência hídrica (Figura 15C), o que indica que a deficiência hídrica evidencia de forma mais expressiva a sensibilidade dessas cultivares ao estresse nesse atributo fisiológico.

Quando as cultivares de cana-de-açúcar apresentam médias inferiores a 40 índice SPAD são consideradas sensíveis à deficiência hídrica (SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012), como também foi observado em nosso estudo, porém essa forte redução não foi verificada quando as cultivares foram tratadas com paraquat, o que sugere que plantas tratadas por paraquat por 24h pode ter sido um tempo curto, precisando de um período mais prolongado para verificar ocorrência de danos na clorofila em folha de cana-de-açúcar. Comportamento semelhante foi encontrado por SILVA et al. (2007b) que constataram em diferentes cultivares de cana-de-açúcar tratadas com 150 µM PQ que o medidor SPAD não foi sensível às alterações que ocorreram na clorofila após 24 h, conseguindo detectar mudanças apenas 72 h após a aplicação.

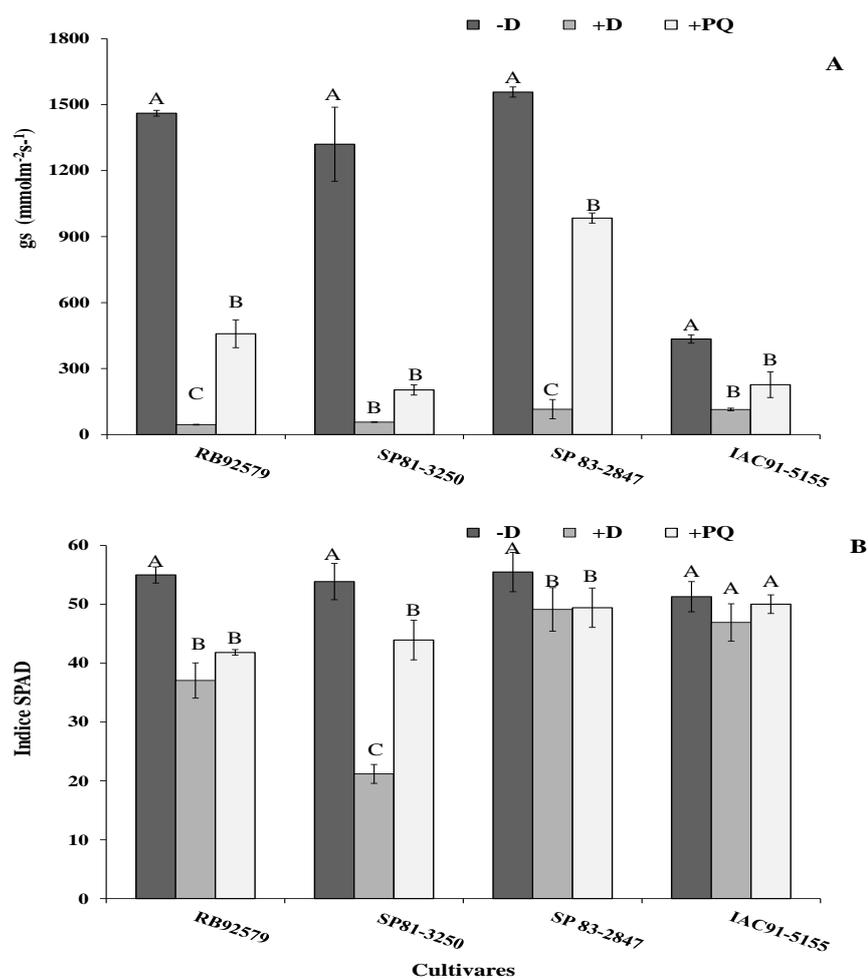


Figura 15. Condutância estomática, gs (A) e estimativa do conteúdo de clorofila, índice SPAD (B) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D), deficiência hídrica (+D) e a concentração de 150 μM de Paraquat (+PQ) por 24h. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

6.2.2 Teores de pigmentos fotossintéticos em discos foliares em cana-de-açúcar sob estresse oxidativo induzidos pela deficiência hídrica e paraquat

O decréscimo de clorofilas foram mais pronunciado sob estresse induzido por paraquat nas cultivares SP81-3250, com redução de *Chla* 65%, *Chlb* 55,4% e *Chltotal* 62,4% e RB92579 *Chla* 55,4%, *Chlb* 50% e *Chltotal* 60% (Figura 16A, B e C). Pode-se também verificar reduções desses pigmentos na cultivar IAC91-5155 com

decréimos nas concentrações de *Chl a*, *Chl b* e *Chl total* de 54%, 7%, 47,7%, respectivamente, e em SP83-2847 de 51,7%, 37,3%, 42,1%, respectivamente (Figura 16), porém as cultivares IAC91-5155 e SP83-2847 apresentaram menores reduções quando comparadas com as demais.

Tabela 10. Análise de teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila *total* e carotenóides em cana-de-açúcar submetida aos regimes de estresse controle (-D), deficiência hídrica (+D) e Paraquat (+PQ).

| Fonte de variação | GL | Pigmentos fotossintéticos | | | |
|--------------------|----|---|---|---|---|
| | | Chl <i>a</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | Chl <i>b</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | Chl <i>total</i> ($\mu\text{g cm}^{-2}$) | Carotenóides ($\mu\text{g cm}^{-2}$) |
| Cultivar (C) | 3 | 3.62* | 4.85** | 5.97** | 4.36** |
| Tratamentos (Trat) | 2 | 66.33** | 25.35** | 91.31** | 582.83** |
| C X Trat | 6 | 3.07* | 2.71* | 4.46** | 7.81** |
| CV% | | 18.51 | 16.62 | 13.68 | 10.20 |

G.L.: graus de liberdade; ns: não significativo; *: significativo ($P < 0,05$); **: significativo ($P < 0,01$); C.V.: coeficiente de variação.

As cultivares IAC91-5155 e SP83-2847 não tiveram diferenças nas variáveis clorofilas entre os tratamento sem e com deficiência hídrica, o que sugere melhor capacidade da manutenção dos teores de clorofila durante o estresse. Já nas cultivares RB92579 e SP81-3250 foram verificadas redução para RB92579 nas concentrações de *Chl a*, *Chl b* e *Chl total* de 41,3%, 22%, 36,3% e para SP81-3250 de 53,5%, 46,8%, 51,6%, respectivamente (Figura 16), o que evidencia alta degradação da clorofila sob deficiência hídrica nessas cultivares. As reduções na concentração de clorofilas podem estar associadas a processos fotooxidativos ou com alteração na organização dos fotossistemas, de modo a servir como um mecanismo fotoprotetor prevenindo uma fotodestruição severa do cloroplasto (ALTINKUT et al., 2001).

Sintomas visuais como a clorose e secagem dos discos foliares foram verificados neste estudo nas cultivares SP81-3250 e RB92579 (Figura 17), considerados como danos causados pelo tratamento com PQ, fato que sugere que houve a

degradação da clorofila no cloroplasto em ambos os estresses, o que pode ter contribuído para o aumento na produção de EROs, que por sua vez resulta em danos para aparato fotossintético como a degradação de pigmentos fotossintéticos (SOOD et al., 2011).

CHAGAS et al. (2008) também encontraram redução no teor de clorofila total na cultivar SP80-3280, com concentrações acima de 2 mM de PQ após 24 h de exposição, o que tornou-se mais pronunciado após 48 h. MOLINARI et al. (2007), em doses 5 μ M de paraquat, usando discos foliares de cana-de-açúcar, verificaram menores reduções do conteúdo de clorofila nas plantas transgênicas consideradas tolerantes a seca. SILVA; CAPUTO (2009) verificaram em cultivares tolerantes à seca menores porcentagem de redução das clorofilas em discos foliares tanto por deficiência hídrica quanto por paraquat a 150 μ M por 24h, e os autores sugeriram que o paraquat mostrou-se eficiente em classificar genótipos tolerantes e susceptíveis por meio da degradação de clorofila.

Em outros estudos comparativos entre os estresses induzidos por deficiência hídrica e paraquat em folha de ervilha (ITURBE-ORMAETXE et al., 1998) e em folhas de cevada e trigo (ALTINKUT et al., 2001), os autores verificaram menores reduções do teor de clorofila total nas cultivares tolerantes em ambos o estresse, e concluíram que a tolerância ao paraquat pode ser associada com tolerância à seca. Diante disso, supõe-se que sensibilidade dos teores de clorofilas nas cultivares estudadas ao estresse oxidativo induzido pela deficiência hídrica e pelo paraquat, indica que os mecanismos de adaptação são semelhantes. O que sugere que esse parâmetro é considerado um bom indicador de distúrbios causados nas plantas em ambos os estresses.

O carotenóide apresentou comportamento diferenciado sob estresse induzido por paraquat e deficiência hídrica, os valores de carotenóide encontrados aos 15 dias de deficiência hídrica foram reduzidos em 27,4% e 29,6 % nas cultivares RB92579 e SP81-3250, respectivamente, enquanto que as cultivares IAC91-5155 e SP83-2847 apresentaram valores próximo ao controle, porém pode-se observar um pequeno acréscimo de 11% na IAC91-5155 (Figura 16D). Por outro lado, observou-se aumento na produção de carotenóides nas cultivares quando tratados com +PQ na RB92579 de 55,6%, na SP81-3250 de 53,6%, na SP83-2847 de 31,4% e na IAC91-5155 de 67,2% (Figura 16D). O que sugere nesse estudo que o aumento de carotenóides devem ter contribuído na proteção contra danos oxidativos induzido pelo paraquat em cana-de-açúcar.

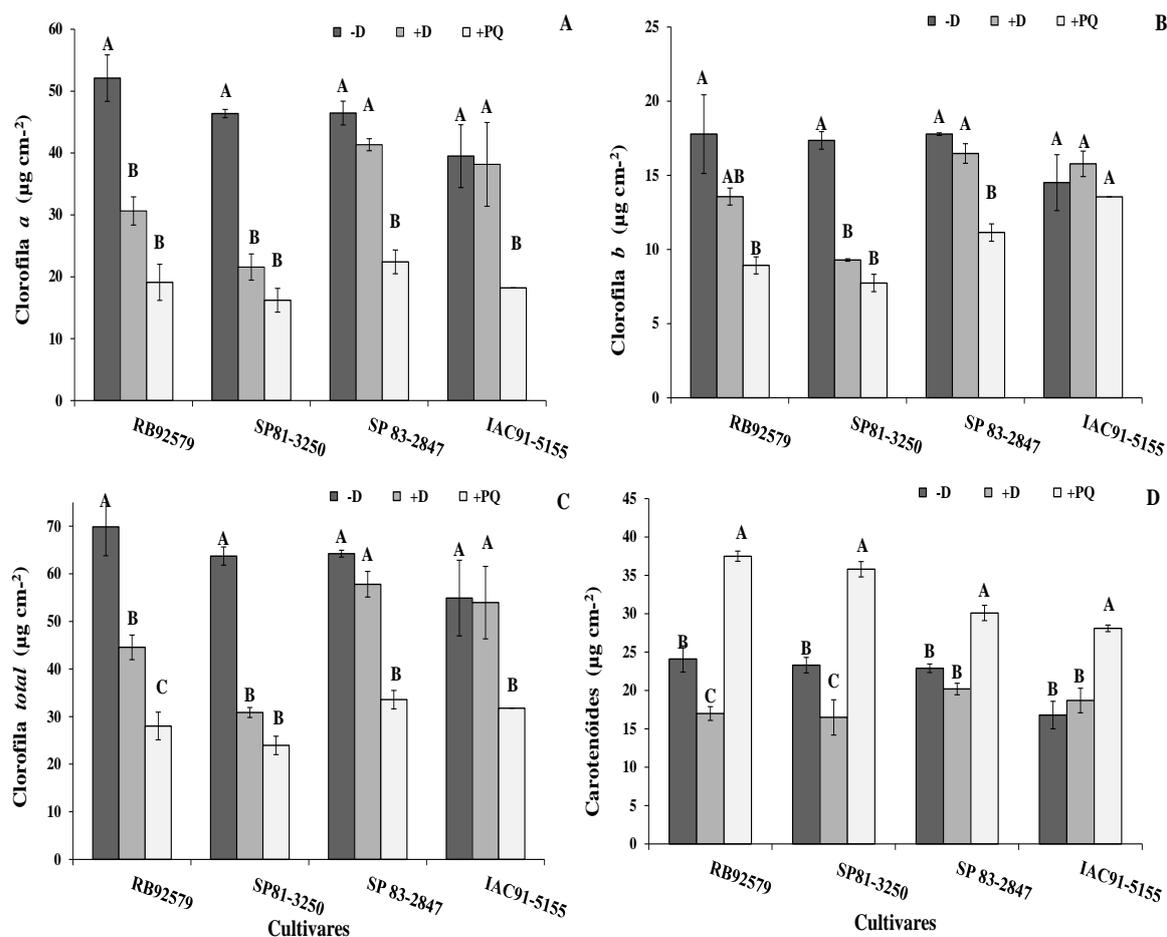


Figura 16. Teores de clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila *total* (C) e carotenóides (A) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D), deficiência hídrica (+D) e a concentração de 150 μ M de Paraquat (+PQ) por 24h. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

Presente nos cloroplastos, os carotenóides têm o principal papel de fotoprotetor antioxidante não-enzimático em tecido fotossintético, com função de dissipar o excesso de energia da clorofila na forma de calor, reduzindo o estado excitado da clorofila. Quando isso não ocorre a clorofila reativa pode reagir com oxigênio molecular formando o oxigênio singlete, ânion superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, que danificam muitos componentes celulares, especialmente lipídios (JALEEL et al., 2009).

Os carotenóides têm sido sugeridos como uma mecanismo de tolerância da cana-de-açúcar ao estresse oxidativo (WAHID, 2007; CHA-UM; KIRDMANEE, 2009; GOMATHI; RAKKIYAPAN, 2011), por participarem da eliminação de oxigênio singlete. Poucos estudos relatam o efeito de fitotoxicidade do paraquat nos teores de carotenóides, resultados foram publicados em folhas de trigo (EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005) e de milho (SHAHRTASH et al., 2011), porém não foi encontrado nenhuma discussão em cana-de-açúcar.

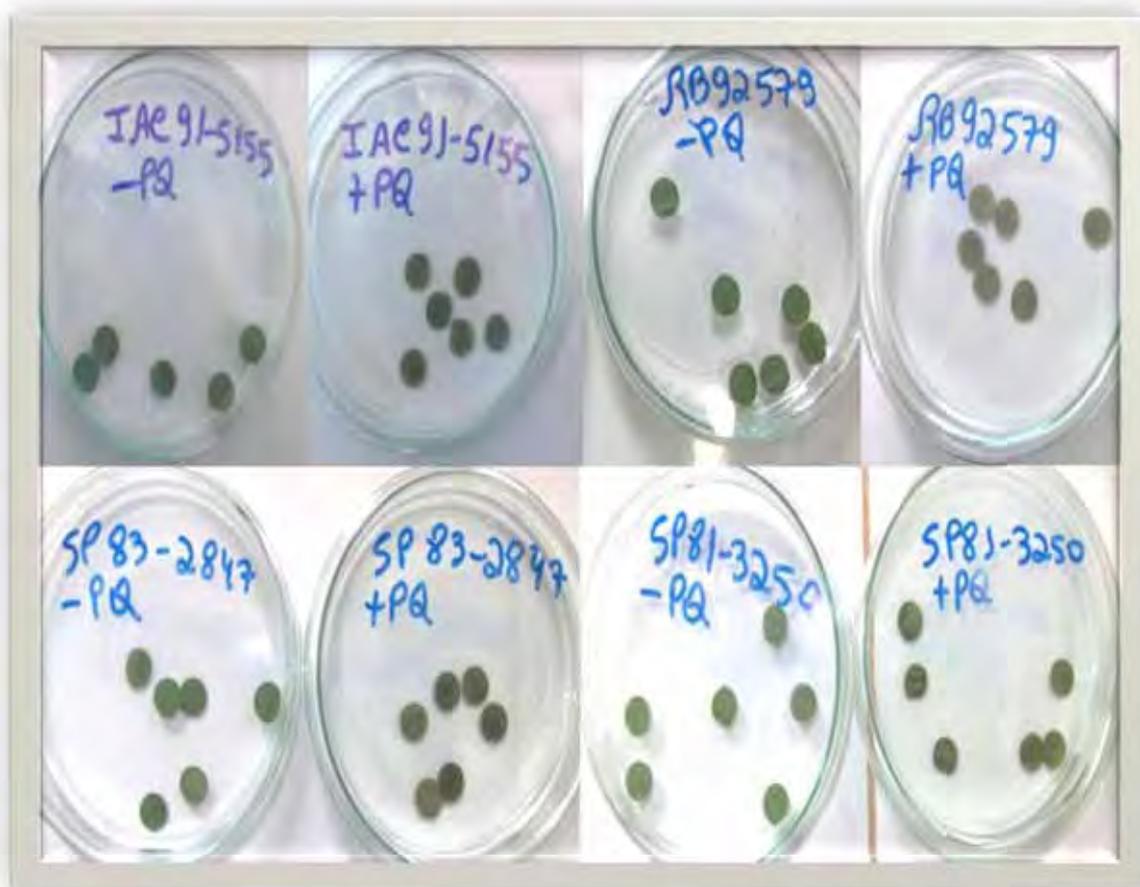


Figura 17. Discos foliares de cana-de-açúcar em placas de Petri, tratados com solução de Paraquat 150 μM por 24h de exposição sob intensidade luminosa de 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (+PQ) e controle (-PQ) em câmara de crescimento.

6.2.3 Comparação de danos oxidativos em solutos orgânicos em cana-de-açúcar submetida a estresse induzido por deficiência hídrica e paraquat

Neste estudo, pôde-se observar um padrão de resposta semelhante das alterações das concentrações de proteínas solúveis nas quatro cultivares quando submetidas a deficiência hídrica ou ao tratamento +PQ (Figura 3C). A deficiência hídrica provocou reduções nas concentrações de proteínas da SP81-3250 de 36,8%, RB92579 de 33,4%, e da SP83-2847 de 26,6%. No tratamento com +PQ essas reduções de proteínas foram na SP81-3250 de 52,4%, RB92579 de 40,5%, e da SP83-2847 de 22,2%. No entanto, a cultivar IAC91-5155 não foi afetada pelo tratamento +D ou +PQ, mantendo médias próximas ao controle no teor de proteína (Figura 3C), o que sugere o padrão de tolerância a ambos os estresses para essa cultivar.

Tabela 11. Análise de variância de teores de proteína, carboidrato solúvel e prolina em cana-de-açúcar submetida aos regimes de estresse controle (-D), deficiência hídrica (+D) e Paraquat (+PQ).

| Fonte de variação | GL | Solutos orgânicos | | |
|-------------------------|----|---|--|---|
| | | Proteínas solúveis totais (mg g ⁻¹ MF) | Carboidratos Solúveis totais (mg g ⁻¹ MS) | Prolina Livre (μmol g ⁻¹ MS) |
| Cultivar (C) | 3 | 6,4** | 22,4** | 48,2** |
| Regime de estresse (RE) | 2 | 35,9** | 137,7** | 327,4** |
| C X RE | 6 | 6,1** | 27,8** | 23,9** |
| CV% | | 13,3 | 5,3 | 6,0 |

G.L.: graus de liberdade; ns: não significativo; *: significativo ($P < 0,05$); **: significativo ($P < 0,01$); C.V.: coeficiente de variação.

A exposição dessas cultivares às condições de seca ou ao herbicida PQ induziu ao estresse oxidativo, contribuindo para aumento na produção de EROs que foram prejudiciais ao metabolismo de produção de proteínas, o que favoreceu a desnaturação ou degradação desta molécula (BRITO et al., 2008; SOOD et al., 2011, SHAHRTASH et al., 2011). Sob estresse induzido por paraquat também foram verificados reduções de proteína em cultivares de cana-de-açúcar (CHAGAS et al., 2008), em milho

(SHAHRTASH et al., 2011) e em planta inferior *Azolla microphylla* Kaul. (SOOD et al., 2011). Segundo esses autores, a desnaturação e degradação da proteína e danos da membrana aumentam com o tempo de exposição e dose de paraquat, o que é devido ao aumento dos níveis de

De modo geral, o estresse oxidativo induzido pelo PQ causou redução nos carboidratos solúveis total na maioria das cultivares em SP81-3250 (6%), RB92579 (21,4%), e SP83-2847 (11%) (Figura 3A). Por outro lado, a cultivar IAC91-5155 apresentou valores semelhantes ao controle, não sendo afetada pelo estresse induzido por +PQ. Sob deficiência hídrica, essas respostas foram inversas ocorrendo aumento nos teores de açúcares nas cultivares RB92579 (48,1%), SP83-2847 (18%) e IAC91-5155 (25,3%). No entanto, a cultivar SP81-3250 apresentou redução de 14% (Figura 3A). Na literatura não foram encontrados resultados que abordem respostas do conteúdo de carboidratos solúveis nas folhas ao estresse induzido por paraquat. No entanto, este estudo sugere que a redução de carboidratos foi em virtude do efeito tóxico do paraquat, que acarretou danos no cloroplasto como a degradação e destruição das moléculas de amido nas plantas.

Efeitos diferenciados também foram encontrados para prolina entre os tratamentos +D e +PQ. Para o tratamento com paraquat, as cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 apresentaram reduções de 26,7%, 10,8%, 53,8% e 47%, respectivamente, (Figura 18C). O que sugere que o estresse oxidativo induzido pelo PQ também contribuiu para inibição da biossíntese e ou destruição de prolina. O estresse oxidativo induzido pelo PQ contribuiu para redução de prolina em todas as cultivares, o que indica que o herbicida participou da inibição da biossíntese e ou destruição de prolina, diante disso, pode-se supor que a concentração 150 μ M PQ por 24 h foi altamente tóxica para prolina, o que devem ter inibido os processos de reparação, os quais são ligados a síntese de prolina no cloroplasto.

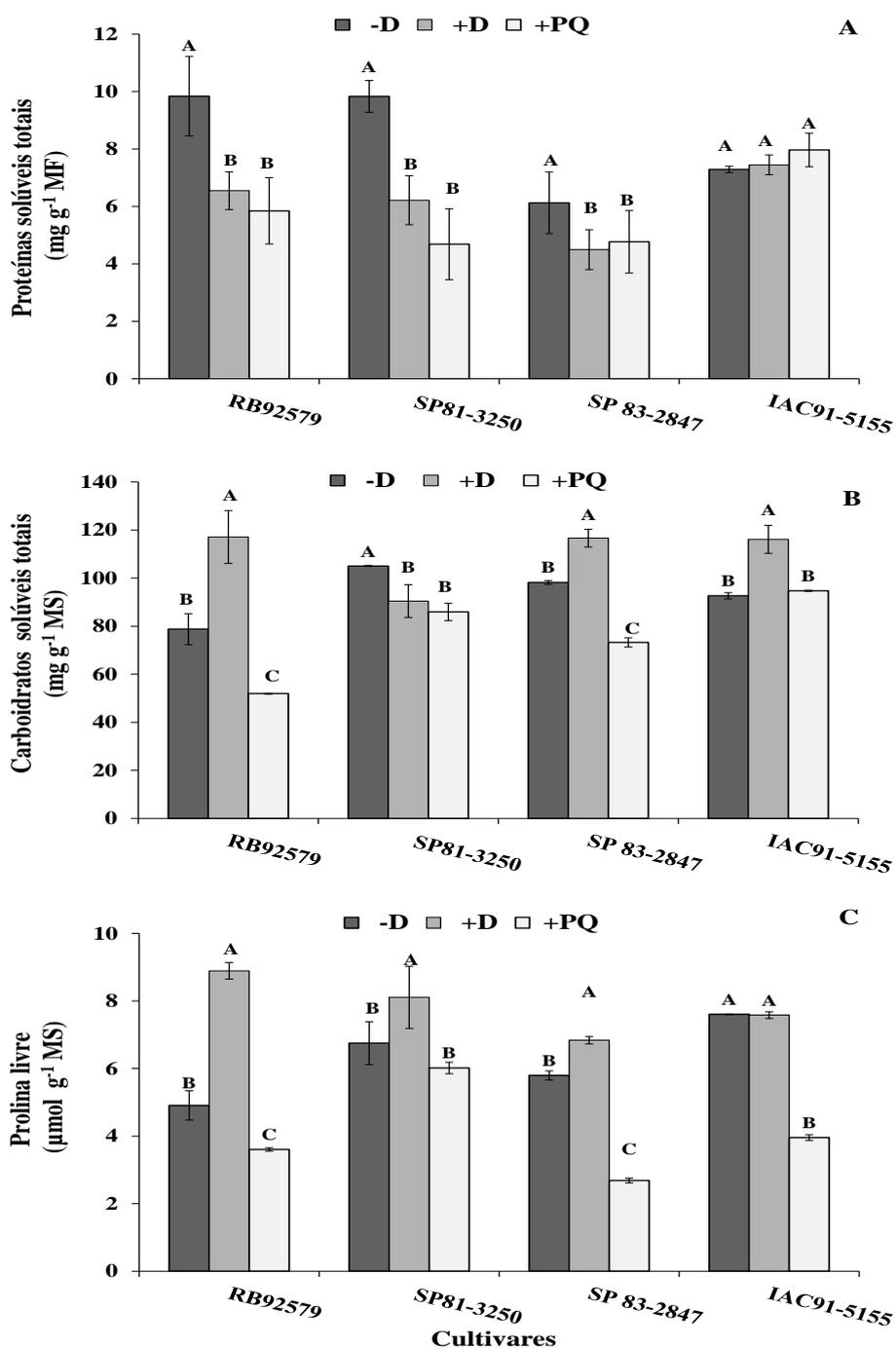


Figura 18. Teores de proteínas solúveis totais (A), carboidratos solúveis totais (B) e prolina livre (C) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) e a concentração de 150 μ M de Paraquat (+PQ) por 24h. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

No entanto alguns estudos demonstraram que a prolina está envolvida no sistema de proteção contra danos oxidativos induzidos pelo estresse causado por paraquat (MOLINARI et al., 2007; SHEVYAKOVA et al., 2009; SHAHRTASH et al., 2011), fato não evidenciado nessa pesquisa. Em estudo em discos foliares de cana-de-açúcar MOLINARI et al. (2007) estudaram estresse oxidativo mediado por paraquat 5 μ M por 24h, e verificaram em plantas transgênicas genes que estimulavam a produção de prolina e quando tratadas com paraquat permaneciam verdes apresentando maiores teores de clorofilas, esse estudo evidenciou os efeitos protetores da prolina para os danos causados pelo paraquat, sustentando a hipótese de seu papel como agente antioxidante de EROs. Dessa forma, teores de prolina podem ser bons parâmetros bioquímicos como indicadores para o estresse por deficiência hídrica, mas não foram eficientes como sinalizadores do estresse mediado por paraquat, devido a grande redução provocada pelo herbicida nesse soluto orgânico.

6.2.4 Resposta das enzimas antioxidantes ao estresse oxidativo induzido por deficiência hídrica ou Paraquat em cana-de-açúcar

Tabela 12. Análise de variância das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em cana-de-açúcar submetida aos tratamentos controle (-D), deficiência hídrica (+D) e Paraquat (+PQ).

| Fonte de variação | GL | Enzimas antioxidantes | | |
|--------------------|----|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| | | SOD (EC 1.15.1.1) | CAT (EC 1.11.1.6) | APX (EC 1.11.1.11) |
| Cultivar (C) | 3 | 26,8** | 21,8** | 13,3** |
| Tratamentos (Trat) | 2 | 27,5** | 14,25** | 124,6** |
| C X Trat | 6 | 0,6 ^{ns} | 35,03** | 9,0** |
| CV% | | 13,2 | 10 | 10 |

G.L.: graus de liberdade; ns: não significativo; *: significativo ($P < 0,05$); **: significativo ($P < 0,01$); C.V.: coeficiente de variação.

Pode-se observar o aumento da atividade da SOD em todas as cultivares promovido pelo estresse oxidativo da deficiência hídrica (+D) e do paraquat

(+PQ), com incrementos de 33,6% em +D e de 43,5% em +PQ para RB92579, de 40,3% em +D e de 28% em +PQ para SP81-3250, de 37,5% em +D e de 56% em +PQ para SP83-2847, e de 36,6% em +D e de 40% em +PQ para IAC91-5155 (Figura 19A).

O aumento na atividade de SOD em ambos os estresses sugere que essa enzima atuou como fator de sinalização de superprodução de EROs, em especial radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), pois a SOD atua nos cloroplastos removendo e transformando $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 , esse é desintoxicado por outro conjunto de enzimas, CAT, GPX e APX (MITTLER, 2002; SHARMA et al., 2012).

O estresse causado pelo paraquat induziu ao aumento da enzima SOD em todas as cultivares, sendo um indicativo que o herbicida é um indutor potente de estresse oxidativo. Sobre o estresse induzido por Paraquat, diferentes estudos relatam que a toxicidade do herbicida é mediada pelo aumento da ativação significativa de SOD na busca do equilíbrio do sistema antioxidante como já verificado em cana-de-açúcar (CHAGAS et al., 2008), milho (DARKÓ et al., 2009), arroz (ZHENFEI et al., 2007), trigo (EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005; SHEVYAKOVA et al., 2009) como também em hortícolas como pepino (LIN et al., 2011) e abóbora (YEOL YOON et al., 2011).

Na atividade da enzima catalase, as cultivares apresentaram comportamentos diferenciados entre os tratamentos +D e +PQ (Figura 19B). Sob estresse oxidativo induzido por +PQ, o níveis de CAT aumentaram na cultivar SP81-3250 de 20,4% e SP83-2847 de 79,5%. Porém foram constatando redução da atividade CAT na cultivar RB92579 de 30,6% e IAC91-5155 de 14%. Sob deficiência hídrica, a CAT apresentou redução da atividade cultivar SP81-3250 de 25% e RB92579 de 40,3%. A cultivar SP83-2847 houve aumento da atividade CAT de 43,6%, a IAC91-5155 não foram verificadas alterações para CAT sob condições de deficiência hídrica (Figura 19B).

O aumento da atividade da enzima CAT nas cultivares tratadas com +PQ sugerem que as plantas estavam usando essa enzima como mecanismo de defesa contra os danos oxidativo provocado pelo herbicida. Varios estudos consideraram o aumento na atividade da CAT como um importante sistema de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo induzido por paraquat em diferentes estudos, tais como em folha de ervilha (ITURBE-ORMAETXE et al., 1998), trigo (EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005) e milho (SHAHRTASH et al., 2011). As elevadas concentrações da enzima CAT são importantes para redução das concentrações de H_2O_2 , assim essa enzima desempenha papel

importante na adaptação e sobrevivência final das plantas durante períodos de estresse (ASADA, 1999; GILL; TUTEJA, 2010).

Na atividade da APX observou-se aumento da atividade dessa enzima em todas as cultivares sob deficiência hídrica ou paraquat, com maior aumento da taxa de APX na cultivar SP81-3250 sob +D (138%) e sob +PQ (127%), seguida da SP83-2847 sob +D (86%) e sob +PQ (104%), da IAC91-5155 sob +D (58,6%) e sob +PQ (42,4%), e menores aumentos foram verificados na RB92579 sob +D (48,6%) e sob +PQ (12%) (Figura 19C).

Na atividade da APX observou-se aumento da produção dessa enzima em todas as cultivares sob estresse induzido por deficiência hídrica ou paraquat. Isso evidencia um papel fundamental da APX de permitir proteção das cultivares contra o potencial aumento H_2O_2 produzida pelas condições de seca e da toxicidade do herbicida Paraquat. O que afirma que aumento da atividade da APX possa estar intimamente relacionado à tolerância a esses estressores, devido sua eficiente capacidade de eliminação de H_2O_2 (NOCTOR; FOYER, 1982; GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012).

Neste estudo pôde-se observar que em 24 h de exposição de PQ, a cultivar SP81-3250 já exibia claros sinais visuais de toxicidade, como murchamento e clorose, além da alta degradação de clorofila, como já discutido anteriormente, o que indica alto nível de estresse oxidativo nos cloroplastos. Nesse caso, as atividades aumentadas de SOD e de APX certamente não foram suficientes na detoxificação de radicais tóxicos nos cloroplastos da SP81-3250, o que confirma a maior sensibilidade dessa cultivar ao estresse oxidativo. Segundo OLIVEIRA JUNIOR (2011), a toxidade do paraquat na folha eleva a produção de radicais livres que causam danos às células, levando à clorose, necrose e morte celular.

Respostas inversas foram constatadas por CHAGAS et al. (2008), que estudando estresse induzido pelo paraquat na cultivar SP80-3280, evidenciaram grande redução de APX, sugerindo que os danos oxidativos em folhas de cana-de-açúcar foram relacionados com o excesso de H_2O_2 , provavelmente nos cloroplastos, causados por um desequilíbrio entre atividade da SOD e APX, enquanto a SOD aumentava, a APX foi limitante. Em folhas de arroz (ZHENFEIG et al., 2007) e trigo (SEDIGHEH et al., 2011) tratadas com paraquat também foram verificadas redução da APX relacionadas a súbita acumulação de H_2O_2 no cloroplasto.

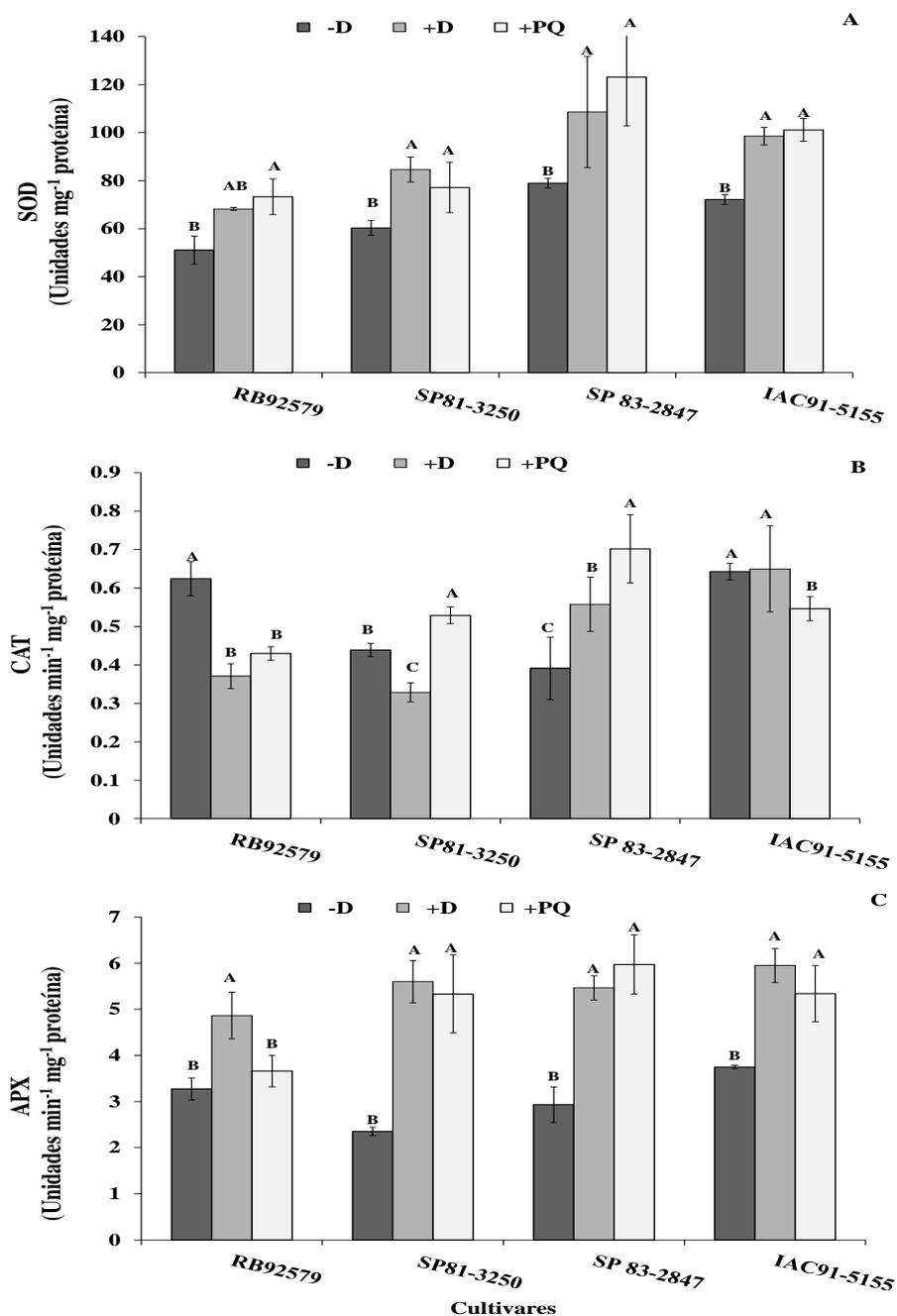


Figura 19. Enzimas antioxidantes superóxido dismutase, SOD, EC 1.15.1.1, (A), catalase, CAT, EC 1.11.1.6, (B) e ascorbato peroxidase, APX, EC 1.11.1.11, (C) nas cultivares RB92579, SP81-3250, SP83-2847 e IAC91-5155 submetidas aos regimes hídricos: adequado (-D) e deficiência hídrica (+D) e a concentração de 150 µM de Paraquat (+PQ) por 24h. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Cada símbolo indica o valor médio de quatro repetições \pm desvio-padrão.

Outros estudos relatam que o aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX teve ação de desintoxicação contribuindo para diminuição da peroxidação lipídica, assim desempenhando um papel importante no mecanismo de tolerância ao estresse oxidativo induzido pelo PQ em diferentes culturas (HUNG et al., 2002; EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005; LIU et al., 2011; SOOD et al., 2011; YEOL YOON, 2011).

Diante dos dados supracitados, este estudo propõe que menores graus de toxidades do paraquat nas cultivares consideradas tolerantes a seca SP83-2847 e IAC91-5155 estão relacionadas com aumento, ou pelo menos, a manutenção da atividade da das enzimas SOD, CAT e APX, o que deve ter contribuído para a destoxificação de EROs e menores reduções de F_v/F_m , gs, clorofila b e clorofila total. Dessa forma, as enzimas antioxidantes podem ser consideradas potenciais mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo em cana-de-açúcar.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos de comportamentos compatíveis entre o estresses induzidos pela deficiência hídrica e paraquat foram encontrados nesse estudo em cana-de-açúcar diferenciando as cultivares sensíveis das tolerantes, por meio dos atributos fisiológicos F_v/F_m , gs, clorofilas e enzimas antioxidantes, sendo bons sinalizadores do estresse oxidativos. Porém ainda se faz necessário outra abordagem no estudo comparativo, combinando os aspectos fisiológicos, metabólicos e moleculares com as expressões de genes em ambos os estresses, para então termos a efetiva confirmação das descobertas deste estudo. Além disso, pelo paraquat ter apresentado efeitos fitotóxicos, recomenda-se estudos para averiguação de concentrações menores a 150 μM PQ, a fim de obter melhor resultados de simulação ao estresse oxidativo. A elucidação destes mecanismos facilitará, por certo, o processo de seleção de novos materiais genéticos, indicada apenas com base na sua tolerância ao paraquat, além de contribuir para o desenvolvimento de técnicas de seleção capazes de reduzir o tempo, o custo e o trabalho para avaliação de cultivares mais tolerantes a estresse abióticos como a seca.

8 CONCLUSÕES

As cultivares RB92579 e SP81-3250 possuem características fisiológicas de maior susceptibilidade à seca, como aumento da TF, intensa redução de g_s , F_v/F_m , TRA, Ψ_w , pigmentos fotossintéticos, número de folhas verdes, altura do colmo e área foliar, e inibição da enzima CAT e, ainda, a cultivar SP81-3250 não apresenta recuperação durante a reidratação.

Os atributos fisiológicos g_s , TF, F_v/F_m , Ψ_w , índice SPAD, pigmentos fotossintéticos, altura do colmo e área foliar são potenciais indicadores fisiológicos confiáveis visando à seleção de cultivares de cana-de-açúcar mais tolerantes à deficiência hídrica, e podem ser recomendados para identificação de híbridos mais tolerantes em programas de melhoramento, disponibilizando assim material ideal para estudos moleculares sobre seca.

Devido aos menores danos causados pela seca e estresse induzido por paraquat na fisiologia e bioquímica das cultivares SP83-2847 e IAC91-5155, estas têm maior potencial de tolerância ao estresse oxidativo.

Paraquat tem potencial para ser utilizado como ferramenta de seleção de cultivares de cana-de-açúcar tolerantes à deficiência hídrica, porém novos estudos deverão ser realizados para confirmar esse papel, principalmente no sentido de melhor definição da dose e metodologias a serem empregadas.

9 REFERÊNCIAS

ALMESELMANI, M. et al. Physiological Attributes Associated to Water Deficit Tolerance of Syrian Durum Wheat Varieties. **Experimental Agriculture & Horticulture**, Canada, v.1, n.1, p.21- 41, 2012.

ALMEIDA, A.C.S. et al. Desenvolvimento vegetativo e produção de variedades de cana-de-açúcar em relação a disponibilidade hídrica e unidades térmicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.5, p.1441-1448, 2008.

ALTINKUT, A. et al. Tolerance to paraquat is correlated with the traits associated with water stress tolerance in segregating F2 populations of barley and wheat. **Euphytica**, Netherlands, v.121, p.81-86, 2001.

AMALRAJ, R.S. et al. Sugarcane proteomics: Establishment of a protein extraction method for 2-DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map **Electrophoresis**, v.31, n.12, p.1959-1974, 2010.

AMUDHA, J.; BALASUBRAMANI, G. Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Frankfurt, v.6, p.31-58, 2011.

APEL, K; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.** Palo Alto, v.55, p. 373-399, 2004.

ARAÚJO, S.A.C.; DEMINICIS, B.B. Revisão, Fotoinibição da Fotossíntese, **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 4, p. 463-472, 2009.

ARAÚJO, S.A.C. et al. Características fotossintéticas de genótipos de capim-elefante anão (*Pennisetum purpureum* Schum.) em estresse hídrico. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v.32, p.1-7, 2010.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual review plant physiology molecular biology**, Palo Alto, v.50, p. 601-639, 1999.

ASADA, K. The water – water cycle as alternative photon and electron sinks. **Philosophical Transactions of the Royal Society B:Biological Sciences**, London, v.335, p.1419-1431, 2000.

ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 391-396, 2006.

BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, n.403, p.1607-1621, 2004.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.24, p.23-58, 2005.

BATES, L. S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 39, p. 205-207, 1973.

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

BEAUCHAMP, C.O.; FRIDOVICH, I. Isoenzymes of superoxide dismutase from wheat germ. **Biochimica et Biophysica Acta**, New York, v. 317, p. 50-64, 1973.

BENEŠOVÁ, M. et al. The Physiology and Proteomics of Drought Tolerance in Maize: Early Stomatal Closure as a Cause of Lower Tolerance to Short-Term Dehydration? **PLoS ONE**, Cambridge, v.7, n.6, p. 1-17, 2012.

BRITO, L.K.F.L. et al. Alterações no perfil de frações nitrogenadas em calos de cana-de-açúcar induzidas por déficit hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.6, p.683-690, 2008.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. 3rd ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367 p.

BUSSAB WO, MORETTIN PA. **Estatística básica**. 3a ed. São Paulo: Atual, 1986, p.321.

CARLIN, S.D.; dos SANTOS, D.M.M. Indicadores fisiológicos da interação entre déficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.9, p.1106-1113, 2009.

CARVALHO M.H.C. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v.3, 156-165, 2008.

CAVATTE, P.C. et al. The Physiology of Abiotic Stresses Plant Breeding for Abiotic Stress Tolerance In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. (Eds.). **Plant Breeding for Abiotic Stress Tolerance**. 102 ed.: Springer, 2012, Chapter 3, p 21-51.

CHAGAS, R.M. et al. Phytochemical Damage and Comparative Performance of Superoxide Dismutase and Ascorbate Peroxidase in Sugarcane Leaves. Exposed to Paraquat-Induced Oxidative Stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amherst, v. 9, p. 181-188, 2008.

CHAPOLA, R. G. et al. Censo varietal de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo em 2008. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 27, n. 5, p. 36-39, 2009.

CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Proline Accumulation, Photosynthetic Abilities and Growth Characters of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Plantlets in Response to Iso-Osmotic Salt and Water-Deficit Stress. **Agricultural Sciences in China**, Haidian District, Beijing, v, 8, n.1, p.51-58, 2009.

CHUGH, V.; KAUR, N.; GUPTA, A.K. Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v.48, n.1, p.47-53, 2011.

CIA, M.C. et al. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, Malden, v.161, p.313-324, 2012.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar. Safra 2012/2013, segundo levantamento. dezembro/2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2012. 18 p. Brasília. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_05_09_11_59_boletim_cana_portugues_-_agosto_2012_2o_lev.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2013.

DARKÓ, E. et al. Enhanced Tolerance to Oxidative Stress with Elevated Antioxidant Capacity in Doubled Haploid Maize Derived from Microspores Exposed to Paraquat. **Crop science**, v. 49, p 628-636, 2009.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EFEÖĞLU, B.; EKMEKÇI, Y.; ÇİÇEK, N. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v.75, p.34-42, 2009.

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

ENDRES, L. et al. Photosynthesis and water relations in Brazilian sugarcane. **The Open Agriculture Journal**, Dundee, v.4, p.31-37, 2010.

FARHAD, M. S. et al. Response of proline, soluble sugars, photosynthetic pigments and antioxidant enzymes in potato (*Solanum tuberosum* L.) to different irrigation regimes in greenhouse condition. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v.5, p.55-60, 2011.

FARIAS, C.H.A. et al. Índices de crescimento da cana-de-açúcar irrigada de sequeiro no Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.12, n.4, p.356-362, 2008.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. **Signal Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v.11, n.4, p.861-905, 2009.

GARA, L. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. **Phytochemistry Reviews**. Leiden, p. 3, v.195-205, 2004.

GE, T. et al. Effects of Water Stress on the Protective Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Roots and Leaves of Summer Maize. **Agricultural Sciences in China**, Haidian District, Beijing, v.5, n.4, p. 291-298, 2006.

GHOLAMI, M. RAHEMI, M.; RASTEGAR, S. Use of rapid screening methods for detecting drought tolerant cultivars of fig (*Ficus carica* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.143, n.16, p.7-14, 2012.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.48, p.909-930, 2010.

GILBERT, M.E.; ZWIENIECKI, M.A.; HOLBROOK, N.M. Independent variation in photosynthetic capacity and stomatal conductance leads to differences in intrinsic water use efficiency in 11 soybean genotypes before and during mild drought. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.62, n. 8, p. 2875-2887, 2011.

GOMATHI, R.; RAKKIYAPAN, P. Comparative lipid peroxidation, leaf membrane ther most ability, and antioxidant system in four sugarcane genotypes differing in salt tolerance, **International Journal of Plant Physiology and Biochemistry**, v.3, n.4, p. 67-74, 2011.

GOMATHI, R.; MANOHARI, G.; RAKKIYAPPAN, P. Antioxidant Enzymes on Cell Membrane Integrity of Sugarcane Varieties Differing in Flooding Tolerance. **Sugar Tech**, Nova Délhi, v.14, n.3, p.261-265, 2012.

GONÇALVES, E.R. et al. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedade de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 4, p. 378-386, 2010.

GORAI, M.; HACHEF A.; NEFFATI, M. Differential responses in growth and water relationship of *Medicago sativa* (L.) cv. Gabès and *Astragalus gombiformis* (Pom.) under water-limited conditions. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, n. 22, v.1, p. 01-12, 2010.

GRAÇA, J.P. et al. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 22, p.189-197, 2010.

HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.84, p.450-455, 1987.

HAYAT, S. et al. Role of proline under changing environments: A review **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v.7, n.11, p. 1456-1466, 2012.

HEMAPRABHA, G. et al. Evaluation of Drought Tolerance Potential of Elite Genotypes and Progenies of Sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids). **Sugar Tech**, Nova Délhi, v.15, n1, p 9-16, 2013.

HERMANN, E.R.; CÂMARA; G.M.S. Um método simples para estimar a área foliar da cana-de-açúcar. **Revista da STAB**, Piracicaba, v. 17, p. 32-34, 1999.

HUNG, K.T.; CHANG, C.J.; KAO, C.H. Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.159, p.159-166, 2002.

INMAN-BAMBER, N.G.; SMITH, D.M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.92, n.2, p.185-202, 2005.

ITURBE-ORMAETXE, I. et al. Oxidative Damage in Pea Plants Exposed to Water Deficit or Paraquat. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.116, 173-181, 1998.

JALEEL, C.A. et al. Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. **International journal of agriculture & biology**, v.11, n. 1, 2009.

JANGPROMMA, N. et al. Rapid assessment of chlorophyll content in sugarcane using a spad chlorophyll meter across different water stress conditions. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.9, p. 368-374, 2010 a.

JANGPROMMA, N. et al. Proteomics Analysis of Drought Stress-Responsive Proteins as Biomarker for Drought-Tolerant Sugarcane Cultivars. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 2, p.89-102, 2010 b.

KAR, M.E.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.57, p.315-319, 1976.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima artes, 2004. 531p.

LAWLOR, D.W.; TEZARA, W. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. **Annals of Botany**, London, v.103, p.561-579, 2009.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, New York, v.148, p.350-382, 1987.

LIN, S.H et al. Paraquat pre-treatment increases activities of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in salt-stressed cucumber leaves **Acta Physiol Plant**, v.33, p.295-304, 2011.

LIU, Z.J. et al. Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in drought-stressed cucumber leaves. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.121, p.138-143, 2009.

LOBO, F.A. et al. Intercâmbio gasoso em plantas jovens e adultas de *Tectona grandis* cultivadas no cerrado do Brasil central. **Revista Agricultura Tropical**, Cuiabá, v.9, p.126-143, 2007.

LONG, S. P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P. G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto. v.45, p.633-662, 1994.

LOPES, J.P. et al. Análise de crescimento e trocas gasosas na cultura de milho em plantio direto e convencional. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.4, p.839-848, 2009.

MACHADO, R.S. et al. Respostas biométricas e fisiológicas ao deficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, p.1575-1582, 2009.

MARALIAN, H. et al. Influence of water deficit stress on wheat grain yield and proline accumulation rate. **African Journal of Agricultural Research**, Victoria Island, Lagos, v.5, p.286-289, 2010.

MASCHER, R. et al. Improvement of tolerance to paraquat and drought in barley (*Hordeum vulgare* L.) by exogenous 2-aminoethanol: effects on superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure. **Plant Science**, Limerick, v.168, p.691-698, 2005.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 659-668, 2000.

MILLER, J.D.; GILBERT, R.A. **Sugarcane Botany: A Brief View**. University of Florida IFAS extension. Dispon[ível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/SC034>. 2009>. Acesso em: 13 fev. 2013.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, **Plant Science**, Limerick, v.7, n.9, 2002.

MOLINARI, H.B.C. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v130, p.18-229, 2007.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1981.

NÓBREGA, J.C.M. de; DORNELAS, M.C. Biotecnologia e Melhoramento da Cana - de - de Açúcar; In: SEGATO, S.V. et al. (orgs). **Atualização em produção de Cana-de-açúcar**. Piracicaba: ESALQ, 2006. cap 3, v.1, p. 40-56.

NOCTOR, G.; FOYER C.H. Ascorbate and Glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual review plant physiology molecular biology**, Palo Alto, v.49, p.249-27, 1998.

OLIVEIRA Jr, R.S. Mecanismos de ação de herbicidas. OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. (Coord.). *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. Curitiba: Omnipax, 2011, cap. 7, p. 141-192.

PARSONS, L. R.; BANDARANAYAKE, W. N. Performance of a new capacitance soil moisture probe in sandy soil. **Soil and Water Management & Conservation**, Florida, v. 73, n. 4, p. 1378-1385, 2009.

PATADE, V.P.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Salt and drought tolerance of sugarcane under iso-osmotic salt and water stress: growth, osmolytes accumulation, and antioxidant defense, **Journal of Plant Interactions**, v.6, n.4, p. 275-282, 2011.

PINCELLI, R.P. **Tolerância a deficiência hídrica em cultivares de cana-de-açúcar avaliada por meio de variáveis morfofisiológicas**. 2010. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mequita Filho", Botucatu.

PINCELLI, R.P.; SILVA, M.A. Alterações morfológicas foliares em cultivares de cana-de-açúcar em resposta à deficiência hídrica. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 4, p. 546-556, 2012.

PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, Limerick, v.167, p.1307-1314, 2004.

POSPÍŠIL, P. Production of reactive oxygen species by photosystem II, **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1787, n.10, p.1151-1160, 2009.

QUEIROZ, R.J.B. et al. Biochemical and physiological responses of sugarcane cultivars to soil water deficiencies. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v.68, n.4, p.469-476, 2011.

RAMESH, P.; MAHADEVASWAMY, M. Effect of formative phase drought on different classes of shoots, shoot mortality, cane attributes, yield and quality of four sugarcane cultivars. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.185, p.249-258, 2000.

ROBERT, G. et al. Apoplastic superoxide level in wheat protoplast under photooxidative stress is regulated by chloroplast redox signals: effects on the antioxidant system. **Plant Science**, Limerick, v.177, n.3, p. 168-174, 2009.

RODRIGUES, F.A.; LAIA, M.L.; ZINGARETTI, S.M. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant Science**, Limerick, v.176, p.286-302, 2009.

SALES, C.R.G. et al. Trocas gasosas e balanço de carboidratos em plantas de cana-de-açúcar sob condições de estresses radiculares, **Bragantia**, Campinas, v. 71, n. 3, p.319-327, 2012.

SEDIGHEH, H.G. et al. Oxidative stress and leaf senescence. **BMC Research Notes**, London, v. 477, n.4, p. 1-9, 2011.

SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, New York, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SHAHRTASH, M.; MOHSENZADEH, S.; MOHABATKAR, H. Salicylic Acid Alleviates Paraquat Oxidative Damage in Maize Seedling. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, Agra, v.2, n.3, p.377-382, 2011.

SHAALTIEL, Y.; GRESSEL J. Kinetic analysis of resistance to paraquat in *Cyniza*: evidence that paraquat transiently inhibits leaf chloroplast reactions in resistant plants. *Plant physiology*, Minneapolis, v.85, n.4, p.869-871, 1987.

SHARIFI, P. et al. Relationship between drought stress and some antioxidant enzymes with cell membrane and chlorophyll stability in wheat lines. **African Journal of Microbiology Research**, v.6, n.3, p. 617-623, 2012.

SHEVYAKOVA, N.I.; BAKULINA, E.A.; KUZNETSOV, VI.V. Proline Antioxidant Role in the Common Ice Plant Subjected to Salinity and Paraquat Treatment Inducing Oxidative Stress. **Russian journal of plant physiology**, Moscow, v56, n. 5, p.736-742. 2009.

SILVA, M.A. et al. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.19, n.3, p.193-201, 2007, a.

SILVA, M. et al. Standardizing Paraquat a selection tool for drought tolerance in sugarcane. In: Annual meeting Rio Grande Valley Horticultural Society, 61., 2007, Edinburg. Abstracts. Edinburg: Subtropical Plant Science, Rio Grande Valley Horticultural Society, 2007. v. 59. 21p, b.

SILVA, M.A. et al. Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.65, n.6, p.620-627, 2008.

SILVA, M.A. et al. FENOLOGIA DA CANA-DE-AÇÚCAR. Fenologia da cana-de-açúcar. IN: CRUSCIOL, C.A.C.; SILVA, M.A.; ROSSETTO, R., SORATTO, R. P. (eds.). **Tópicos em ecofisiologia da cana-de-açúcar**. 1 ed. Botucatu: FEPAF, 2010. cap. 1, v. 1, p. 8-22.

SILVA, M.A. et al. Use of physiological parameters in screening drought tolerance in sugarcane genotypes. **Sugar Tech**, Nova Délhi, v.13, p.191-197, 2011.

SILVA, M.A. et al. Relationships between physiological traits and productivity of sugarcane in response to water deficit. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, n.15, v.1, p 1-15, 2013.

SILVA, P.P. et al. Path analysis for selection of drought tolerant sugarcane genotypes through physiological components. **Industrial Crops and Products**, v.37, p. 11-19, 2012.

SILVA, M. A.; CAPUTO, M. M. Uso de paraquat como ferramenta para selecionar genótipos de cana-de-açúcar tolerantes à deficiência hídrica. In: 5 Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas - O melhoramento e os novos cenários da agricultura, 2009, Guarapari. Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. Vitória: SBMP, 2009. v. 5.

SILVA, A.L.C; COSTA, W.A.J.M. Varietal variation in stomatal conductance, transpiration and photosynthesis of commercial sugarcane varieties under two contrasting water regimes. **Tropical Agricultural Research & Extension**, Kamburupitiya, v.12, n.2, p. 91-96, 2009.

SMIT, M.A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 98, p. 91-97, 2006.

SOOD, A.; PABBIB, S.; UNİYALA, P.L. effects of Paraquat on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Aquatic Fern *Azolla microphylla*, **Russian Journal of Plant Physiology**, , Moscow, v. 58, n.4, p. 667-673, 2011.

SOREN, K.R. et al. Recent advances in molecular breeding of drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.), **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v.9, p.233-251, 2010.

SRIVASTAVA, S. et al. Hydrogen peroxide scavenging enzymes impart tolerance to high temperature induced oxidative stress in sugarcane. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v.33, n.3, p.657-61, 2012.

SRIVASTAVA, S. et al. Hydrogen peroxide scavenging enzymes impart tolerance to high temperature induced oxidative stress in sugarcane. **Journal of Environmental Biology**, v.33, n.3, p.657-61, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

TORRES NETTO, A. et al. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 104, p.199-209, 2005.

WAHID, A. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.120, n.2, p.219-228, 2007.

WANG, B. Z. et al. Effects of coronatine on growth, gas exchange traits, chlorophyll content, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in maize (*Zea mays* L.) seedlings under simulated drought stress. **Plant Production Science**, Tokyo, v.11, p.283-290, 2008.

YEOL YOON, J. et al. Tolerance to paraquat-mediated oxidative and environmental stresses in squash (*Cucurbita* spp.) leaves of various ages. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amherst, v.99, p.65-76, 2011.

YORDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought and stress tolerance. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v.1, p.187-206, 2003.

ZHENFEI, G. et al. Differential response to paraquat induced oxidative stress in two rice cultivars on antioxidants and chlorophyll a fluorescence. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.29, n.1, p 39-46, 2007.

ZHOU, Q.; YU, B. Changes in content of free, conjugated and bound polyamines and osmotic adjustment in adaptation of vetiver grass to water deficit. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.48, p.417-425, 2010.

ANEXO 1

