

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CÂMPUS JABOTICABAL**

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLANTAS**

**JOVENS DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB DIFERENTES**

**CONCENTRAÇÕES DE NaCl NO SOLO**

**Flávio José Rodrigues Cruz**

Engenheiro agrônomo

**2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CÂMPUS JABOTICABAL**

**RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLANTAS  
JOVENS DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE NaCl NO SOLO**

**Flávio José Rodrigues Cruz**

**Orientadora: Profa. Dra. Durvalina Maria Mathias dos Santos**

**Coorientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal)

**2015**

C957r Cruz, Flávio José Rodrigues  
Respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas jovens de cana-de-açúcar sob diferentes concentrações de NaCl no solo / Flávio José Rodrigues Cruz. -- Jaboticabal, 2015  
xix, 107p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015  
Orientadora: Durvalina Maria Mathias dos Santos  
Banca examinadora: Rogério Falleiros de Carvalho, Paulo Alexandre Monteiro de Figueiredo, Gustavo Habermann, Gustavo Maia Souza

Bibliografia

1. Sódio. 2. Radicais livres. 3. Metabolômica. 4. Cana-de-açúcar. Solutos compatíveis. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61:631.413.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Flávio José Rodrigues Cruz, natural de Belém do Pará é engenheiro agrônomo graduado em 2008 pela Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) e mestre em Agronomia em 2011 pela mesma instituição. No decorrer de sua graduação, participou de estudos voltados a estresses abióticos, sobretudo a deficiência hídrica e toxicidade por alumínio em plantas de interesse agrícola e florestal, no decorrer de seu estágio no Laboratório de Fisiologia Vegetal (LFV) do Instituto de Ciências Agrárias (ICA). Em seu mestrado, cujo título da dissertação foi “Aspectos biofísicos e bioquímicos da aplicação exógena de glicinabetaína em folhas de plantas de *Carapa guianensis* (Aub.) sob déficit hídrico” entrou em contato com técnicas de estudo em ecofisiologia vegetal, como trocas gasosas, fluorescência da clorofila, potencial de água e curva pressão-volume, além de técnicas bioquímicas voltadas ao estudo do impacto de estresses abióticos sobre o metabolismo antioxidativo. Ainda em 2011 ingressou no curso de pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal), nível de doutorado, cuja tese é apresentada a seguir.

A minha mãe, pai (*in memoriam*) e irmãos

*Dedico*

## **Agradecimentos**

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES (inicialmente) e CNPq (posteriormente) pela auxílio financeiro para a condução do estudo.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Durvalina Maria Mathias dos Santos pela orientação e amizade.

Ao grande ser humano e Prof. Dr. Arthur Bernardes Cecílio Filho pela atenção dispensado ao longo do curso de doutorado.

Ao Prof. Dr. Rinaldo Cezar de Paula pela gentileza de conceder o fluorômetro e a câmara de pressão de Scholander.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Priscila Lupino Gratão pelas dicas e amizade ao longo do curso.

Ao Prof. Dr. Rogério Falleiros de Carvalho pela amizade ao longo do curso.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Mara Cristina Pessôa da Cruz pelo auxílio na salinização do solo.

Ao Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro pela coorientação

Aos amigos Alexander Alves da Silva e Isabel Duarte Coutinho pela ajuda nas análises químicas no Instituto de Química na UNESP-Araraquara.

Aos amigos Denise Aparecida Chiconato e Hilário Júnior de Almeida pela ajuda na montagem e desmontagem do experimento.

A todos os amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal.

Ao grande amigo Jamil Aparecido Ferraz pela ajuda na montagem do experimento.

E, especialmente, à Sônia Raymundo Carregari, pela amizade, conversas e por sua infinita bondade e amor, virtudes que a faz querida por mim e por todos!

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUMO .....                                                                                                                                   | x         |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                 | xi        |
| Capítulo 1 - Considerações gerais .....                                                                                                        | 1         |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                     | <b>1</b>  |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                                                           | <b>2</b>  |
| 2.1. A cultura-da-açúcar .....                                                                                                                 | 2         |
| 2.1.1. Origem e importância econômica .....                                                                                                    | 2         |
| 2.1.2. Aspectos gerais da cultura.....                                                                                                         | 4         |
| 2.2. Estresses abióticos .....                                                                                                                 | 5         |
| 2.2.1. Estresse salino.....                                                                                                                    | 6         |
| 2.3. Estado hídrico de plantas.....                                                                                                            | 8         |
| 2.4. Osmólitos compatíveis.....                                                                                                                | 9         |
| 2.4.1. Prolina .....                                                                                                                           | 10        |
| 2.4.2. Glicina betaína .....                                                                                                                   | 11        |
| 2.5. Estresse oxidativo .....                                                                                                                  | 12        |
| 2.5.1. Enzimas antioxidantes.....                                                                                                              | 13        |
| 2.5.1.1. Dismutase do superóxido.....                                                                                                          | 14        |
| 2.5.1.2. Catalase .....                                                                                                                        | 14        |
| 2.5.1.3. Peroxidase do ascorbato.....                                                                                                          | 15        |
| 2.5.2. Peroxidação de lipídios e aldeído malônico .....                                                                                        | 15        |
| 2.6. Extravasamento de eletrólitos .....                                                                                                       | 16        |
| 2.7. Pigmentos fotossintéticos.....                                                                                                            | 17        |
| 2.8. Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....                                                                                                 | 18        |
| 2.9. Metabólitos secundários em plantas .....                                                                                                  | 19        |
| <b>3. REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                    | <b>21</b> |
| Capítulo 2 – Enzimas antioxidantes e osmólitos compatíveis revelam resposta diferencial de cultivar de cana-de-açúcar ao estresse salino ..... | 33        |
| Resumo .....                                                                                                                                   | 33        |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                     | <b>34</b> |

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                              | 36 |
| 2.1. Material vegetal, condições de crescimento, salinização do solo e tratamentos        | 36 |
| 2.2. Teores foliares de sódio e potássio                                                  | 38 |
| 2.3. Potencial de água de antemanhã e conteúdo relativo de água                           | 38 |
| 2.4. Prolina                                                                              | 38 |
| 2.5. Glicina betaína                                                                      | 39 |
| 2.6. Extração enzimática e determinação de proteínas                                      | 39 |
| 2.6.1. Dismutase do superóxido                                                            | 40 |
| 2.6.2. Peroxidase do ascorbato                                                            | 40 |
| 2.6.3. Catalase                                                                           | 41 |
| 2.7. Aldeído malônico e extravasamento de eletrólitos                                     | 41 |
| 2.8. Concentração de clorofilas                                                           | 42 |
| 2.9. Eficiência quântica máxima do fotossistema II                                        | 42 |
| 2.10. Delineamento experimental e análises estatísticas dos dados                         | 42 |
| <b>3. RESULTADOS</b>                                                                      | 43 |
| 3.1. Teores de sódio, potássio e sódio/potássio                                           | 43 |
| 3.2. Potencial de água de antemanhã e conteúdo relativo de água                           | 46 |
| 3.3. Glicina betaína e prolina                                                            | 49 |
| 3.4. Enzimas antioxidantes                                                                | 52 |
| 3.5. Aldeído malônico e extravasamento de eletrólitos                                     | 55 |
| 3.6. Concentração de clorofilas e eficiência quântica máxima do fotossistema II           | 58 |
| <b>4. DISCUSSÃO</b>                                                                       | 62 |
| <b>5. CONCLUSÃO</b>                                                                       | 66 |
| <b>6. REFERÊNCIAS</b>                                                                     | 67 |
| Capítulo 3 - Caracterização metabolômica de cultivares cana-de-açúcar sob estresse salino | 75 |
| <b>Resumo</b>                                                                             | 75 |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>                                                                      | 76 |
| <b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                              | 78 |
| 2.1. Material vegetal, condições de crescimento, salinização do solo e tratamentos        | 78 |
| 2.2. Teores foliares de sódio                                                             | 79 |
| 2.3. Condição hídrica da planta                                                           | 79 |
| 2.4. <i>Fingerprinting</i> de metabólitos                                                 | 80 |
| 2.4.1. Preparação das amostras                                                            | 80 |

|           |                                            |    |
|-----------|--------------------------------------------|----|
| 2.4.2.    | Análise instrumental.....                  | 81 |
| 2.4.3.    | Análise dos dados .....                    | 81 |
| <b>3.</b> | <b>RESULTADOS</b> .....                    | 82 |
| 3.1.      | Concentração de Na foliar .....            | 82 |
| 3.2.      | Potencial de água de antemanhã .....       | 82 |
| 3.3.      | <i>Fingerprinting</i> de metabólitos ..... | 85 |
| <b>4.</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....                     | 91 |
| <b>5.</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....                    | 92 |
| <b>6.</b> | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                   | 92 |

## RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DE PLANTAS JOVENS DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NaCl NO SOLO

**RESUMO** – Neste estudo foram avaliadas duas cultivares de cana-de-açúcar sob estresse salino. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4, representado pelas cultivares SP81-3250 e IAC87-3396 e concentrações salinas de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl, com avaliações aos 15 e 30 dias após a aplicação dos tratamentos salinos. Foram avaliados os teores foliares de sódio e potássio, o potencial de água de antemanhã, o conteúdo relativo de água, a concentração de prolina e glicina betaína, a atividade enzimática da dismutase do superóxido, ascorbato peroxidase e catalase, a concentração de aldeído malônico, o extravasamento de eletrólitos, a concentração de clorofilas *a* e *b*, a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II e o perfil de metabólitos secundários baseado em técnicas metabolômicas. Os tratamentos salinos promoveram aumento do teor foliar de sódio nas cultivares estudadas, com maior teor no 30° dia de avaliação, enquanto que os teores de potássio apresentaram leve redução. Por outro lado, o potencial de água de antemanhã e o conteúdo relativo de água foram reduzidos em ambas as cultivares e dias de avaliação com o aumento da severidade do estresse salino. Foi observado aumento na concentração de prolina e glicina betaína, sendo este incremento mais evidente na cv. IAC87-3396 em ambos os dias de avaliação. Similarmente, as enzimas ascorbato peroxidase e catalase tiveram aumento em suas atividades, em particular na cv. IAC87-3396 no 30° dia. Inclusive, esta cultivar de cana-de-açúcar apresentou maior concentração de aldeído malônico e extravasamento de eletrólitos em comparação a cv. SP81-3250 em ambos os dias de avaliação. Verificou-se que o estresse salino reduziu a concentração de ambos os pigmentos clorofilianos sem diferenças pronunciadas entre as cultivares nos dois dias. A eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II não apresentou diferenças significativas entre as concentrações salinas mais severas na cv. IAC87-3396 no 30° dia. A análise metabolômica foliar das cultivares de cana-de-açúcar revelou que sob estresse salino mais severo, a concentração de derivados de tricina aumentou, enquanto que no tratamento controle o metabólito detectado em maior concentração foi o ácido clorogênico. Este estudo sugere que o aumento na atividade antioxidante das enzimas ascorbato peroxidase e catalase, em paralelo ao incremento da concentração dos osmólitos compatíveis prolina e glicina betaína conferem maior tolerância ao estresse salino à cultivar IAC87-3396, dada a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos mais severos de NaCl na eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II desta cultivar em comparação à cultivar SP81-3250 no 30° dia de avaliação. Além disso, o envolvimento do ácido clorogênico nas plantas controle e, sobretudo, de flavonas na cultivar IAC87-3396 sob estresse salino mais severo pode contribuir para uma possível tolerância desta cultivar de cana-de-açúcar ao estresse salino.

**Palavras-chave:** Sódio, radicais livres, solutos compatíveis, metabolômica

## BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF SUGARCANE PLANTS UNDER DIFFERENT NaCl CONCENTRATIONS IN SOIL

**ABSTRACT** – In the present study was evaluated two cultivars of sugarcane under salt stress. The experiment was conducted in a greenhouse with temperature and relative humidity average of  $30.2 \pm 1$  ° C and  $40.7 \pm 1\%$ . The experimental design was completely randomized in a factorial  $2 \times 4$ , represented by the cultivars SP81-3250 and IAC87-3396 and salt concentrations of 0, 200, 400 and  $800 \text{ mg dm}^{-3}$  NaCl. The study was evaluated 15 and 30 days after application of the saline treatments. We evaluated foliar concentrations of sodium and potassium, predawn leaf water potential, relative water content, proline and glycine betaine concentration, enzymatic activity of superoxide dismutase, catalase and peroxidase ascorbate, malondialdehyde concentration, electrolyte leakage, chlorophyll *a* and *b* concentration, the maximum photochemical efficiency of photosystem II and the profile of secondary metabolites based on metabolomics techniques. Saline treatments caused an increase in leaf sodium content in cultivars and both days of evaluation, while the potassium had a mild reduction. On the other hand, predawn leaf water potential and relative water content were reduced in both cultivars and evaluation days with increasing severity of salt stress. There was an increase in the concentration of proline and glycine betaine. This increase was more evident in cultivar IAC87-3396 in both days of evaluation. Similarly, enzymes ascorbate peroxidase and catalase had an increase in their activities, particularly in cultivar IAC87-3396 in the 30<sup>th</sup> day. This cultivar of sugarcane had malondialdehyde concentration and electrolytes leakage higher compared to cv. SP81-3250 in both days of evaluation. Salt stress reduced the concentration of both chlorophyllian pigments with no pronounced differences among cultivars in two days evaluated. The cultivar IAC87-3396 not presented photochemical efficiency of photosystem II with significant differences between the salt concentrations on the 30<sup>th</sup> day of evaluation. Leaf metabolomics analysis of sugarcane cultivars revealed that under severe salt stress, concentration of tricine derivatives increased whereas in the control treatment the metabolite detected in higher concentrations was chlorogenic acid. This study suggests that the increase in the antioxidant activity of the enzymes ascorbate peroxidase and catalase, in parallel to the increase of concentration of osmolytes proline and glycine betaine compatible provide greater salt tolerance to cultivate IAC87-3396, due to the absence of significant differences between harshest treatments of NaCl in the photochemical efficiency of photosystem II of this cultivar to compared cultivar SP81-3396 on the 30th day of evaluation. In addition, the involvement of chlorogenic acid in the control plants and especially of flavones in cultivar IAC87-3250 under severe salt stress can contribute to a possible tolerance of this sugarcane cultivar to salt stress.

**Keywords:** Sodium, free radicals, compatible solutes, metabolomic

## Capítulo 1 - Considerações gerais

### 1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica devido produzir e acumular consideravelmente sacarose, que é a matéria-prima para a produção de açúcar e álcool. Em virtude das alterações climáticas globais e da necessidade de consumo de energias renováveis com menor impacto sobre o clima mundial, a produção de energias renováveis tem sido estimulada, sobretudo a partir culturas de interesse agroindustrial, como a cana-de-açúcar.

O Brasil figura como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com produção de 653,519 milhões de toneladas de colmo para a safra 2013/1014 e produção de açúcar de 37,713 milhões de toneladas de açúcar (ÚNICA, 2014). O Estado de São Paulo é o mais importante produtor nacional de álcool e açúcar a partir da cana-de-açúcar (ORTOLAN, 2006). Entretanto, como a cultura da cana-de-açúcar tem sido classificada como glicófita moderadamente sensível ao estresse salino (FRANCOISE; MAAS, 1999; PATADE et al., 2008) pode exibir retardo ou nenhum crescimento sob salinidade, podendo o seu crescimento ser reduzido a 50% ou mais do seu real potencial (SUBBARAO; SHAW, 1985).

A salinidade limita a produção agrícola pelo mundo inteiro, e mais de 6% dos solos são afetados pela salinidade (MUNNS; TESTER, 2008). Esta modalidade de estresse apresenta uma componente osmótica e outra iônica, onde a primeira implica a redução do potencial de água do substrato de crescimento das plantas, induzindo-as ao déficit hídrico, enquanto que a segunda está relacionada ao efeito tóxico do Na (MUNNS, 2005). Além disso, a redução na produção de culturas sensíveis cultivadas em solos salinizados comumente é atribuída ao estresse iônico do Na, que conduz a efeitos adversos na aquisição de potássio, absorção de água, redução da atividade enzimática e diminuição da fotossíntese (TESTER; DAVENPORT, 2003).

Em plantas, o efeito negativo do estresse salino se mostra evidente através do acúmulo de Na, redução do conteúdo hídrico e das trocas gasosas, diminuição

dos pigmentos clorofilianos, alterações de parâmetros fotoquímicos, aumento do estresse oxidativo, acúmulo de osmólitos compatíveis e redução do crescimento (NETONDO et al., 2004; PINHEIRO et al., 2008; GOMATHI et al., 2010; SHAFI et al., 2011; CHA-UM et al., 2012; KAHLAOUI et al., 2014). Entretanto, as plantas minimizam o impacto negativo do estresse salino acumulando osmólitos compatíveis como a prolina e glicina betaína (SZABADOS; SAVOURÉ, 2005; CHEN; MURATA, 2011) e através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a dismutase do superóxido, catalase e peroxidase do ascorbato (KHOLLOVA et al., 2010; WILLADINO et al., 2011; PATADE et al., 2011). Além disso, o envolvimento de metabólitos secundários em plantas submetidas ao estresse salino constitui outra estratégia envolvida na tolerância a estresses como, por exemplo, a síntese de compostos fenólicos que são poderosos antioxidantes sintetizados via rota do ácido chiquímico ou dos fenilpropanóides (SGHERRI et al., 2004) e todas essas estratégias mostraram-se importantes na resposta de cana-de-açúcar ao estresse salino WAHID; GHAZANFAR, 2006; WILLADINO et al., 2011; PATADE et al., 2011).

Deste modo, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a resposta de duas cultivares de cana-de-açúcar expostas ao estresse salino com base no seu conteúdo hídrico, fluorescência da clorofila, componentes enzimáticos antioxidantes, osmólitos compatíveis e metabólitos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. A cultura-da-açúcar**

#### **2.1.1. Origem e importância econômica**

A cana-de-açúcar é originária da Nova-guiné e foi levada para o Sul da Ásia, onde foi usada, de início, principalmente em forma de xarope. A primeira evidência do açúcar em sua forma sólida, data do ano 500, na Pérsia. A propagação da cultura da cana-de-açúcar no norte da África e Sul da Europa deveu-se aos Árabes, na época das invasões. Nesse mesmo período, os chineses a levaram para Java e Filipinas. As conquistas árabes no Ocidente disseminaram o cultivo da cana-de-

açúcar nas margens do Mediterrâneo, a partir do século VII. Contudo, foi a América que ofereceu à cana-de-açúcar excelentes condições para seu desenvolvimento. Mais tarde, as maiores plantações do mundo se concentraram neste continente. (MOZAMBANI et al., 2006).

No Brasil, há indícios de que o cultivo da cana-de-açúcar seja anterior à época dos descobrimentos, mas seu desenvolvimento se deu posteriormente, com a criação de engenhos e plantações com mudas trazidas pelos portugueses. Já em fins do século XVI, os Estados de Pernambuco e Bahia contavam mais de uma centena de engenhos, tendo florescido a cultura de tal modo que o Brasil, até 1650, liderou a produção de açúcar, com grande penetração no mercado europeu (MOZAMBANI et al., 2006). Atualmente, o Brasil lidera a produção mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e China (FAOSTAT, 2012) com a produção concentrada na região Centro-Sul e Nordeste, em particular no Estado de São Paulo (RUDORFF et al., 2010; FAOSTAT, 2012; EGESKOG et al., 2014).

Com ampla expansão da área de cultivo, a produção de cana-de-açúcar para a safra 2014/2015 é estimada em 642,1 milhões de toneladas de colmo (CONAB, 2014). Entretanto, a expressividade da cultura da cana-de-açúcar não se restringe à sua produtividade, mas também à sua importância como fonte renovável de energia, visto que ela é considerada como uma das melhores opções dentre as culturas para a produção de bioenergia de baixo impacto ambiental (SOUZA et al., 2005). Tal fato é evidente, pois nos últimos anos, a bioenergia vem recebendo atenção crescente em muitos países, nos campos político, econômico e técnico-científico, especialmente em razão das preocupações com as mudanças climáticas e a segurança energética. Exemplo de um produto bioenergético é o etanol derivado da cana-de-açúcar, que, no Brasil, se consolidou como importante biocombustível, substituindo a gasolina em parcela importante da demanda por combustíveis veiculares. Como resultado, a participação do etanol no consumo de combustíveis líquidos de ciclo Otto saiu de 35%, em 2002, para 55%, em 2009 (MILANEZ et al., 2014).

Como o Brasil detém o domínio da tecnologia de produção sucroalcooleira, é patente a importância desta cultura para a economia nacional, sobretudo, por conta da cadeia produtiva que ela movimenta, a qual gera empregos diretos e indiretos,

além de ser objeto de pesquisa em várias instituições de ensino e pesquisas com o intuito de estudá-la tanto no âmbito fitotécnico como energético.

### 2.1.2. Aspectos gerais da cultura

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, que abrange várias espécies. Entretanto, no Brasil e no mundo, ela é um híbrido proveniente do cruzamento entre as espécies *Saccharum* que resultou da hibridização natural entre *Saccharum officinarum* e *Saccharum barberi* (DANIELS; ROACH, 1987). Como a maioria das Poaceae (gramíneas), é uma planta C4 que está adaptada às condições de alta luminosidade, altas temperaturas e relativa escassez de água, visto que a cultura necessita de grandes quantidades de água para suprir suas necessidades hídricas, pois apenas 30% de sua massa é representada por matéria seca, enquanto que o restante pela água, dependendo do seu estágio fenológico (MOZAMBANI et al., 2006). A capacidade de assimilação de água foliar da cana-de-açúcar é superior às outras gramíneas. Isto implica dizer que a umidade do orvalho e de chuviscos, que não atinge o solo, é absorvida pelas folhas (SEGATO, et al., 2006).

É uma cultura que apresenta ampla escala de adaptação sendo cultivada principalmente em regiões de clima tropical, quente e úmido situadas entre os paralelos 35°N e 35°S (SEGATO, et al., 2006). No Brasil, as variações climáticas permitem a colheita da cana-de-açúcar de setembro a abril na região Nordeste e de maio a dezembro na região Centro-Sul e, para o seu crescimento, as condições de solo arejado e profundo, com pH variando entre 5,0 e 6,5 são ideais às exigências da cultura (VAN RAIJ, et al., 1997).

Com relação à localização da produção no território brasileiro, ela se concentra nas regiões Nordeste e Centro-Sul, com deslocamento da produção voltado para a região Centro-oeste. Tal fato implica que o crescimento da cana-de-açúcar sofre forte influência das condições edáficas e de fatores ambientais intrínsecos a cada região onde é cultivada, apresentando, portanto, variações de produção (MAULE et al., 2001).

O caráter semiperene da cana-de-açúcar é influenciado por variações climáticas ao longo do ano, o que pode interferir na produção, maturação e qualidade da cultura. Para que seus índices de produtividade sejam mantidos há a necessidade de períodos úmidos e quentes com intensa luminosidade solar no estágio vegetativo e períodos secos no estágio de maturação e colheita (ALFONSI et al., 1987) a fim de que haja alteração na relação fonte dreno da planta e toda triose fosfatada produzida pela fotossíntese seja direcionada ao tecido de reserva do colmo e nele se acumule na forma de sacarose.

A cultivar de cana-de-açúcar SP81-3250 caracteriza-se por ser produtiva, de maturação no inverno, média exigência em fertilidade do solo, responsiva nos ambientes de produção B e C, boa resposta aos maturadores, ampla adaptabilidade, ótima brotação de soqueira, alto teor de fibra e sacarose. Em solos de baixa fertilidade ou ambientes mais desfavoráveis, tem apresentado redução de produtividade e longevidade, apresentando, às vezes, sintomas da doença denominada amarelinho e suscetibilidade à cigarrinha das raízes (COPERSUCAR, 1995). A cultivar IAC87-3396 por sua vez, mostra-se produtiva, com excelente brotação de soca com palha, precoce, rústica e com boa adaptabilidade à ampla gama de ambientes (PRADO JÚNIOR, 2012).

## 2.2. Estresses abióticos

As plantas crescem e se reproduzem em um complexo ambiente composto de uma gama de fatores abióticos físicos e químicos, os quais variam no tempo e localização geográfica. Esses fatores abióticos incluem a qualidade e fluxo de ar, intensidade de luz, disponibilidade hídrica, concentrações de nutrientes minerais e de elementos traços, salinidade e o ambiente químico do solo (pH e potencial redox). Além disso, flutuações destes fatores ambientais fora de sua faixa normal promovem consequências fisiológicas e bioquímicas para as plantas que podem reduzir o crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013). Portanto, estresse abiótico é qualquer fator externo à planta que altera seu crescimento e desenvolvimento a níveis abaixo do normal, conduzindo-a a alterações nos seus vários níveis funcionais (CRAMER et al., 2011).

Em condições agrícolas ou naturais, as plantas são expostas à uma grande faixa de estresses abióticos que limitam seu crescimento e possibilidades de sobrevivência (ALEXIEVA et al., 2003; TAIZ; ZEIGER, 2013) e dentre estes estresses, o salino figura como um dos mais importantes, devido ao seu efeito osmótico e iônico sobre as plantas.

#### 2.2.1. Estresse salino

Salinidade do solo constitui-se na maior restrição à produção agrícola, afetando uma área estimada de 45 milhões de hectares de terras irrigadas e com grandes possibilidades de que esta área tenha suas dimensões aumentadas devido às mudanças climáticas globais e como consequência de práticas incorretas de irrigação (MUNNS; TESTER, 2008; RENGASAMY, 2010). Salinização de solos aráveis origina-se, sobretudo, da água de irrigação que contém quantidades traços de cloreto de sódio (NaCl) e de água do mar (MANSOUR, 2014). É um dos mais importantes estresses, por limitar a produção agrícola em regiões áridas e semiáridas, onde o conteúdo de sal do solo é naturalmente alto e a precipitação pode não ser suficiente para lixiviá-lo (ZHAO et al., 2007).

Solos salinos têm alta concentração de sais solúveis e são classificados como tais quando sua condutividade elétrica é maior ou igual que  $4 \text{ dS m}^{-1}$ . Esta definição de salinidade deriva da condutividade elétrica obtida a partir do extrato saturado do solo, que reduz a produção de várias culturas. Entretanto, muitas espécies são afetadas por uma condutividade elétrica inferior a  $4 \text{ dS m}^{-1}$  (MUNNS; TESTER, 2008).

A presença de sais no solo inibe a habilidade da planta em absorver água, conduzindo à redução do crescimento vegetal. Este é o efeito osmótico que leva à deficiência hídrica promovida pela salinidade. A absorção excessiva de íons do solo como  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  promove similarmente ao efeito osmótico, a redução do crescimento e este é o efeito iônico da salinidade sobre as plantas (MANSOUR, 2014). O íon Na tem um efeito adverso sobre o crescimento das plantas, quando presente em grandes concentrações no solo, devido sua ação inibir a atividade de várias enzimas do metabolismo respiratório e fotossintético.

Uma satisfatória razão entre K:Na é vital para ativar reações bioquímicas catalisadas por enzimas no citosol e manter o crescimento das plantas (WAKEEL, 2013). Entretanto, esta razão pode ser desfeita pela presença excessiva de Na no solo o qual dificulta a absorção de K e desencadeia a deficiência deste, além de desordens fisiológicas e metabólicas. Este problema acontece pelo fato do íon tóxico Na competir com o K por meio de um mecanismo que envolve transportadores de membranas de baixa afinidade, com o agravante do K estar comumente em baixa concentração em solos salinizados, o que implica maior absorção do Na (SALISBURY; ROSS, 2012).

A cultura da cana-de-açúcar tem sido classificada como glicófito moderadamente sensível ao estresse salino (FRANCOISE; MAAS, 1999; PATADE et al., 2008), embora esta classificação sofra influência de características genotípicas com relação ao nível de sensibilidade à salinidade (WAHID et al., 1997). Para cana-de-açúcar, o valor limite de condutividade elétrica acima da qual já há prejuízos para o desenvolvimento da planta situa-se em  $1,7 \text{ dS m}^{-1}$  (AYERS; WESTCOT, 2010).

As estratégias adotadas por plantas tolerantes à salinidade consistem em três mecanismos básicos, baseados (i) na exclusão do íon Na nas raízes com o envolvimento de proteínas transportadoras (SOS1 e HKT) presentes nas membranas plasmáticas e compartimentação nos vacúolos das células corticais, (II) absorção radicular, transporte via xilema até os tecidos foliares onde o Na é compartimentado nos vacúolos. Neste processo, há participação de transportadores de íons Na (NHX), bombas de prótons e acúmulo de osmólitos compatíveis como prolina, glicina betaína e sacarose. O terceiro mecanismo (iii) consiste em uma sinalização entre a raiz e parte aérea, antes mesmo que quantidades consideráveis de Na sejam absorvidas e translocadas via xilema à parte aérea, e que implica na redução do crescimento da parte aérea, com provável envolvimento do hormônio ácido abscísico (ABA) (MUNNS, 2005; ROY et al., 2014).

### 2.3. Estado hídrico de plantas

O potencial de água da folha descreve o estado energético foliar, cujos gradientes explicam os fluxos da água no sistema solo-planta-atmosfera. Embora haja variação ao longo do dia, mesmo em plantas irrigadas, esse parâmetro descreve o estado hídrico da planta, e tem sido muito utilizado em estudos das relações hídricas dos vegetais (WESTGATE, 1994). Desta maneira, a adoção da técnica de medição do potencial de água foliar como medida de referência do status hídrico vegetal sob condições específicas de crescimento mostra-se importante do ponto de vista fisiológico, pois evidencia o quanto fatores ambientais restritivos ao crescimento vegetal alteram a movimentação da água no sistema solo-planta-atmosfera. Além disso, como muitas plantas apresentam a capacidade de ajuste osmótico em resposta ao déficit hídrico (PREMACHANDRA et al., 1992; TAIZ; ZEIGER, 2013), o potencial de água mostra-se como um dos melhores indicadores do estado hídrico da planta, uma vez que ele se relaciona com a expansão celular (BERGONCI et al., 2000).

Portanto, o potencial de água de base ou de antemanhã ( $\Psi_{w_{am}}$ ) corresponde à medição feita pela manhã, antes do sol nascer a qual deve ser tomada em um horário no qual o comportamento iso-hídrico (em que o potencial de água permanece elevado) ou aniso-hídrico (em que diminui acentuadamente nas horas mais quentes do dia) da cultura ou planta ainda não se manifestou. Desta forma, uma das grandes vantagens do  $\Psi_{w_{am}}$ , quando comparado com outras variáveis que descrevem o estado hídrico da planta, é sua independência com relação às condições ambientais diurnas. Esta variável reflete o equilíbrio de potencial de água entre a planta e o solo (KATERJI; HALLAIRE, 1984). Em se tratando de estresses abióticos, vários estudos reportam a avaliação do  $\Psi_{w_{am}}$  como parâmetro de interesse na medição do estado hídrico de plantas, como por exemplo, em cana-de-açúcar (ALMEIDA et al., 2013; MEDEIROS et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014).

Outro parâmetro de avaliação do estado hídrico vegetal é o conteúdo relativo de água (CRA) que é definido como sendo a quantidade de água de um tecido comparada com a máxima quantidade de água que ele poderá reter em um dado momento (CAIRO, 1995). O CRA é considerado como a variação de massa de água

do tecido, a qual, por sua vez, decorre da variação da massa de água da célula e, conseqüentemente, da variação do volume celular, entre a turgescência plena e a perda da turgescência. Constitui uma valiosa ferramenta na avaliação de estresses abióticos que alteram o estado hídrico vegetal pelo fato de sua quantificação em folhas indicar tolerância a dessecação em plantas, além de que está diretamente relacionado ao conteúdo hídrico do solo (MERAH, 2001; LAWLOR; CORNIC, 2002).

#### 2.4. Osmólitos compatíveis

Osmólitos podem ser definidos como compostos orgânicos de baixa massa molecular que são utilizados pelas células para manter a pressão de turgor e volume celular, especialmente sob condições de estresse osmótico. Osmólitos são também denominados como solutos compatíveis pelo fato de permanecerem “compatíveis” com o maquinário celular, pois mesmo em elevadas concentrações não são danosos às estruturas celulares. Além disso, sob condições estressantes, estes solutos compatíveis apresentam importantes funções de manter a integridade estrutural de enzimas, membranas, hormônio e outros componentes celulares (BRAY et al., 2000; MAJUMDER, et al., 2010; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Quimicamente, os osmólitos compatíveis podem ser classificados em três tipos: betaínas (aminoácidos N-metilados totalmente derivados) e relacionados compostos [dimetilsulfopropionato (DMSP) e colina-o-sulfato]; certos aminoácidos (prolina e ectoína); polióis (mio-inositol, pinitol e outros inositóis metilados) e açúcares não reduzidos (trealose). Em células vegetais, os osmólitos compatíveis estão, sobretudo, restritos ao citosol, cloroplastos e outros compartimentos citoplasmáticos (MAJUMDER, et al., 2010). Em comum, estes compostos têm as características de permanecer quimicamente invariáveis em pH neutro e serem altamente solúveis em água (BALLANTYNE; CHAMBERLIN, 1994).

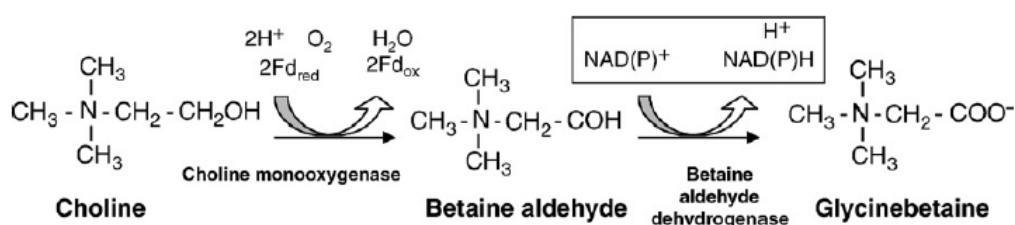
Em plantas, muitos osmólitos compatíveis se acumulam em resposta à imposição de estresses ambientais que causam desidratação celular (HARE et al., 1998) e são potencialmente indicadores de tolerância à salinidade em plantas, como a prolina e glicina betaína (ASHRAF; HARRIS, 2004).



et al., 2011; PAGARIYA et al., 2012; MAHAJAN et al., 2013), milho (KHOLOVA et al., 2010), trigo (CARILLO et al., 2008). Em plantas, o aminoácido prolina mostra-se multifuncional, contribuindo para o ajuste osmótico, estabilização da estrutura de proteínas, detoxificação de radicais livres, manutenção de adequada razão  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  compatível com o metabolismo (ASHRAF; HARRIS, 2004; KAVI KISHOR et al., 2005; ASHRAF; FOOLAD, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2013), visto que vários eventos bioquímicos danosos à célula podem resultar de um desbalanço desta razão como, por exemplo, a formação de radicais livres na etapa final de redução do  $\text{NADP}^+$  no esquema Z da fotossíntese, em situações de estresse osmótico.

#### 2.4.2. Glicina betaína

Glicina betaína (GB) é um composto quaternário de amônio que ocorre em elevadas concentrações em plantas. GB é abundante, sobretudo, no cloroplasto e tem importante função no ajuste e proteção das membranas tilacoidiais e, deste modo, ajuda a manter a eficiência fotossintética (CHEN; MURATA, 2011). Em plantas, GB é sintetizada nos cloroplastos a partir da serina via etanolamina, colina, e betaína aldeído (RHODES; HANSON, 1993). A colina é convertida a betaína aldeído pela enzima colina monooxigenase (CMO) com a participação nesta etapa de ferredoxina reduzida. Em seguida, a betaína aldeído é convertida a GB pela enzima betaína aldeído desidrogenase (BADH) e nesta etapa há a participação de  $\text{NAD(P)}^+$ , conforme o esquema 2 (ASHRAF; FOOLAD, 2007).



Esquema 2. Síntese de glicina betaína (ASHRAF; FOOLAD, 2007)

Seu acúmulo é bastante documentado em várias espécies de plantas submetidas a estresses, como em cana-de-açúcar (PATADE et al., 2008; PATADE

et al., 2011; MAHAJAN et al., 2013), trigo (CARILLO et al., 2008; WANG et al., 2010; HE et al., 2011), milho (KHOLLOVA et al., 2010; KAYA et al., 2013). Recentemente, tem sido proposto que a GB tem participação decisiva na atenuação de estresses, induzindo a transcrição de genes que codificam a síntese de enzimas antioxidantes, manutenção da estrutura conformacional das subunidades D1 do fotossistema II, além de melhorar a resposta fotossintética de plantas frente aos estresses abióticos (CHEN; MURATA, 2011).

Em genótipos de cana-de-açúcar, a avaliação da concentração de GB foi adotada como ferramenta de seleção de promissores genótipos tolerantes ao estresse salino (MAHAJAN et al., 2013). Entretanto, o aumento da concentração de GB e ativação dos mecanismos antioxidantes foi relacionado com tolerância ao estresse salino em cana-de-açúcar (PATADE et al., 2011).

## 2.5. Estresse oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (EROs) ou intermediários reativos de oxigênio (IROs) são formas parcialmente reduzidas do oxigênio atmosférico ( $O_2$ ). Elas tipicamente resultam da excitação eletrônica do  $O_2$  para formar oxigênio singlete ( $O_2^1$ ) ou da transferência de um, dois ou três elétrons para o  $O_2$  para formar, respectivamente o radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou radical hidroxil ( $OH^-$ ) (MITTLER, 2002).

As EROs promovem a oxidação de vários componentes celulares e podem levar à destruição oxidativa de células em um fenômeno denominado estresse oxidativo. São capazes de induzir danos celulares através da degradação de proteínas, inativação de enzimas, alterações em genes e interferirem em rotas metabólicas importantes (DAT et al., 2000; CHOUDHURY et al., 2013). Apesar de seu efeito nocivo às células, as EROs são normalmente produzidas em decorrência do metabolismo celular fotossintético e respiratório (MITTLER, 2002), além disso, plantas utilizam as EROs como moléculas para regular o desenvolvimento e várias respostas fisiológicas como, por exemplo o crescimento, ciclo celular e morte celular programada (KOVTON et al., 2000; PITZSCHKE et al., 2006; VEAL et al., 2007).

As EROs  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  apresentam baixa reatividade em comparação ao  $OH^-$ . Em plantas o  $H_2O_2$  está envolvido no fechamento estomático, crescimento radicular e alongamento de pelos radiculares (FOREMAN et al., 2003; LALOI et al., 2004). A produção de EROs pode aumentar por conta de estresses ambientais que são experimentados por plantas em condições naturais ou agrícolas. Por exemplo, em cana-de-açúcar, a salinidade desencadeou estresse oxidativo como evidenciado por Patade et al. (2011) e Pagariya et al. (2012) através de marcadores de estresse oxidativo representados por enzimas antioxidantes.

#### 2.5.1. Enzimas antioxidantes

É bem fundamentado que o estresse oxidativo é uma importante causa de danos celulares associados com diversos estresses abióticos como o salino (STEPIEN; KLOBUS, 2005; PATADE et al., 2011; PAGARIYA et al., 2012; KAYA et al., 2013). Entretanto, as plantas apresentam estratégias de defesas contra as EROs representadas por enzimas detoxificadoras que incluem dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11). A enzima SOD constitui a primeira linha de defesa contra as EROs, catalisando a reação de dismutação do ânion  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ . Em sequência, as enzimas CAT e APX catalisam a reação de conversão do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . No entanto, o  $H_2O_2$  pode ser prontamente metabolizado por peroxidases situadas no apoplasto (ZÖLLER et al., 2003) e por catalases nos peroxissomos (DEL RIO et al., 2002).

Em condições não estressantes de crescimento, o sistema antioxidante de defesa das células promove adequada detoxificação de radicais livres através de componentes enzimáticos e não enzimáticos (ASADA, 1999). Entretanto, desequilíbrio entre produção e detoxificação de EROs promove o estresse oxidativo. Para que isso não ocorra é preciso que haja equilíbrio coordenado entre a atividade das enzimas SOD, CAT e APX para que não haja desbalanço na formação de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (BOWLER et al., 1991). Este balanço em conjunto com o sequestro de íons metálicos (Fe) é importante para evitar a formação do altamente danoso  $OH^-$  via reação de Fenton ou Haber-Weiss (ASADA; TAKAHASHI, 1987).

#### 2.5.1.1. Dismutase do superóxido

A enzima dismutase do superóxido (SOD) catalisa a reação de dismutação do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Por este fato, constitui a primeira enzima da linha de defesa contra as EROs (POLLE, 2001; ZELKO et al., 2002), influenciando os níveis de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  os quais formam os dois substratos da reação para a formação de  $OH^-$  conforme a reação de Haber-Weiss. Há três modalidades diferentes de SOD ou isoenzimas que são distinguidas pelo seu cofator metálico: Mn, Fe e Cu/Zn (BOWLER et al., 1991). As Mn-SODs estão localizadas nos peroxissomos e mitocôndrias (DEL RIO et al., 2002), enquanto que as Cu/Zn-SODs nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (DEL RIO et al., 2002). As Fe-SODs são encontradas nos cloroplastos (ALSCHER et al., 2002), porém não em todas as plantas (FERREIRA et al., 2002).

O aumento da atividade da SOD em resposta ao estresse salino foi demonstrada em várias espécies como cana-de-açúcar (PATADE et al., 2011; SATBHAI; NAIK, 2014), milho (KHOLLOVA et al., 2010) e em trigo (STEPIEN; KLOBUS, 2005). Em genótipo tolerante ao estresse salino o aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a SOD foi relacionado à diminuição da peroxidação lipídica e proteção contra o estresse oxidativo (SATBHAI; NAIK, 2014).

#### 2.5.1.2. Catalase

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é encontrada nos peroxissomos e catalisa a oxidação do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  (MITTLER et al., 2002) durante a fotorrespiração quando a enzima RUBISCO exerce sua função oxigenase, bem como na  $\beta$  – oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos em tecidos que armazenam lipídios. Há várias isoenzimas da CAT que se expressam em diferentes órgãos das plantas como flores, flor e raízes. Por exemplo, em *Arabidopsis thaliana* há seis isoenzimas diferentes e as mais expressivas são a catalase 1, 2 e 3 codificadas pelos genes *cat1*, *cat2* e *cat3*, respectivamente. A Cat1 é a mais expressiva e está situada nos peroxissomos e é responsável por 80% da atividade desta enzima em plantas. A Cat2 está localizada nos tecidos vasculares e a Cat3 no citosol (FRUGOLI et al., 1996; SCANDALIOS, 1990).

O mecanismo de ação da CAT consiste, provavelmente, em duas etapas onde inicialmente o  $\text{H}_2\text{O}_2$  reage com o Fe do grupo heme da CAT, formando peróxido de ferro e a reação pode, então, seguir dois rumos: caso a concentração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  do meio for alta, o peróxido de ferro reagirá novamente com outra molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formando  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . Por outro lado se a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  for baixa, o peróxido de ferro poderá ser reduzido por doadores de  $\text{H}^+$  como o etanol e ascorbato (PEREIRA, 2008).

#### 2.5.1.3. Peroxidase do ascorbato

A enzima ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) utiliza duas moléculas de ascorbato para oxidar duas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ . O ascorbato é regenerado pelo ciclo glutathiona-ascorbato pela oxidação da glutathiona reduzida e regeneração desta pela glutathiona redutase (NOCTOR; FOYER, 1998). A APX é uma importante enzima para as plantas pelo fato de constituir a segunda linha de frente de detoxificação de EROs, em conjunto com a CAT, podendo ser encontrada nos cloroplastos, mitocôndrias, apoplasto e citosol (MITTLER, 2002). Alguns estudos têm mostrado que sua atividade é alterada por vários estresses abióticos como o salino, como observado em cana-de-açúcar (PATADE et al., 2011; PAGARIYA et al., 2012) e milho (KHOLLOVA et al., 2010).

#### 2.5.2. Peroxidação de lipídios e aldeído malônico

A peroxidação de lipídios pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação das EROs sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, havendo a geração de radical alquila ( $\text{L}^*$ ), alcóxila ( $\text{LO}^*$ ) e peróxila ( $\text{LOO}^*$ ) (BARBER; BERHEIM, 1967; CHANGE et al., 1979). Tal fato leva à destruição da membrana plasmática, falência dos mecanismos de trocas de metabólitos e, em uma condição extrema, a morte celular (BENZIE, 1996).

Basicamente, a peroxidação de lipídios consiste na incorporação de oxigênio molecular em um ácido graxo poliinsaturado (AGPI) para produzir um hidroperóxido lipídico ( $\text{LOOH}$ ) como produto primário inicial. Em sistemas biológicos, a peroxidação

de lipídios pode acontecer em duas vias: uma enzimática envolvendo as enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases e a não enzimática que envolve a participação de EROs e metais de transição (PORTER et al., 1995).

Uma das técnicas utilizadas para avaliar a peroxidação de lipídios é o teste de aldeído malônico (MDA) que é um dialdeído formado como produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão *beta* dos AGPIs peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. O MDA é volátil e possui baixo peso molecular ( $C_3H_4O_2$ , PM=71,07) (LIMA; ABDALLA, 2001). Entretanto, é considerado como um marcador bioquímico de estresse oxidativo (SHULAEV; OLIVER, 2006).

## 2.6. Extravasamento de eletrólitos

A membrana plasmática constitui uma estrutura multifuncional, pois além de oferecer delimitação e proteção mecânica aos constituintes intracelulares, é sítio de inúmeras reações bioquímicas, controla o fluxo de entrada e saída de substâncias, além de participar da sinalização celular (KOOMAN; RÖHM, 2005) e mudanças na permeabilidade das membranas refletem a composição e/ou estrutura dos lipídios e proteínas que as compõem (COLLADO et al., 2010; ZAMANI et al., 2010). Nesse sentido, o perfeito funcionamento das membranas plasmáticas é dependente da manutenção da integridade de suas estruturas bioquímicas, as quais podem ser perturbadas pelo estresse oxidativo decorrente de agentes externos danosos, como a deficiência hídrica, metais pesados, estresse térmico e salino.

Há várias técnicas de estudo da integridade de membranas e uma das mais simples consiste na leitura da condutividade elétrica de solutos extravasados de seções foliares imersas em um volume conhecido de água, antes e após aquecimento (ROLNY et al., 2011). Esta avaliação tem se mostrado útil no estudo do efeito de estresses abióticos sobre as membranas, como, por exemplo, em plantas submetidas ao estresse salino (AYDIN et al., 2012; PARIDA; JHA, 2013). Além disso, a permeabilidade de membranas tem sido considerada como um indicador de tolerância ao estresse salino (MANSOUR, 2013) e deficiência hídrica (BAJJI et al., 2001).

## 2.7. Pigmentos fotossintéticos

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes em plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros órgãos nos vegetais (STREIT et al., 2005). Estes pigmentos fotossintéticos são moléculas constituídas por um anel tetrapirrólico contendo um átomo de magnésio no centro e uma cauda fitol hidrofóbica constituída por 20 carbonos e que ancora a molécula de clorofila aos complexos protéicos embebidos na matriz lipídica das membranas dos tilacóides. Há dois principais tipos de clorofila, as quais se diferenciam pelo radical ligado ao anel II da porfirina, onde na clorofila *a* este radical é o grupamento metila ( $-\text{CH}_3$ ) enquanto que na clorofila *b* este radical é o formila ( $-\text{CHO}$ ). São encontrados de forma organizada nas membranas dos cloroplastos, no entanto, as moléculas dos pigmentos fotossintéticos nas membranas dos tilacóides são estruturadas de forma a otimizar a absorção de luz (MAJEROXWICZ, 2008).

Estes pigmentos ao absorverem os fótons, alteram temporariamente suas configurações eletrônicas, passando do estado basal para um estado excitado, o qual possui maior nível energético. Este nível é instável e de curta duração. Após a absorção dos fótons, estes pigmentos promovem a dissipação do excesso de excitação eletrônica de quatro formas competitivas entre si, através da (i) dissipação fotoquímica (produção de ATP e NADPH utilizado pelo ciclo de Calvin Benson e outras reações bioquímicas como anabolismo da prolina nos cloroplastos), (ii) fluorescência (reemissão na forma de luz), (iii) conversão direta de energia (retorno da clorofila ao seu estado base sem ocorrência de emissão de fótons) e (iv) dissipação não fotoquímica (reemissão em forma de calor) (LAWLOR, 2001; NOBEL, 2009;).

A participação destes pigmentos é decisiva na absorção e conversão da luminosidade em moléculas de ATP e NADPH que serão consumidas pelo ciclo de Calvin e outras reações metabólicas importantes (TAIZ; ZEIGER, 2013). Por este fato, a concentração de clorofilas pode ser utilizada como indicador fiel de estresses em plantas, visto que as folhas constituem o local onde se encontra o maquinário fotossintético de plantas. Além disso, estes pigmentos são fortemente influenciados pela disponibilidade de fatores ambientais reinantes como luz, água e nutrientes

minerais. Isto pode ser observado quando plantas são submetidas a estresse osmótico induzido por sais, onde se observa efeito negativo nas concentrações destes pigmentos fotossintéticos (WAHID; GHAZANFAR, 2006; WILLADINO et al., 2011; KAYA et al., 2013).

Este efeito do estresse salino sobre este pigmento pode se atribuído à degradação ou diminuição da síntese da clorofila coordenada pela enzima clorofilase. Além disso, pode acontecer que o estresse salino reduza a disponibilidade do precursor da clorofila, o ácido 5-aminolevulínico (ALA) (SANTOS, 2004).

## 2.8. Fluorescência da clorofila *a*

A medição da fluorescência da clorofila *a* para examinar o desempenho fotossintético é fato generalizado em estudos fisiológicos e ecofisiológicos. A fluorescência da clorofila *a* pode ser uma poderosa ferramenta para avaliar o desempenho fotossintético, especialmente quando associada a outras técnicas não invasivas de medição como as trocas gasosas (BAKER, 2008).

A luz absorvida pela clorofila associada ao fotossistema II (PSII) pode ser usada para dirigir a etapa fotoquímica da fotossíntese, na qual um elétron é transferido do centro de reação (P680) para o acceptor primário do PSII, a quinona. Alternativamente, a energia absorvida da luminosidade solar pode ser perdida através da fluorescência da clorofila ou calor (BAKER, 2008; MURCHIE; LAWSON, 2013) e estes processos competem entre si, de modo que o aumento de um implica redução do outro, pois do total de luz absorvida pelas plantas, aproximadamente 80% é convertida em processos fotoquímicos da fotossíntese e parte (~18%) é dissipada na forma de calor ou reemitida na forma de fluorescência (1-2%) (BUONASERA et al., 2011).

As mudanças na produção de fluorescência da clorofila *a* são atribuídas ao estado redox do acceptor primário do PSII, a quinona A ( $Q_A$ ) (BUTLER, 1978) é uns dos principais parâmetros fotoquímicos estudados são a fluorescência inicial ( $F_0$ ), que é a fluorescência quando todos os centros de reações estão abertos ou oxidados, fluorescência máxima ( $F_m$ ), quando todos os centros de reações estão

fechados ou reduzidos e rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm) (BAKER, 2008; MURCHIE; LAWSON, 2013). Desta maneira, a fluorescência da clorofila *a* é considerada mínima quando a  $Q_A$  está oxidada; e máxima, quando a  $Q_A$  está reduzida. A técnica de estudo da fluorescência da clorofila *a* mostra-se bastante importante no estudo do impacto dos estresses abiótico em plantas, pois sob condições de estresse salino, várias plantas apresentaram variações nos parâmetros fotoquímicos, como foi evidenciado em cana-de-açúcar (WILLADINO et al., 2011; CHA-UM, et al., 2013).

## 2.9. Metabólitos secundários em plantas

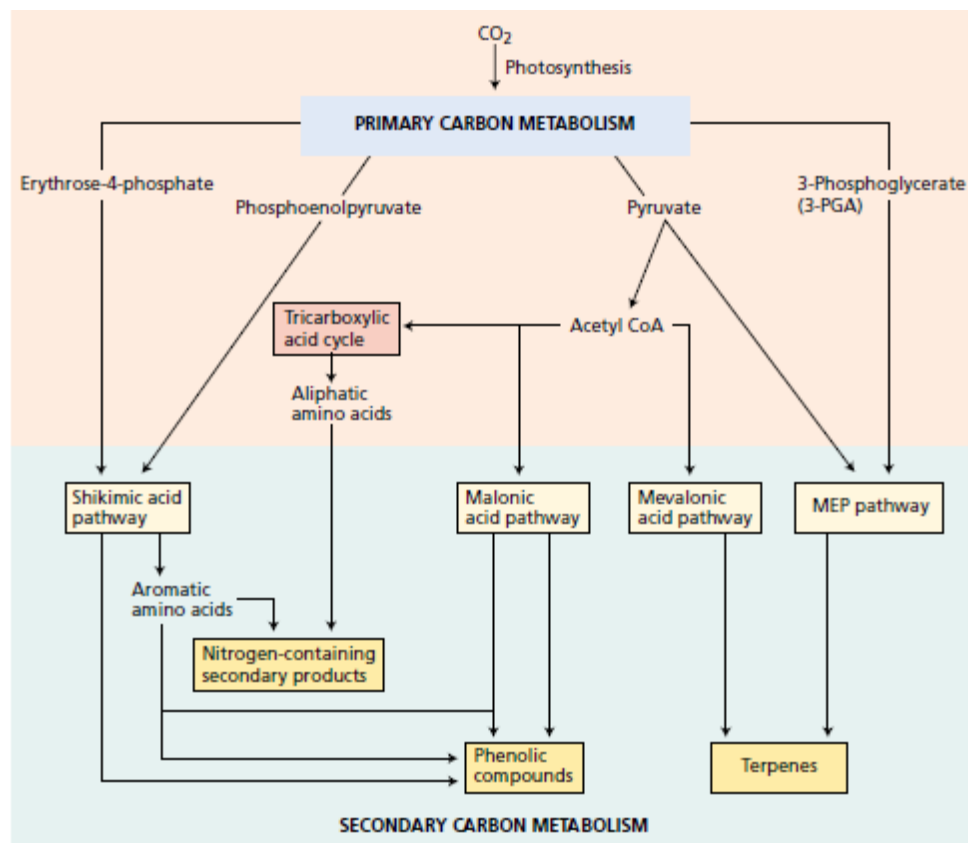
Plantas produzem um vasto e diverso número de compostos orgânicos, onde a grande maioria não parece participar diretamente no crescimento e desenvolvimento vegetal. Essas substâncias tradicionalmente referidas como metabólitos secundários também são diferencialmente distribuídas entre limitados grupos taxonômicos do reino vegetal (CROTEAU et al., 2000). Os compostos ou metabólitos secundários constituem um grande grupo que serve para uma ampla variedade de propósitos, incluindo defesa e atração de polinizadores.

As três principais categorias de compostos químicos secundários são os fenóis, alcalóides e terpenos. Os fenóis incluem uma grande diversidade de compostos químicos constituídos de um anel aromático ligado a um grupo hidroxila (-OH). Em plantas os compostos fenólicos mais importantes sejam os taninos que reduzem a digestibilidade dos tecidos vegetais. Outro grupo de compostos fenólicos é o da lignina, que impregnam as paredes celulares secundárias, conferindo-lhes resistência estrutural, bem como barreira mecânica contra o ataque de herbívoros e patógenos (GUREVITCH et al., 2009).

Os alcalóides pertencem a outro grupo amplo de compostos e que apresentam propriedades de interesse farmacêutico. São moléculas pequenas que contêm nitrogênio, com sabor amargo e mostrando-se bastante tóxica para herbívoros. Estes compostos são, em geral, altamente específicos, ocorrendo em pequeno número de plantas, como é o exemplo das substâncias, cocaína, morfina e cafeína (TAIZ; ZEIGER, 2002).

Os terpenos são formados por múltiplas unidades do hidrocarboneto isopreno ( $C_5H_8$ ), podendo ser grandes ou pequenas, dependendo do número de unidades de isoprenos que contem. São encontrados em todas as plantas e um mesmo individuo poder conter diversos tipos de terpenos.

A rota de biossíntese dos três principais grupos de metabólitos secundários é apresentada no esquema abaixo.



Esquema 3. Visão simplificada das rotas de biossíntese de metabólitos secundários em plantas e de suas inter-relações com o metabolismo primário (TAIZ; ZEIGER, 2002).

A biossíntese de terpenos ocorre a partir de metabólitos primários em duas vias: a rota do ácido mevalônico onde três moléculas de acetyl-CoA são unidas para formar o ácido mevalônico e pela rota do metileritritol fosfato (MEP) que opera nos cloroplastos e outros plastídios. A biossíntese de compostos fenólicos envolve duas rotas representadas pela do ácido chiquímico e malônico e a dos alcaloides ocorre a

partir de aminoácidos, em particular a lisina, tirosina e triptofano, podendo alguns alcaloides derivar da rota dos terpenos.

### 3. REFERÊNCIAS

AYDIN, A.; KANT, C.; TURAN, M. Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. **African Journal of Agricultural Research**, Nigéria, v. 7, n. 7, p. 1073-1088, 2012.

ALEXIEVA, V.; IVANOV, S.; SERGIEV, I.; KARANOV, E. Interaction between stress. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Varna, v. 29, n. 3-4, p.1-17, 2003.

ALFONSI, R. R.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; BRUNINNI, O.; BARBIERI, V. Condições climáticas para cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S. B.(Coord.). **Cana-de-açúcar**. Fundação Cargill, Campinas, 1987, v. 1, p. 42-55.

ALMEIDA, C. M. A.; SILVA, T. D.; MALAFAIA, C. B.; AMARAL, D. O. J.; ARRUDA, I. R. S.; BRITO, G. G.; DONATO, V. M. T. S.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Proteomic and physiological analysis of response to water deficit in sugarcane. **Wudpecker Journal of Agricultural Research**, Pakistan, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2013.

ALSCHER, R. G.; ERTURK N.; HEALTH, L. S. Role of superoxid dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In: KYLE, D. J.; OSMOND, C. B.; ARNTZEN, C. J. (Ed.) **Photoinhibition**. Elsevier, Amsterdam, p. 227-287, 1987.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental of Experimental Botany**, Elmsford, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, Netherlands, v. 166, p. 3-16, 2004.

AYERS, R.S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. 2ª Ed. Campina Grande: UEPB. 1999. 153p. Estudos da FAO Irrigação e Drenagem, 29.

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89-113, 2008.

BAJJI, M.; KINET, J. M.; LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerant test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 36, n. 1, p. 61-70, 2002.

BALLANTYNE, J. S.; CHAMBERLIN, M. E. Regulation of cellular amino acid levels. In: STRANGE, K. (Org.). **Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.111-122.

BARBER, A. A., BERNHEIM, F. Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. In: STRELHER, B. L. (Ed.) **Advances in Gerontology Research**, New York: Academic Press, 1967, v. 2, p. 355-403.

BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Science Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 233-261, 1996.

BERGONCI, J. I.; BERGAMASCHI, H.; BERLATO, M. A.; SANTOS, A. O. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 8, p. 1531-1540, 2000.

BOWLER, C.; SLOOTEN, L.; VANDENBRANDEN, S.; RYCKE, R. R.; BOTTERMAN, J.; SYBESMA, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ D. Manganese superoxide dismutase

can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 10, n. 7, p. 1723-1732, 1991.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Response to abiotic stress. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. United States of America: American Society of Plant Physiologist, 2000. cap. 22, p. 1158-1203.

BUONASERA, K.; LAMBREVA, M.; REA, G.; TOULOUPAKIS, E.; GIARDI, M. T. Technological applications of chlorophyll *a* for the assessment of environmental pollutants. **Analytical and bioanalytical Chemistry**, Heidelberg v. 401, n. 4, p. 1139-1151, 2011.

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

CAIRO, P. A. R. **Curso básico de relações hídricas de plantas**. Vitória da Conquista: UESB, 1995. 32 p.

CARILLO, P.; MASTROLONARDO, G.; NACCA, F.; PARISI, D.; VERLOTTA, A.; FUGGI, A. Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. **Functional Plant Biology**, Clayton South, v. 35, n. 5, p. 412-426, 2008.

CHANGE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHA-UM, S.; CHUENCHAROEN, S.; MONGKOLSIRIWATANA, C.; ASHRAF, M.; KIRDMANEE, C. Screening sugarcane (*Saccharum* spp.) genotypes for salt tolerance using multivariate cluster analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 1, p. 23-33, 2012.

CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. **Plant, Cell & Environmental**, Weinheim, v. 34, n. 1, p. 1-20, 2011.

CHOUDHURY, S.; PANDA, P.; SAHOO, L.; PANDA, S. K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 8, n. 4, e.23681, 2013. Disponível em <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/psb.23681>> Acesso em: 02/12/2014.

COLLADO, M.; ARTURE, M.; AULICINO, M.; MOLINA, M. Identification of salt tolerance in seedlings of maize (*Zea mays* L.) with the cell membrane stability trait. **International Research Journal of Plant Science**, v. 5, p. 126-132, 2010.

COPERSUCAR. COOPERATIVA DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **5ª geração de variedades**. Piracicaba, 1995. p. 16-23 (Boletim Técnico).

CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a system biology perspective. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 163, p. 1-14.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, G. N. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. United States of America: American Society of Plant Physiologist, 2000. cap. 22, p. 1158-1203.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In.: HEINZ, D. J. (Ed.) **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7-84.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVÁ, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 57, n. 5, p.779-795, 2000.

DEL RIO, L. A.; CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; PALMA, J. M.; GÓMEZ, M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1255-1272, 2002.

EGESKOG, A.; FREITAS, F.; BERNDES, G.; SPOROVEK, G.; WIRSENIUS, S. Greenhouse gas balance and land use changes associated with the planned expansion (to 2020) of the sugarcane ethanol industry in Sao Paulo, Brazil. **Biomass and Bioenergy**, Netherlands, v. 63, p. 280-290, 2014.

FERREIRA, R. R.; FORNAZIER, R. F.; VITÓRIA, A. P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Changes in antioxidant enzyme in soybean Under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 327-342, 2002.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of United Nations, Statistic Division, 2012. Disponível em: <[http://faostat3.fao.org/browse/Q/\\*/E](http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E)>. Acesso em: 10/12/ 2014

FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J. H. F.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M. A.; LINSTED, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONES, J. D. G.; DAVIES, J. M.; DOLAN L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulated plant cell growth. **Nature**, v. 422, p. 442-446, 2008.

FRANCOISE, L. E.; MAAS, E. V. Crop response and management on salt affected soils. In: PESSARAKLI, M. (Ed.). **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker Press Inc., 1999. p. 169-201.

FRUGOLI, J. A.; ZHONG, H. H.; NUCCIO M. L.; McCOURT, P. Mc PEEK, M. A.; THOMAS, T. L.; McCLUNG, C. L. Catalase 1s Encoded by a Multigene Family in *Arabidops thaliana* Heynh. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 112, n. 2, p. 327-336, 1996.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles osmolytes accumulation during stress. **Plant, Cell & Environment**, Weinheim, v. 21, n. 6, p. 535-553, 1998.

HE, C.; ZHANG, W.; GAO, Q.; YANG, A.; HU, X.; ZHANG, J. Enhancement of drought resistance and biomass by increasing the amount of glycine betaine in wheat seedlings. **Euphytica**, Netherlands, v.177, n. 2, p.151-167, 2011

HU, C. A.; DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5- carboxylate synthetase) catalyses the first two steps in proline biosynthesis in

plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, Washington, v. 89, n. 19, p. 9354-9358, 1992.

KATERJI, N.; HALLAIRE, M. Les grandeurs de référence utilisables dans l'étude de l'alimentation en eau des cultures. **Agronomie**, Paris, v. 4, n. 10, p. 999-1008, 1984.

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRILAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N.. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, Bengaluru, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

KAYA, C.; SÖNMEZ, O.; AYDEMİR, S.; DİKİLİTAŞ. Mitigation effects of glycinebetaine on oxidative stress and some key growth parameters of maize exposed to salt stress. **Turkish Journal of Agricultural and Forestry**, Ankara, v. 37, p. 188-194, 2013.

KHOLOVA, J.; SAIRAM, R. K.; MEENA, R. C. Osmolytes and metal ions accumulation, oxidative stress and antioxidant enzymes activity as determinants of salinity stress tolerance in maize genotypes. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 32, p. 477-486, 2010.

KOOLMAN, J.; RÖHM, K. H. **Bioquímica: texto e atlas**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 216.

LALOI, C., APEL, K., AND DANON, A. Reactive oxygen signalling: the latest news. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 3, p. 323-328, 2004.

LAWLOR, D. W, CORNIC, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, Weinheim, v. 25, n. 2, p. 275-294, 2002.

LAWLOR, D. W. **Photosynthesis**. Third edition. New York: springer-Verlag, 2001. p. 79-115.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.37, n. 3, p. 294-303, 2001.

MAHAJAN, S. T.; NAIK, R. M.; DALVI, U. S.; Assessment of biochemical markers in differentiating sugarcane genotypes for salt tolerance. **Sugar Tech**, Índia, v. 15, n. 2, p. 116-121, 2013.

MAJEROWICZ, N. Fotossíntese. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap.5, p. 82-133.

MAJUMDER, A. L.; SENGUPTA, S.; GOSWANI, L. Osmolyte Regulation in abiotic stress. In: PAREEK, A.; SOPORY, H. J.; BOHNERT, H. J.; GOVINDJEE (Eds). **Abiotic stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation**. Springer Science, 2010. cap. 16, p.349-370.

MANSOUR, M. M. F. The plasma membrane transport systems and adaptation to salinity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 171, n. 18, p. 1787-1800, 2014.

MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA JR, G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58; n. 2; p. 295-301, 2001.

MEDEIROS, C. D.; FERREIRA NETO, J. R. C.; OLIVEIRA, M. T.; RIVAS, R.; PANDOLFI, V.; KIDO, E. A.; BALDANI, J. I.; SANTOS, M. G. Photosynthesis, antioxidant activities and transcriptional responses in two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars under salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 36, n. 2, p. 447-459, 2014.

MERAH O. Potential importance of water status traits for durum wheat improvement under Mediterranean conditions. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 137, n. 2, p. 139-145, 2001.

MILANEZ, A. Y.; NYKO, D.; VALENTE, M. S.; XAVIER, C. E. O.; KULAY, L. A.; DONKE, C. G.; MATSUURA, M. L. S. F.; RAMOS, N.P.; MORANDI, M. A. B.; BONOMI, A.; CAPITANI, D. H. D.; CHAGAS, M. F.; CAVALETT, O.; de GOUVÉIA, V.

L. A produção de etanol pela integração do milho-safrinha às usinas de cana-de-açúcar: avaliação ambiental, econômica e sugestões de política. **Revista do BNDES**, v. 41, junho, 2014. Disponível em: [https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/2496/1/RB%2041%20A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20etanol\\_P.pdf](https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/2496/1/RB%2041%20A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20etanol_P.pdf). Acesso em: 28/01/2015.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, Netherlands, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MOZAMBANI, A. E.; PINTO, A. S.; SEGATO, S. V.; MATTIUZ C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; de NÓBREGA, J. C. M. (ed.). **Atualização em produção de Cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. p.11-18.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review and Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 651-681, 2008.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, Lancaster, v. 167, n. 645-663, 2005.

NOBEL, P. S. **Physicochemical and environmental Plant physiology**. Oxford: Academic Press, 2009. p. 229-275.

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

PAGARIYA, M. C.; DEVARUMATH, R. M.; KAWAR, P. G. Biochemical characterization and identification of differentially expressed candidate genes in salt stressed sugarcane. **Plant Science**, Netherlands, v. 184, p. 1-13, 2012.

PATADE, V. Y.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 55, n. 3, p. 169-173, 2008.

PARIDA, A. K.; JHA, B. Inductive responses of some organic metabolites for osmotic homeostasis in peanut (*Arachis hypogae* L.) seedlings during salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 35, p. 2821-2832, 2013.

PEREIRA, F. J. **Caracterização das modificações morfo-anatômicas e bioquímicas, em ciclos de seleção de milho saracura, para tolerância ao encharcamento do solo**. 2008. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

PITZSCHKE, A.; FORZANI, C.; HIRT, H. Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, 2006.

PORTER, N. A., CALDWELL, S. E., MILLS, K. A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v. 30, n. 4, p. 277-290, 1995.

PRADO JUNIOR, J. P. Q. **Bactérias endofíticas em cana-de-açúcar: crescimento em ambientes com altas concentrações de Cd, Cr, Ni e Pb “in situ” e “in vivo”**. 2012. 63p. Tese (Doutorado em Ciências. Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

PREMACHANDRA, G. S.; SANEOKA, H.; FUJITA, K.; OGATA, S. Osmotic adjustment and stomatal response to water deficits in maize. **Journal Of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 11, p. 1451-1456, 1992.

RENGASAMY P. Soil processes affecting crop production in salt-affected soils. **Functional Plant Biology**, v. 37, n. 7, p. 613-620, 2010.

RHODES, D.; HANSON, A. D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 357-384, 1993.

RIBEIRO, M. S.; NETTO, A. T.; COUTO, T. R.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, F. A. M. M. A.; NOGUEIRA, R. J. M.; GLENN, D. M.; CAMPOSTRINI, E. Partial rootzone drying in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): effects on gas exchange, growth

and water use efficiency. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 26, n. 3-4, p. 251-262, 2014.

ROY, S. J.; NEGRÃO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 115-124, 2014.

ROLNY, N.; COSTA, L.; CARRIÓN, C.; GUIAMET, J. J. Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence? **Plant Physiology and Biochemistry**, Netherlands, v. 49, p. 1220-1227, 2011.

RUDORFF, B. F. T.; AGUIAR, D. A.; SILVA, W. F.; SUGAWARA, L. M.; ADAMI, M.; MOREIRA, M. A. Studies on the rapid expansion of sugarcane for ethanol production in São Paulo State (Brazil) using Landsat Data. **Remote Sensing**, Basel, v. 2, n. 4, p. 1057-1076, 2010.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. Fisiologia do estresse. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). **Fisiologia das plantas**. São Paulo: Cengage Learning, 2012. p. 616-651.

SANTOS, C. V. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 103, p. 93-99, 2004.

SATBHAI, R. D.; NAIK, R. M. Osmolytes accumulation, cell Membrane integrity, and antioxidant enzymes in sugarcane varieties differing in salinity tolerance. **Sugar Tech**, Índia, v. 16, n. 1, p. 30-35.

SAVOURÉ, A.; JAOUA, S.; ARDILES W.; VAN MONTAGU, M.; VERBRUGGEN, N. Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**. v. 372, n. 1, p. 13-19, 1995.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases, **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 101, n. 1, p. 7-12, 1993.

SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; ÓBREGA, J. C.

M.(Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: cap. 2, 2006. 415p.

SGHERRI, C.; STEVANOVIC, B.; NAVARI-IZZO, F. Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 122, p. 478-88, 2004.

SHULAEV, V.; OLIVER, D. J. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. new tools for reactive oxygen species research. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 141, n. 2, p. 367-372, 2006.

SOUZA, Z. M.; PAIXÃO, A. C. S.; PRADO, R. M.; CESARINI, L. G.; SOUZA, S. R. Manejo de palhada de cana colhida sem queima, produtividade do canavial e qualidade de caldo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1062-1068, 2005.

STEPIEN, P.; KLOBUS, G. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 125, n. 1, p. 31-40, 2005.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; do CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H.; As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, Santa Maria, 2005.

SZABADOS, L. SAVOURÉ, A. proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plants Science**, Netherlands, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. In: \_\_\_\_\_ **Respostas e adaptações ao estresse abiótico**. Porto Alegre: Artmed, 2013, cap.26, p. 753-780.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. In: \_\_\_\_\_ **Secondary metabolites and plant defenses**. Sunderland: Sinauer Association, 2002, cap. 13, p. 283-308.

VAN RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC, 1997. 285 p. (Boletim técnico, 100).

VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and Signaling. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 26, n. 13, 2007.

WAHID, A.; GHAZANFAR, A. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 7, p. 723-730, 2006.

WAKEEL, A. Potassium-sodium interactions in soil and plant under saline-sodic conditions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, n. 3, p. 344-354, 2013.

WESTGATE, M. E. Water status and development of the maize endosperm and embryo during drought. **Crop Science**, Madison, v. 34, n. 1, p. 76-83, 1994.

WILLADINO, L.; FILHO, R. A. O.; JUNIOR, E. A. S.; NETO, A. G.; CAMARA, T. R. Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidantes e fluorescência da clorofila. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 417-422, 2011.

ZAMANI, S.; BYBORDI, A.; KHORSHIDI, S.; NEZAMI, T. Effects of NaCl salinity levels on lipids and proteins of canola (*Brassica napus* L.) cultivars. – **Advances in Environment Biology**, Jordan, v. 4, p. 397-403, 2010.

ZHAO, J.; W. REN, D. ZHI, L. WANG; G. XIA. Arabidopsis DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall rescue increased tolerance to drought stress. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 26, n. 9, p. 1521-1528, 2007.

ZÖLLER, T.; SKRØPPA, T.; JOHNSEN, Ø.; POLLE, A. Apoplastic Peroxidases in Needles of Norway Spruce (*Picea abies*) Progenies from Different Crossing Environments. **Forstwissenschaftliches Centralblatt**, Oxford, v. 122, p. 153-159, 2003.

GUREVITCH, J.; SCHEINER, S. M.; FOX, G. A. Herbivoria e interações planta-patógeno. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). Ecologia Vegetal. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 257-281.

## Capítulo 2 – Enzimas antioxidantes e osmólitos compatíveis revelam resposta diferencial de cultivar de cana-de-açúcar ao estresse salino

**RESUMO** - Nos últimos anos a cana-de-açúcar tem recebido maior atenção por ser fonte de matéria-prima para a produção de álcool, um biocombustível de baixo impacto ambiental. Entretanto, pelo fato desta cultura ser considerada como uma glicófito moderadamente tolerante ao estresse salino, a presença de excesso de sais solúveis no solo pode limitar seu crescimento. Duas cultivares de cana-de-açúcar foram avaliadas aos 15 e 30 dias após a adição de quatro concentrações de NaCl em vasos plásticos contendo solo como substrato. Os resultados evidenciaram que a concentração foliar de sódio aumentou proporcionalmente à concentração salina do solo, em particular na cv. SP81-3250, não evidenciando grandes alterações no teor de foliar de potássio. O impacto do estresse salino sobre o potencial de água de antemanhã foi mais perceptível nas concentrações de 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de Na, havendo maior redução do conteúdo relativo de água no 30º dia de avaliação e na cv. SP81-3250. Houve redução da concentração de pigmentos fotossintéticos, porém, a diminuição da concentração de clorofila *a* e *b* foi similar, mas em maior intensidade da cultivar SP81-3250. O NaCl promoveu aumento na atividade antioxidante das enzimas dismutase do superóxido, peroxidase do ascorbato e catalase, bem como na concentração de prolina e glicina betaína. O aumento da atividade das enzimas antioxidantes e da concentração de osmólitos compatíveis pode ter contribuído para reduzir o impacto do estresse oxidativo, evidenciado pela diminuição da peroxidação lipídica e melhor resposta na eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm), sobretudo, na cv. IAC87-3396 em comparação com a cv. SP81-3396. Este estudo revelou que o simultâneo aumento da atividade enzimática antioxidante e da concentração de osmólitos compatíveis avaliados mostra-se como uma eficiente estratégia de mitigação do estresse oxidativo e melhoria da Fv/Fm na cv. IAC87-3396.

**Palavras-chave:** Sódio, radicais livres, glicina betaína, prolina,

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar figura como a maior produtora de açúcar nos trópicos e subtropicais, além de ser matéria-prima para a produção de etanol, fonte renovável de energia cuja produção tem sido estimulada com o objetivo de diversificar a matriz energética, mitigar as mudanças climáticas globais e garantir a segurança energética (WALTER et al., 2014). O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com a produção brasileira concentrada na região Centro-Sul e Nordeste, em particular no Estado de São Paulo (RUDORFF et al., 2010; FAOSTAT, 2012; EGESKOG et al., 2014). Com ampla expansão da área de cultivo, a produção de cana-de-açúcar para a safra atual é estimada em 594,1 milhões de toneladas (CONAB, 2014). Entretanto, apesar da cana-de-açúcar ser uma cultura que tem sido categorizada como glicófita e moderadamente sensível ao estresse salino (FRANCOISE; MAAS, 1999; PATADE et al., 2008), ela mostra diferenças genotípicas no seu nível de sensibilidade à salinidade (WAHID et al., 1997).

O estresse salino representa o maior fator que contribui para o decréscimo da produção de diferentes culturas glicófitas (TESTER; DAVENPORT, 2003) e afeta mais de 800 milhões de hectares de terras no mundo (MUNNS; TESTER, 2008). No Brasil, aproximadamente 30% das áreas irrigadas no Nordeste são afetadas pela salinização do solo (AGUIAR NETO et al., 2007). Solos afetados por salinidade são ricos em uma variedade de sais que são facilmente dissolvidos em água, com a disponibilização de íons tóxicos como o sódio ( $\text{Na}^+$ ) os quais são absorvidos pelas raízes e transportados via xilema à parte aérea, afetando negativamente o crescimento e desenvolvimento de plantas, antes de conduzi-las à morte (TESTER; DAVENPORT, 2003; DAVENPORT et al., 2005; MUNNS et al., 2006).

O estresse salino é um fenômeno complexo que envolve mudanças na morfologia e desenvolvimento dos vegetais, bem como em processos bioquímicos e fisiológicos (KAHLAOU et al., 2014). Dois componentes têm sido identificados como prováveis causas de desordens fisiológicas induzidas por sais, o estresse osmótico e a toxicidade do íon Na, que induz respostas multigênicas em que os mecanismos de tolerância são alterados nos níveis de expressão de vários solutos compatíveis e

espécies reativas de oxigênio (EROs) (MUNNS; TESTER, 2008). O acúmulo de sais em plantas glicófitas acelera um conjunto chave de parâmetros fisiológicos através da desordem iônica, redução da biomassa (AKHTAR et al., 2003) e limitação do metabolismo fotossintético (CHA-UM et al., 2012). A salinidade altera o processo fotossintético, modifica a homeostase celular e possibilita maior estresse oxidativo (KATSUHARA et al., 2005; KOCA et al., 2007), o que conduz à desordem da homeostase celular e, em último caso, à morte celular (MITTLER, 2002; MILLER et al., 2010; SHARMA et al., 2012).

Com o intuito de manter os níveis de EROs em níveis que não causem danos celulares, as plantas adotam a estratégia que consiste em um eficiente sistema de defesa, onde as EROs são detoxificadas por enzimas antioxidantes e defesas não enzimáticas que evitam o estresse oxidativo (MILLER et al., 2010; RIVAS et al., 2013). Os sistemas de defesas antioxidantes compreendem enzimas como a dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) a qual dismuta o  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e este pode ser detoxificado pela peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e/ou catalase (CAT, EC 1.11.1.6), bem como antioxidantes não enzimáticos como prolina e glicina betaína (MITTLER, 2002; SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; MILLER et al., 2010; EL-BELTAGI; MOHAMED, 2013).

A adaptação de plantas ao estresse salino requer uma homeostase celular iônica envolvendo a absorção de  $Na^+$  e  $Cl^-$  e subsequente compartimentalização celular sem acúmulo de íons tóxicos no citosol (DATTA et al., 2009). Este mecanismo inclui o ajuste osmótico que é acompanhado de acúmulo de solutos compatíveis como prolina e glicina betaína (GHOULAM et al., 2001; ASHRAF; FOOLAD, 2005). Várias funções são propostas para o acúmulo de prolina as quais incluem o ajuste osmótico, a estabilização de membranas, proteção à atividade fotossintética e neutralização das EROs (KAVI KISHOR et al., 2005). No entanto, o significado da prolina em ajuste osmótico é controverso e variado entre as espécies (RHODES; HANSON, 1993; LUTTS et al., 1996).

Glicina betaína, um quaternário de amônio é considerado soluto compatível por agir na estabilização da estrutura de proteínas, na atividade de enzimas e nos complexos protéicos, além de manter a integridade de membranas contra danos decorrentes do estresse osmótico (QUAN et al., 2004; ASHRAF; FOOLAD, 2005) e

seu papel no ajuste osmótico é inequívoco (YEO, 1998). Em plantas submetidas a estresses ambientais, alguns estudos têm evidenciado acúmulo destes osmólitos compatíveis em conjunto com o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, com efeito positivo sobre o metabolismo fotossintético (CHEN; MURATA, 2011; AHMAD et al., 2013). O envolvimento de enzimas antioxidantes na proteção celular contra o estresse oxidativo e acúmulo de osmólitos compatíveis na defesa da integridade de membranas e atividade enzimática foram evidenciados em cana-de-açúcar (SATBHAI; NAIK, 2014), o que sugere uma ação conjunta destes componentes bioquímicos na melhoria das respostas fisiológicas de cana-de-açúcar frente ao estresse salino.

Com a demanda crescente por fontes de energias renováveis a cana-de-açúcar figura como uma das principais culturas de interesse energético pelo fato de produzir a matéria prima para a produção de álcool. Entretanto, a expansão do cultivo desta cultura em áreas com solos que apresentam algum nível salinização resultante de irrigação com água rica sais ou drenagem insuficiente são fatores potencialmente limitantes ao crescimento da cana-de-açúcar.

O objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros fisiológicos e bioquímicos em duas cultivares de cana-de-açúcar visando verificar se o aumento da atividade de enzimas antioxidantes e da concentração foliar de prolina e glicina betaína atenuam o estresse salino promovido por níveis crescentes de NaCl aplicados no solo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal, condições de crescimento, salinização do solo e tratamentos**

O presente estudo foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal, São Paulo, Brasil em condições de casa de vegetação com temperatura e umidade relativa média de  $30,2 \pm 1$  °C e  $40,7 \pm 1\%$ , respectivamente, entre os meses de fevereiro a abril de 2013. Neste estudo foram utilizadas as cultivares de cana-de-açúcar SP81-3250 e IAC87-3396. A cv. SP81-3250 caracteriza-se por ser produtiva, de maturação no inverno, média exigência em fertilidade do solo, responsiva nos ambientes de

produção B e C, boa resposta aos maturadores, ampla adaptabilidade, ótima brotação de soqueira, alto teor de fibra e sacarose (COPERSUCAR, 1995) enquanto que a cv. IAC87-3396 mostra-se produtiva, com excelente brotação de soca com palha, precoce, rústica e com boa adaptabilidade à ampla gama de ambientes (PRADO JÚNIOR, 2012). Mini-toletes de aproximadamente 10 cm de comprimento das cultivares de cana-de-açúcar SP81-3250 e IAC87-3396 foram plantados em areia estéril e irrigados com água deionizada por 15 dias. Após esse período, as plântulas de cana-de-açúcar foram transplantadas para vasos de 8 dm<sup>3</sup> contendo solo coletado de um Latassolo Vermelho Distrófico na profundidade de 0-20 cm, retirado de área localizada na Fazenda Experimental da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, com a seguinte caracterização química: pH de 5,7; 10 mg dm<sup>-3</sup> de matéria orgânica; 0,1 mg kg<sup>-1</sup> de Na; 26 mg dm<sup>-3</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 1,6 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de K<sub>2</sub>O; 34 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Ca; 21 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> Mg; 12 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de H + Al; 341 g kg<sup>-1</sup> de argila; 28 g kg<sup>-1</sup> de silte; 310 g kg<sup>-1</sup> de areia fina; 321 g kg<sup>-1</sup> de areia grossa; classe textural média e densidade de 1,24 kg dm<sup>-3</sup>.

A salinização do solo foi realizada conforme método proposto por Raji et al. (2001). Para tanto foi realizado um teste preliminar que consistiu na salinização de 0,1 dm<sup>3</sup> de solo com 30 mL das soluções salinas nas concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg NaCl dm<sup>-3</sup> solo, utilizando-se NaCl como fonte salina (Sigma-Aldrich). Após 24 h de secagem das amostras sob ambiente de casa de vegetação, as amostras foram peneiradas (malha de 2 mm) e uma fração de 10 cm<sup>3</sup> foi coletada a qual foi adicionado 50 mL de água deionizada na proporção 1:5 (solo:água). Após agitação por 15 min, seguido de decantação, o sobrenadante foi filtrado e mensurada a condutividade elétrica do extrato do solo em 0,074, 0,264, 0,462, 0,816 dS m<sup>-1</sup>, respectivamente para 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl, conforme curva de calibração, a qual relacionou a concentração de NaCl no solo e sua respectiva condutividade elétrica:  $CE \text{ (dS m}^{-1}\text{)} = 0,1848[\text{NaCl}] - 0,1047 \quad R^2 = 0,9989$ . A adubação do solo foi realizada em três parcelas em intervalos de 10 dias fornecendo-se 1,18 g vaso<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,40 g vaso<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (primeira parcela) e 1,77 g vaso<sup>-1</sup> de uréia e 1,42 g vaso<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (segunda e terceira parcelas). A aplicação das soluções salinas foi realizada quando as plantas jovens de cana-de-açúcar apresentaram 45 dias de vida. As avaliações foram feitas no 15º

e 30° dia após a aplicação dos tratamentos salinos (plantas com 60 e 75 dias de vida, respectivamente).

## 2.2. Teores foliares de sódio e potássio

Os teores de sódio (Na) e potássio (K) foram obtidos a partir da massa da matéria seca foliar (folha +3) de plantas de cana-de-açúcar, empregando-se a metodologia proposta por Carmo et al. (2000).

## 2.3. Potencial de água no antemanhã e conteúdo relativo de água

O potencial de água no antemanhã ( $\psi_{w_{am}}$ ) foi determinado entre 3:30 e 4:30 h segundo Scholander (1956), utilizando-se câmara de pressão modelo m670 (Pms Instrument Co., Albany, USA). O conteúdo relativo de água (CRA) foi determinado a partir de dez discos foliares de 1 cm de diâmetro. Inicialmente os discos foram pesados obtendo-se a massa fresca (MF). A seguir, os discos foram imersos em placas de Petri contendo água deionizada por 24 h a 20 °C em ausência de luminosidade. Após esse período, os discos foram novamente pesados, obtendo-se a massa turgida (MT). Finalmente, os discos foram secos em estufas de ventilação forçada a 65 °C por 48 h e pesados novamente, obtendo-se a massa seca (MS). O CRA foi obtido segundo a fórmula  $CRA = (MF-MS)/(MT-MS)$  e a unidade expressa em % (SLAVICK, 1979). Ambas as avaliações da condição hídrica foram realizadas na folha +1.

## 2.4. Prolina

A concentração de prolina livre foi determinada conforme método de Bates et al. (1973) e descrito por Guzel e Terzi (2013). Amostras de 0,5 g tecido foliar seco (folha +2) triturado foram homogeneizados em 5 mL de água deionizada e incubados em banho-maria (Modelo TBN 12/100) a 100 °C por 30 min, seguido de centrifugação a 10000 x g por 10 min (centrífuga modelo Beckman Avanti J-25). A 1 mL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de ácido acético glacial (P.A.) e 1 mL de

ninhidrina ácida. Após aquecimento em banho-maria a 100 °C por 1 h, a reação foi interrompida em banho de gelo. O cromóforo formado foi extraído com 3 mL de tolueno e os tubos de ensaio contendo o cromóforo e tolueno foram mantidos no escuro. A seguir, a absorbância da camada orgânica superior foi lida em espectrofotômetro a 520 nm (modelo Beckman DU 640, USA). A concentração de prolina foi estimada tomando como referência uma curva-padrão de L-prolina (Sigma-Aldrich) e expressa  $\mu\text{mol prolina g}^{-1} \text{ MS}$ .

## 2.5. Glicina betaína

A concentração foliar de glicina betaína foi determinada conforme Grieve e Grattan (1983) com algumas modificações. Amostras de 0,5 g de tecido foliar seco (folha +2) triturado foram homogeneizados em 2 mL de água deionizada e mantidas sob agitação constante por 24 h a 25 °C. Após centrifugação a 3500 x g por 10 min a 25 °C (centrífuga modelo Beckman Avanti J-25), uma alíquota de 250  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi misturada com igual volume de 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e incubada em banho de gelo por 1 h. A seguir, 200  $\mu\text{L}$  de iodeto de potássio foi adicionado e, após agitação vigorosa, foram mantidas em overnight por 16 h a 0 °C. A seguir, foram centrifugadas a 3500 x g por 15 min a 0 °C e o sobrenadante foi descartado. Os cristais de periodato foram lavados duas vezes com 2 mL de 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelado (8 °C). As amostras foram centrifugadas a 3500 x g por 5 min a 0 °C e o sobrenadante foi descartado. Os cristais de periodato foram dissolvidos com 3 mL de 1,2-dicloroetano (0 °C) e as absorbâncias lidas 365 nm em espectrofotômetro (modelo Beckman DU 640, USA). O conteúdo de GB foi determinado através de uma curva padrão usando GB (Sigma-Aldrich) como padrão e os resultados expressos em  $\mu\text{mol de GB g}^{-1} \text{ MS}$ .

## 2.6. Extração enzimática e determinação de proteínas

Amostras foliares (folha +2) de 0,5 g foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e homogeneizadas com 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 2 mM de EDTA, 5 mM de 2-mercaptoetanol e 20% de PVP em um

volume final de 3 mL. O homogenato foi centrifugado a 10.000 x g por 30 min (centrífuga modelo Beckman Avanti J-25) e o sobrenadante armazenado em freezer -80 °C para as análises das enzimas antioxidantes. A dosagem de proteína foi determinada utilizando-se albumina sérica bovina (BRADFORD, 1976).

#### 2.6.1. Dismutase do superóxido

A atividade da superóxido dismutase foi determinada em 25 °C em meio de reação constituído de 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,5, contendo 0,1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, 2 µM de riboflavina, 0,075 mM de NBT e 20 µL do extrato enzimático em um volume final de 3 mL (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A produção de formazana azul proveniente da redução do NBT em presença de luz é máxima na ausência da enzima. A atividade da SOD está relacionada à capacidade da enzima presente no extrato em inibir a produção de formazana azul e uma unidade de SOD é a quantidade de enzima requerida capaz de reduzir em 50% a produção de formazana azul. A produção de formazana azul proveniente da redução do NBT em presença de luz foi lida em espectrofotômetro (modelo Beckman DU 640, USA) a 560 nm e a atividade enzimática da SOD expressa em unidade SOD mg<sup>-1</sup> proteína.

#### 2.6.2. Peroxidase do ascorbato

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada em meio de reação constituído por 50 mM de tampão fosfato de potássio contendo 0,1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,5 mM de ascorbato e 25 µL de extrato enzimático em um volume final de 2 mL. A atividade da APX foi monitorada pela taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm e 28 °C em espectrofotômetro (modelo Beckman DU 640, USA) (NAKANO; ASADA, 1981) a 290 nm. A atividade da APX foi expressa em expressa em µmol ascorbato min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína. O coeficiente de extinção molar do ascorbato utilizado nos cálculo da atividade enzimática da APX foi de  $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.6.3. Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada em um meio de reação constituído por 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,5, contendo 12 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em um volume final de 2 mL. A atividade da CAT foi monitorada pela decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  através da mudança na absorbância lida a 240 nm e 25 °C em espectrofotômetro (modelo Beckman DU 640, USA). (HAVIR; McHALE, 1987). A atividade da CAT foi expressa em  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína. O coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio utilizado nos cálculos da atividade enzimática da CAT foi de  $\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.7. Aldeído malônico e extravasamento de eletrólitos

A concentração de aldeído malônico foi determinada estimando-se as substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e expresso em equivalentes de aldeído malônico (MDA) (CAKMAK; HORST, 1991). O tecido foliar (0,25 g da folha +2) foi macerado na presença de nitrogênio líquido e homogeneizado com 0,1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e 20% de insolúvel polivinilpirrolidona. O homogenato foi centrifugado a 15000 x g por 15 min a 4°C. Foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante a 1,5 mL de 0,5% de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (preparado em 20% de TCA). As amostras foram homogeneizadas e a reação colorimétrica foi conduzida a 90 °C por 20 min após incubação em banho-maria. A seguir, as amostras foram imersas em banho de gelo e clarificadas através de centrifugação a 15000 x g por 15 min a 4 °C. A absorbância das amostras foi lida a 532 nm e a absorbância inespecífica (660 nm) descontada, em espectrofotômetro (modelo Beckman DU 640, USA). A peroxidação de lipídios foi estimada como conteúdo total de substâncias reativas ao TBA e expressa como equivalentes de MDA. O coeficiente de extinção molar do MDA ( $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) foi utilizado para os cálculos e os resultados expressos como nmol de MDA  $\text{g}^{-1}$  MF.

O extravasamento de eletrólitos foi determinado a partir de dez discos foliares (folha +1) de 1 cm de diâmetro acondicionados em tubo de ensaio contendo 10 mL de água deionizada, mantidos por 24 h a 25 °C em banho-maria. A seguir, realizou-

se a leitura da condutividade elétrica da solução ( $L_1$ ). Posteriormente, os tubos de ensaio foram incubados a 90°C por 1 h e após entrar em equilíbrio térmico com o ambiente, procedeu-se nova leitura ( $L_2$ ) da condutividade elétrica da solução. O extravasamento de eletrólitos foi calculado conforme a fórmula  $EL (\%) = (L_1/L_2) \times 100$  (LUTTS et al., 1996).

## 2.8. Concentração de clorofilas

A extração de clorofilas *a* e *b* foi conduzida a partir de 0,25 g de tecido foliar (folha +2) macerados na presença de nitrogênio líquido e homogeneizado com 10 mL de acetona 80% e 50 mg de  $\text{CaCO}_3$ . A seguir, o homogenato foi centrifugado a 4000 x g por 20 min e o sobrenadante coletado e repetida novamente a extração com 8 mL de acetona 80% nas condições acima. A seguir, os sobrenadantes das extrações foram combinados e aferidos para 25 mL em balão volumétrico protegido da luz e mantido em banho de gelo. Os teores de clorofilas foram determinados conforme Lichtenthaler (1987) a 641,652 e 660 nm em espectrofotômetro (modelo Beckman DU 640, USA).

## 2.9. Eficiência quântica máxima do fotossistema II

O parâmetro eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) foi mensurado na folha +2 totalmente expandida após serem adaptadas ao escuro por meia hora usando um portátil fluorômetro modelo OS-30p (Opti-Science, USA). As medições foram realizadas entre 8h e 9h.

## 2.10. Delineamento experimental e análises estatísticas dos dados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 com as cultivares (cv. SP81-3250 e IAC87-3396) e concentrações salinas (0, 200, 400 e 800 mg  $\text{dm}^{-3}$  de NaCl). Cada tratamento foi constituído por quatro repetições com avaliações aos 15 e 30 dias após a aplicação dos tratamentos salinos. A análise estatística dos dados foi realizada através do pacote estatístico

AgroStat (BARBOSA; MALDONADO JÚNIOR, 2012). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e diferenças significativas entre os tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados foram apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Teores de sódio, potássio e relação sódio/potássio

As análises de variância (ANOVA) dos teores de sódio (Na), potássio (K) e relação Na/K são apresentadas na tabela 1. De acordo com a ANOVA, verifica-se que houve efeito significativo dos fatores cultivar e salinidade, bem como da interação cultivar e salinidade no 15° e 30° dia para a concentração foliar de Na (Tabela 1). Entretanto, para a concentração de K, apenas foi observado efeito significativo do fator salinidade no 30° dia de avaliação. Para a relação Na/K, houve efeito significativo dos fatores cultivar e salinidade e da interação entre cultivar e salinidade no 15° dia de avaliação, entretanto, no 30° dia apenas o fator salinidade mostrou efeito significativo (Tabela 1).

Houve aumento do teor foliar de Na no 15° e 30° dias (Figura 1A e 1B) em ambas as cultivares de cana-de-açúcar com o incremento das concentrações NaCl aplicadas no solo. No 15° dia de avaliação, a cv. SP81-3250 apresentou teor foliar de Na significativamente maior nas doses de 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl em comparação a cv. IAC87-3396 (Figura 1A). Por outro lado, no 30° dias a cv. IAC87-3396 apresentou maior teor foliar de Na em comparação a cv. SP81-3250 no tratamento salino de 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl (Figura 1B). O teor de potássio (K) no 15° e 30° dias (Figura 1C e 1D) não foi alterado nos tratamentos salinos em ambas cultivares. Entretanto, no 30° dia de avaliação a cv. SP81-3250 apresentou redução dos teores de K com o aumento da concentração salina. (Figura 1D). A relação Na/K apresentou padrão de resposta similar aos teores foliares de Na em ambos os dias de avaliação (Figura 1E e 1F).

Tabela 1. Análises de variâncias dos teores de sódio (Na), potássio (K) e relação Na/K determinados na folha +1 de plantas jovens de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl no solo. Jaboticabal, São Paulo. 2012-2013.

| Causas da variação |    | Quadrados médios           |                |                           |                      |             |             |
|--------------------|----|----------------------------|----------------|---------------------------|----------------------|-------------|-------------|
|                    |    | Na (g kg <sup>-1</sup> MS) |                | K (g kg <sup>-1</sup> MS) |                      | Na/K        |             |
|                    |    | 15° dia                    | 30° dia        | 15° dia                   | 30° dia              | 15° dia     | 30° dia     |
| Cultivar (CV)      | 1  | 79600,5000**               | 134810,2812**  | 0,4512 <sup>ns</sup>      | 6,0378 <sup>ns</sup> | 522,9731**  | 1173,6102** |
| Salinidade (SAL)   | 3  | 895855,5416**              | 1731499,3645** | 11,9537 <sup>ns</sup>     | 15,5336*             | 5462,9271** | 9992,9873** |
| CV x SAL           | 3  | 39288,5833**               | 52773,0312**   | 3,2504 <sup>ns</sup>      | 0,9886 <sup>ns</sup> | 228,0540**  | 467,0170**  |
| Tratamento         | 7  | 412147,5535                | 783946,7812    | 6,5805                    | 7,9435               | 2513,7023   | 4650,5176   |
| Resíduo            | 24 | 486,5258                   | 2992,8437      | 4,5406                    | 3,5801               | 23,0747     | 1367,1940   |
| C.V. (%)           |    | 7,30                       | 14,89          | 14,55                     | 12,46                | 21,31       | 14,11       |

\*, \*\*: Significativo a 5 ou 1%; ns: não significante; C.V.: coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade

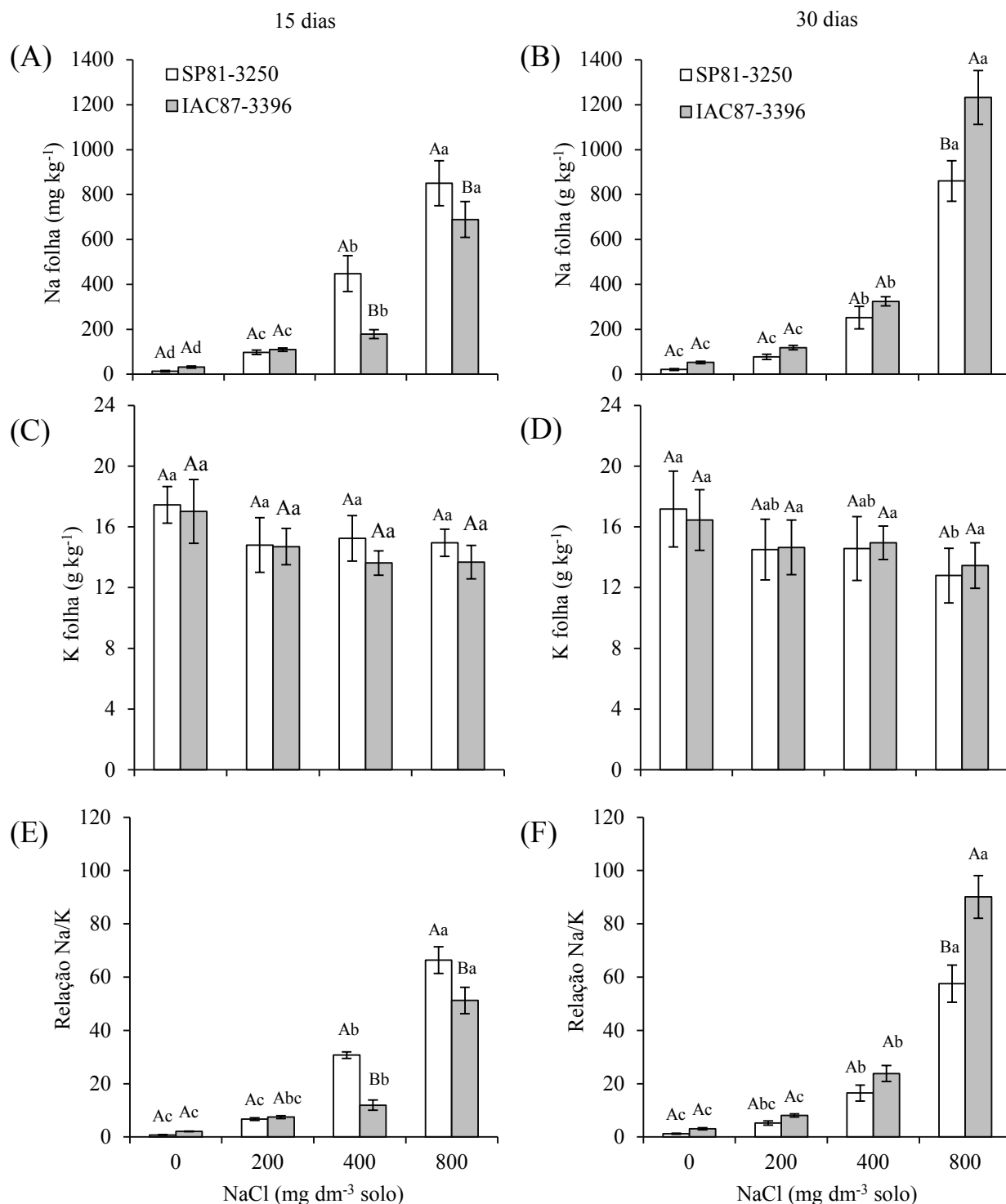


Figura 1. Teores de Na (A e B), K (C e D) (mg kg<sup>-1</sup>) e razão Na/K (E e F) em duas cultivares de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> NaCl. Letras maiúsculas diferentes entre as cultivares e minúsculas entre as concentrações de NaCl mostram diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ), conforme teste Tukey. Valores são médias  $\pm$  DP ( $n=4$ ).

### 3.2. Potencial de água no antemanhã e conteúdo relativo de água

As análises de variância (ANOVA) do potencial de água no antemanhã ( $\psi_{wam}$ ) e conteúdo relativo de água (CRA) estão apresentadas na tabela 2. Conforme a ANOVA do  $\psi_{wam}$  no 15º dia, apenas o fator salinidade apresentou efeito significativo, enquanto que no 30º dia, os fatores cultivar e salinidade, e a interação entre cultivar e salinidade evidenciaram efeito significativo (Tabela 2). Com relação ao CRA, somente o fator salinidade apresentou efeito significativo em ambos os dias de avaliação (Tabela 2).

Ambas as cultivares de cana-de-açúcar evidenciaram redução o  $\psi_{wam}$  conforme a severidade do tratamento salino, tanto no 15º como no 30º dia (Figura 2A e 2B). Apenas no 30º dia o  $\psi_{wam}$  foi reduzido na cv. SP81-3250 pelos tratamentos salinos de 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl (Figura 2B). Do mesmo modo, apenas no 30º dia o CRA foi reduzido (Figura 2D) em comparação com o do 15º dia (Figura 2C), apesar do tratamento salino mais severo (800 mg dm<sup>-3</sup>) o que evidenciou, neste caso, que ambas as cultivares responderam negativamente à maior concentração salina no solo (Figura 2D).

Tabela 2. Análises de variâncias do potencial de água no antemanhã ( $\psi_{wam}$ ) e conteúdo relativo de água (CRA) determinados na folha +1 de plantas jovens de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl no solo. Jaboticabal, São Paulo. 2012-2013.

| Causas da variação | G.L. | Quadrados médios      |          |                       |                        |
|--------------------|------|-----------------------|----------|-----------------------|------------------------|
|                    |      | $\psi_{wam}$ (-MPa)   |          | CRA (%)               |                        |
|                    |      | 15° dia               | 30° dia  | 15° dia               | 30° dia                |
| Cultivar (CV)      | 1    | 0,00044 <sup>ns</sup> | 0,0215** | 33,2549 <sup>ns</sup> | 136,9615 <sup>ns</sup> |
| Salinidade (SAL)   | 3    | 0,05367**             | 0,0770** | 197,8834*             | 650,5899**             |
| CV x SAL           | 3    | 0,00123 <sup>ns</sup> | 0,0084** | 23,3115 <sup>ns</sup> | 13,5163 <sup>ns</sup>  |
| Tratamento         | 7    | 0,02359               | 0,0397   | 99,5485               | 304,1829               |
| Resíduo            | 24   | 0,00122               | 0,0001   | 58,4913               | 76,7445                |
| C.V. (%)           |      | 17,05                 | 5,91     | 8,83                  | 10,84                  |

\*, \*\*: Significativo a 5 ou 1%; ns: não significante; C.V.: coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade

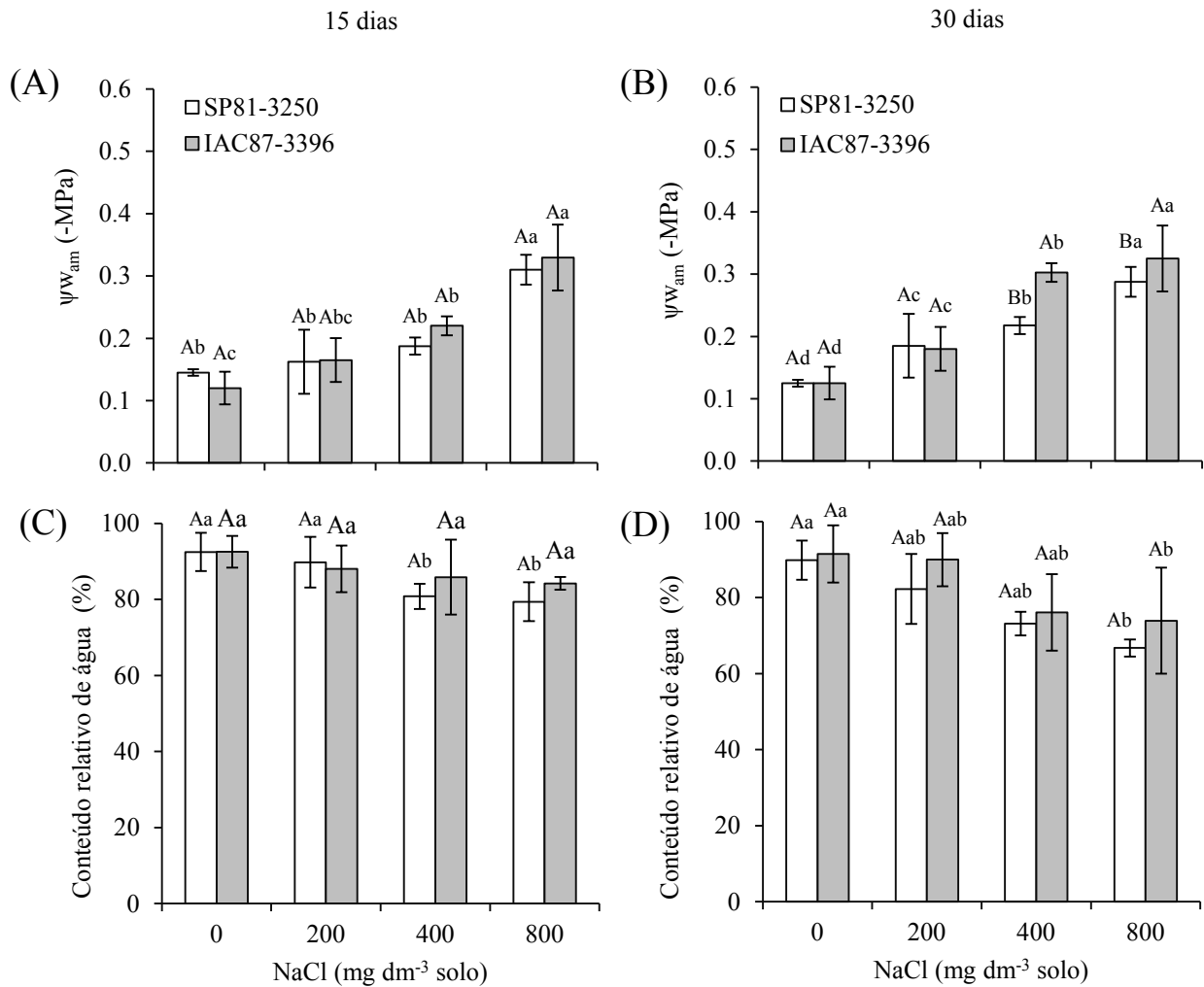


Figura 2. Potencial de água de antemanhã (A e B) (-MPa) e conteúdo relativo de água (C e D) (%) em duas cultivares de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> NaCl. Letras maiúsculas diferentes entre as cultivares e minúsculas entre as concentrações de NaCl mostram diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ), conforme teste Tukey. Valores são médias  $\pm$  DP ( $n=4$ ).

### 3.3. Glicina betaína e prolina

As análises de variância (ANOVA) da concentração de glicina betaína (GB) e prolina estão apresentadas na tabela 3. A ANOVA da concentração de prolina evidenciou que apenas os fatores cultivar e salinidade no 15º dia mostraram efeito significativo. Por outro lado, no 30º dia, os fatores cultivar e salinidade, e a interação entre cultivar e salinidade apresentaram efeito significativo (Tabela 3). Similarmente, a ANOVA da concentração de GB revelou o mesmo padrão de resposta que a prolina em ambos os dias de avaliação (Tabela 3).

Os tratamentos salinos provocaram o acúmulo de GB e de prolina no 15º e 30º dias, nas duas cultivares de cana-de-açúcar (Figura 3A, 3B, 3C e 3D). Porém, dentre elas, a cv. IAC87-3396 foi a que mais acumulou GB e prolina em condições de estresse salino, embora o acúmulo de GB tenha sido maior em 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl (Figura 3A e 3B), enquanto que o acúmulo de prolina ocorreu em todos os tratamentos salinos (Figura 3C e 3D). No 30º dia, a cv. SP81-3250 sob efeito de 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl apresentou acúmulo de prolina, similarmente à cv. IAC87-3396 (Figura 3D).

Tabela 3. Análises de variâncias da concentração de glicina betaína e prolina determinada na folha +2 de plantas jovens de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl no solo. Jaboticabal, São Paulo. 2012-2013.

| Causas da variação | G.L. | Quadrados médios          |            |                      |          |
|--------------------|------|---------------------------|------------|----------------------|----------|
|                    |      | Glicina betaína           |            | Prolina              |          |
|                    |      | (μmol g <sup>-1</sup> MS) |            |                      |          |
|                    |      | 15° dia                   | 30° dia    | 15° dia              | 30° dia  |
| Cultivar (CV)      | 1    | 117,4428*                 | 128,8368** | 0,1124**             | 0,2816** |
| Salinidade (SAL)   | 3    | 657,5262**                | 659,9433** | 0,1880**             | 0,0822** |
| CV x SAL           | 3    | 37,8935 <sup>ns</sup>     | 59,6251**  | 0,0116 <sup>ns</sup> | 0,0167*  |
| Tratamento         | 7    | 314,8146                  | 326,7917   | 0,1016               | 0,0826   |
| Resíduo            | 24   | 16,5106                   | 5,2465     | 0,0063               | 0,0046   |
| C.V. (%)           |      | 18,650                    | 10,23      | 13,330               | 10,55    |

\*, \*\*: Significativo a 5 ou 1%; ns: não significante; C.V.: coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade

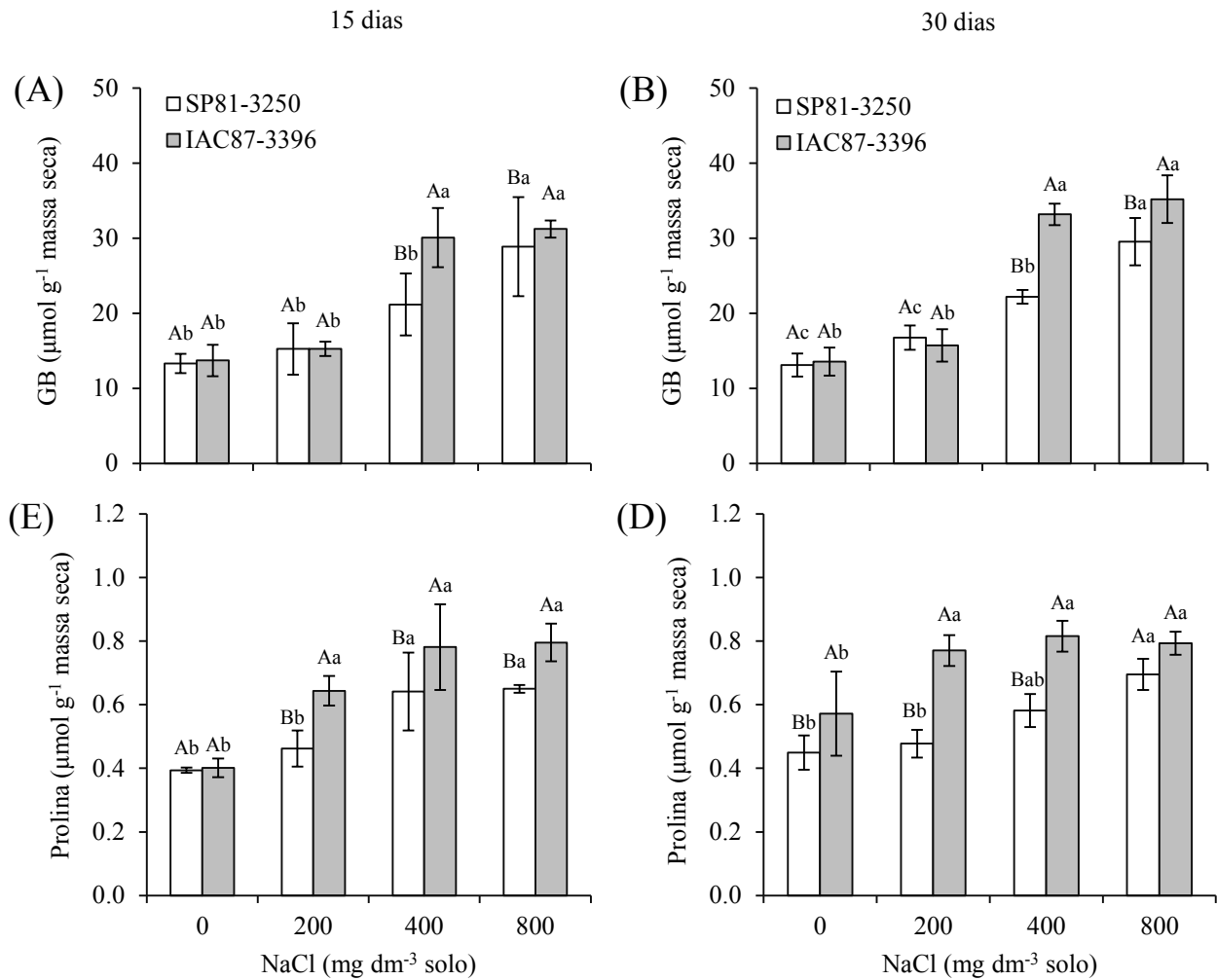


Figura 3. Concentração de glicina betaína (A e B) e prolina ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) (C e D) em duas cultivares de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800  $\text{mg dm}^{-3}$  NaCl. Letras maiúsculas diferentes entre as cultivares e minúsculas entre as concentrações de NaCl mostram diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ), conforme teste Tukey. Valores são médias  $\pm$  DP ( $n=4$ ).

### 3.4. Enzimas antioxidantes

As análises de variância (ANOVA) da atividade enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT) estão apresentadas na tabela 4. A ANOVA da atividade da SOD evidenciou que no 15° dia apenas o fator salinidade teve efeito significativo, enquanto que no 30° dia o fator salinidade e a interação cultivar e salinidade tiveram efeitos significativos (Tabela 4). A ANOVA da atividade da APX no 15° revelou o mesmo padrão de resposta apresentado pela SOD neste dia de avaliação, entretanto, no 30° dia todos os fatores mostraram efeitos significativos para a atividade da APX (Tabela 4). O mesmo padrão de resposta da ANOVA da atividade da APX foi apresentado pela enzima CAT em ambos os dias (Tabela 4).

A atividade das enzimas SOD, APX e CAT apresentou aumento significativo em ambas as cultivares de cana-de-açúcar com o incremento do estresse salino em ambos os dias de avaliação (Figura 4A, 4B, 4C, 4D, 4E e 4F, respectivamente). No 15° dia, a atividade da SOD foi significativamente maior na cv. SP81-3250 em comparação a cv. IAC87-3396, considerando a atividade da enzima no tratamento controle (Figura 4A). Este resultado evidencia mais nitidamente, que o incremento da atividade da SOD foi em resposta ao estresse imposto nesta cultivar. Por outro lado, no 30° dia, apenas a cv. IAC87-3396 apresentou atividade da SOD significativamente maior no tratamento mais severo (800 mg dm<sup>-3</sup> NaCl) em comparação a cv. SP81-3250 (Figura 4B). A atividade da APX apresentou um padrão de atividade semelhante ao da SOD, apresentando maior atividade na cv. IAC87-3396 apenas em 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl, porém este resultado ocorreu no 15° dia de avaliação (Figura 4C). No 30° dia de avaliação, a cv. IAC87-3396 apresentou a atividade da APX significativamente maior nos tratamentos salinos (200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup>) em comparação a cv. SP81-3250 (Fig 4D). A CAT mostrou o mesmo padrão de atividade que foi apresentado pela APX nas duas cultivares de cana-de-açúcar e em ambos os dias de avaliação (Figura 4E e 4F).

Tabela 4. Análises de variâncias da atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT) determinada na folha +2 de plantas jovens de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl no solo. Jaboticabal, São Paulo. 2012-2013.

| Causas da variação | G.L. | Quadrados médios                                   |                       |                         |                          |                       |                       |
|--------------------|------|----------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
|                    |      | SOD                                                |                       | APX                     |                          | CAT                   |                       |
|                    |      | (μmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína) |                       |                         |                          |                       |                       |
|                    |      | 15° dia                                            | 30° dia               | 15° dia                 | 30° dia                  | 15° dia               | 30° dia               |
| Cultivar (CV)      | 1    | 1,669 <sup>ns</sup>                                | 25,722 <sup>ns</sup>  | 1237,531 <sup>ns</sup>  | 133257,031 <sup>**</sup> | 28,918 <sup>ns</sup>  | 699,847 <sup>**</sup> |
| Salinidade (SAL)   | 3    | 347,956 <sup>**</sup>                              | 734,248 <sup>**</sup> | 44027,114 <sup>**</sup> | 172923,697 <sup>**</sup> | 411,643 <sup>**</sup> | 947,448 <sup>**</sup> |
| CV x SAL           | 3    | 9,313 <sup>ns</sup>                                | 25,677 <sup>*</sup>   | 400,614 <sup>ns</sup>   | 27477,614 <sup>**</sup>  | 10,275 <sup>ns</sup>  | 77,028 <sup>**</sup>  |
| Tratamento         | 7    | 153,354                                            | 329,357               | 19217,245               | 104922,995               | 184,953               | 539,039               |
| Resíduo            | 24   | 4,166                                              | 7,706                 | 377,343                 | 855,968                  | 9,781                 | 15,177                |
| C.V. (%)           |      | 4,730                                              | 5,900                 | 3,27                    | 4,240                    | 6,220                 | 6,820                 |

\*, \*\*: Significativo a 5 ou 1%; ns: não significante; C.V.: coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade

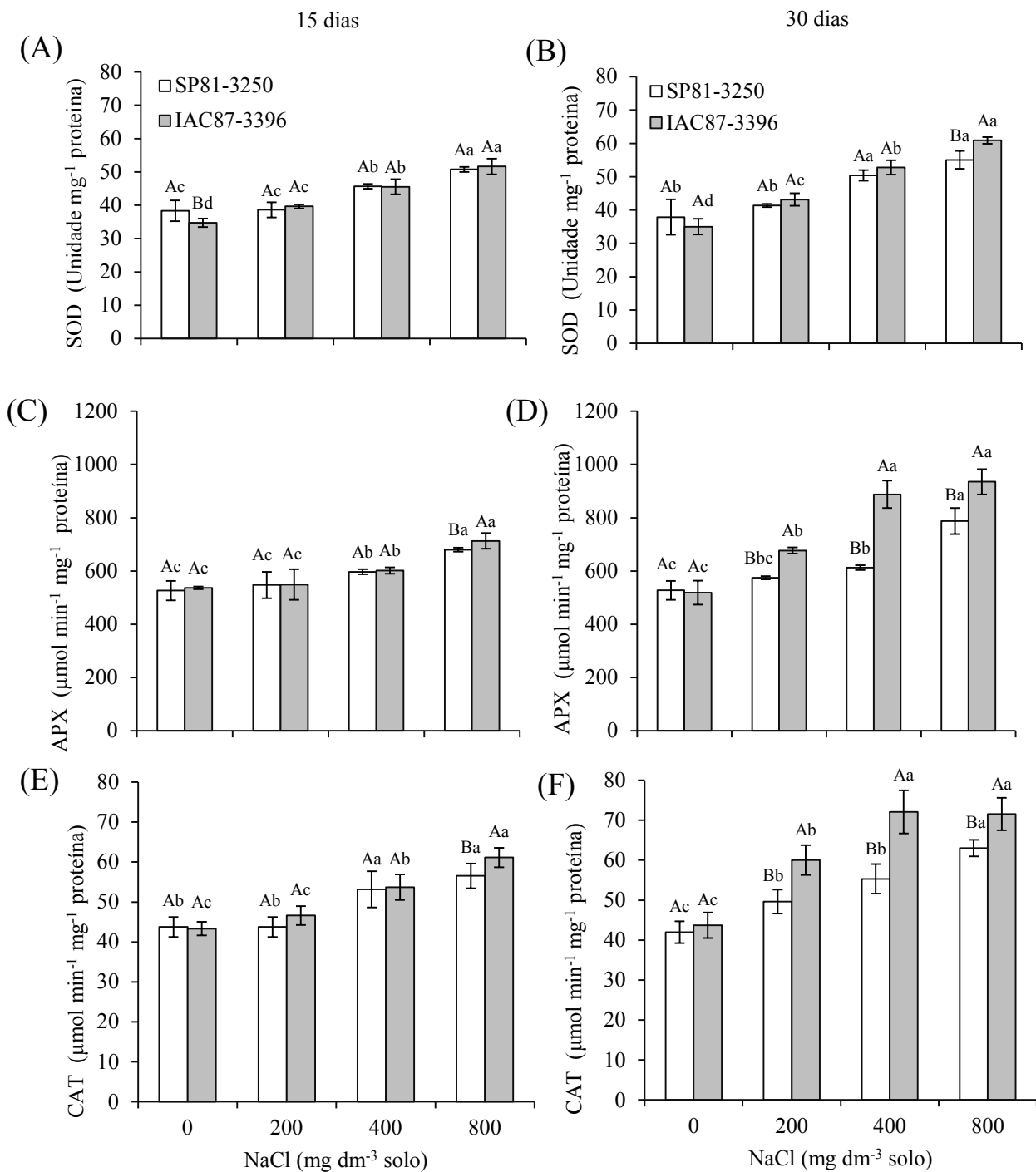


Figura 4. Atividade da dismutase do superóxido (A e B) (unidade  $\text{mg}^{-1}$  proteína), peroxidase do ascorbato (C e D) e catalase (E e F) ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) em duas cultivares de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800  $\text{mg dm}^{-3}$  NaCl. Letras maiúsculas diferentes entre as cultivares e minúsculas entre as concentrações de NaCl mostram diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ), conforme teste Tukey. Valores são médias  $\pm$  DP ( $n=4$ ).

### 3.5. Aldeído malônico e extravasamento de eletrólitos

As análises de variância (ANOVA) da concentração de aldeído malônico (MDA) e extravasamento de eletrólitos (E.E.) estão apresentadas na tabela 5. Em ambos os dias a ANOVA da concentração de MDA evidenciou efeito significativo dos fatores cultivar, salinidade e interação cultivar e salinidade (tabela 5). Este mesmo padrão de resposta foi observado em ambos os dias para a variável E.E., onde todos os fatores cultivar e salinidade, e a interação entre cultivar e salinidade apresentaram efeito significativo (tabela 5).

As cultivares de cana-de-açúcar apresentaram aumento significativo na concentração de MDA no 15° e 30° dias, com maior intensidade nas concentrações salinas de 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl (Figura 5A e 5B). Entretanto, este aumento foi maior na cv. SP81-3250 em comparação a cv. IAC87-3396 (Figura 5A), evidenciando que a cv. SP81-3250 foi mais responsiva ao estresse salino em menor período de tempo que a cv. IAC87-3396. Similarmente, no 30° dia houve maior peroxidação lipídica na cv. SP81-3250 nas concentrações salinas de 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> (Figura 5B). O E.E. aumentou significativamente em ambas as cultivares de cana-de-açúcar, nos dois dias de avaliação, com o incremento do estresse salino (Figura 5C e 5D). No 15° dia de avaliação, a cv. SP81-3250 apresentou maior E.E. nas concentrações salinas de 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl, em comparação a cv. IAC87-3396. Por outro lado, apenas nas concentrações de 200 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl, a cv. SP81-3250 apresentou maior E.E. em comparação a cv. IAC87-3396 (Figura 5C e 5D).

Tabela 5. Análises de variâncias da concentração de aldeído malônico (folha +2) e extravasamento de eletrólitos (folha +1) determinados em plantas jovens de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl no solo. Jaboticabal, São Paulo. 2012-2013.

| Causas da variação | G.L. | Quadrados médios              |            |             |             |
|--------------------|------|-------------------------------|------------|-------------|-------------|
|                    |      | MDA (nmol g <sup>-1</sup> MF) |            | E.E. (%)    |             |
|                    |      | 15° dia                       | 30° dia    | 15° dia     | 30° dia     |
| Cultivar (CV)      | 1    | 65,3842**                     | 33,7172**  | 323,0246**  | 164,1219**  |
| Salinidade (SAL)   | 3    | 156,3362**                    | 225,3019** | 1007,8398** | 1385,1586** |
| CV x SAL           | 3    | 32,0725**                     | 115,6574** | 38,7835**   | 65,2238**   |
| Tratamento         | 7    | 90,0872                       | 150,9422   | 494,6992    | 654,0384    |
| Resíduo            | 24   | 1,5129                        | 2,6000     | 0,3456      | 0,4542      |
| C.V. (%)           |      | 7,89                          | 8,63       | 3,00        | 3,02        |

\*, \*\*: Significativo a 5 ou 1%; ns: não significante; C.V.: coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade

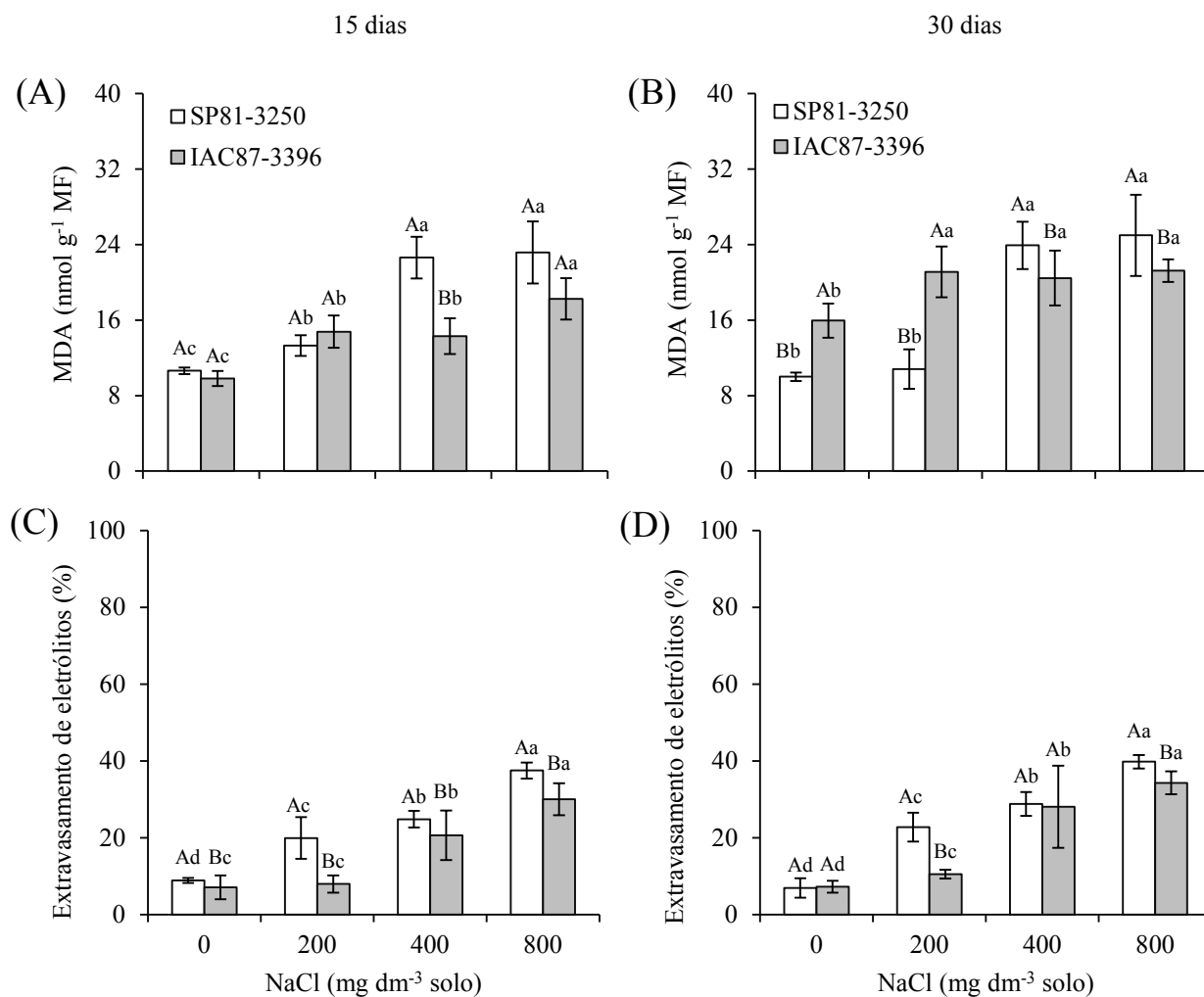


Figura 5. Peroxidação de lipídios (nmol g<sup>-1</sup> MF) (A e B) e estabilidade de membranas (%) (C e D) em duas cultivares de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> NaCl. Letras maiúsculas diferentes entre as cultivares e minúsculas entre as concentrações de NaCl mostram diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ), conforme teste Tukey. Valores são médias  $\pm$  DP ( $n=4$ ).

### 3.6. Concentração de clorofilas e eficiência quântica máxima do fotossistema II

As análises de variância (ANOVA) da concentração de clorofilas *a* (Cl *a*) e *b* (Cl *b*), e eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) estão apresentadas na tabela 6. Em ambos os dias de avaliação a ANOVA da concentração de Cl *a* evidenciou que apenas o fator salinidade teve efeito significativo (Tabela 6). Por outro lado, todos os fatores e a interação entre os fatores tiveram efeito significativo conforme ANOVA para a concentração de Cl *b* em ambos os dias (Tabela 6). Com relação a Fv/Fm, a ANOVA mostrou que apenas o fator salinidade teve efeito significante (Tabela 6).

A concentração de pigmentos clorofilianos de ambas cultivares de cana-de-açúcar foram significativamente reduzidos pelo estresse salino, em ambos os dias de avaliação (Figura 6A a 6B). A redução da concentração da clorofila *a* (Cl *a*) foi similar para ambas cultivares e o decréscimo foi intensificado conforme aumentou as concentrações de NaCl (Figura 6A e 6B). Os resultados para a concentração de clorofila *b* (Cl *b*) foram similares aos da Cl *a*, porém no tratamento de 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl no 15º dia (Figura 6C) e no 200 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl no 30º dia (Figura 6D), a cv. SP81-3250 apresentou concentração de Cl *b* menor em comparação a cv. IAC87-3396.

A redução da eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) nas cultivares de cana-de-açúcar foi significativa, com o incremento dos tratamentos de estresse salino não havendo, entretanto, de modo geral, diferenças significativas entre as cultivares de cana-de-açúcar em cada tratamento de NaCl. No 15º dia, houve maior decréscimo da Fv/Fm na cv. SP81-3250 em comparação com a cv. IAC87-3396 (Figura 7A). No 30º dia, o declínio de Fv/Fm foi mais brando, principalmente, na cv. SP81-3250, porém, no tratamento de 200 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl esta cultivar mostrou menor Fv/Fm em comparação a cv. IAC87-3396 (Figura 7B).

Tabela 6. Análises de variâncias da concentração de clorofilas *a* (Cl *a*) e *b* (Cl *b*) e eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) determinadas na folha +2 de plantas jovens de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl no solo. Jaboticabal, São Paulo. 2012-2013.

| Causas da variação | G.L. | Quadrados médios                    |                        |                                     |                        |                      |                       |
|--------------------|------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
|                    |      | Cl <i>a</i> (mg g <sup>-1</sup> MF) |                        | Cl <i>b</i> (mg g <sup>-1</sup> MF) |                        | Fv/Fm                |                       |
|                    |      | 15° dia                             | 30° dia                | 15° dia                             | 30° dia                | 15° dia              | 30° dia               |
| Cultivar (CV)      | 1    | 93,4719 <sup>ns</sup>               | 111,0566 <sup>ns</sup> | 59,5686 <sup>**</sup>               | 80,9310 <sup>*</sup>   | 0,0002 <sup>ns</sup> | 0,00003 <sup>ns</sup> |
| Salinidade (SAL)   | 3    | 409,1509 <sup>**</sup>              | 546,5119 <sup>**</sup> | 255,7789 <sup>**</sup>              | 287,5781 <sup>**</sup> | 0,0149 <sup>**</sup> | 0,00704 <sup>**</sup> |
| CV x SAL           | 3    | 46,7334 <sup>ns</sup>               | 34,5016 <sup>ns</sup>  | 12,3581 <sup>*</sup>                | 153,6654 <sup>**</sup> | 0,0057 <sup>ns</sup> | 0,00014 <sup>ns</sup> |
| Tratamento         | 7    | 208,7321                            | 264,8711               | 123,4256                            | 200,6659               | 0,0088               | 0,00308               |
| Resíduo            | 24   | 52,8276                             | 44,4043                | 3,2184                              | 10,5711                | 0,0028               | 0,00022               |
| C.V. (%)           |      | 9,720                               | 9,150                  | 3,570                               | 6,03                   | 7,07                 | 1,930                 |

\*, \*\*: Significativo a 5 ou 1%; C.V.: coeficiente de variação; G.L.: graus de liberdade

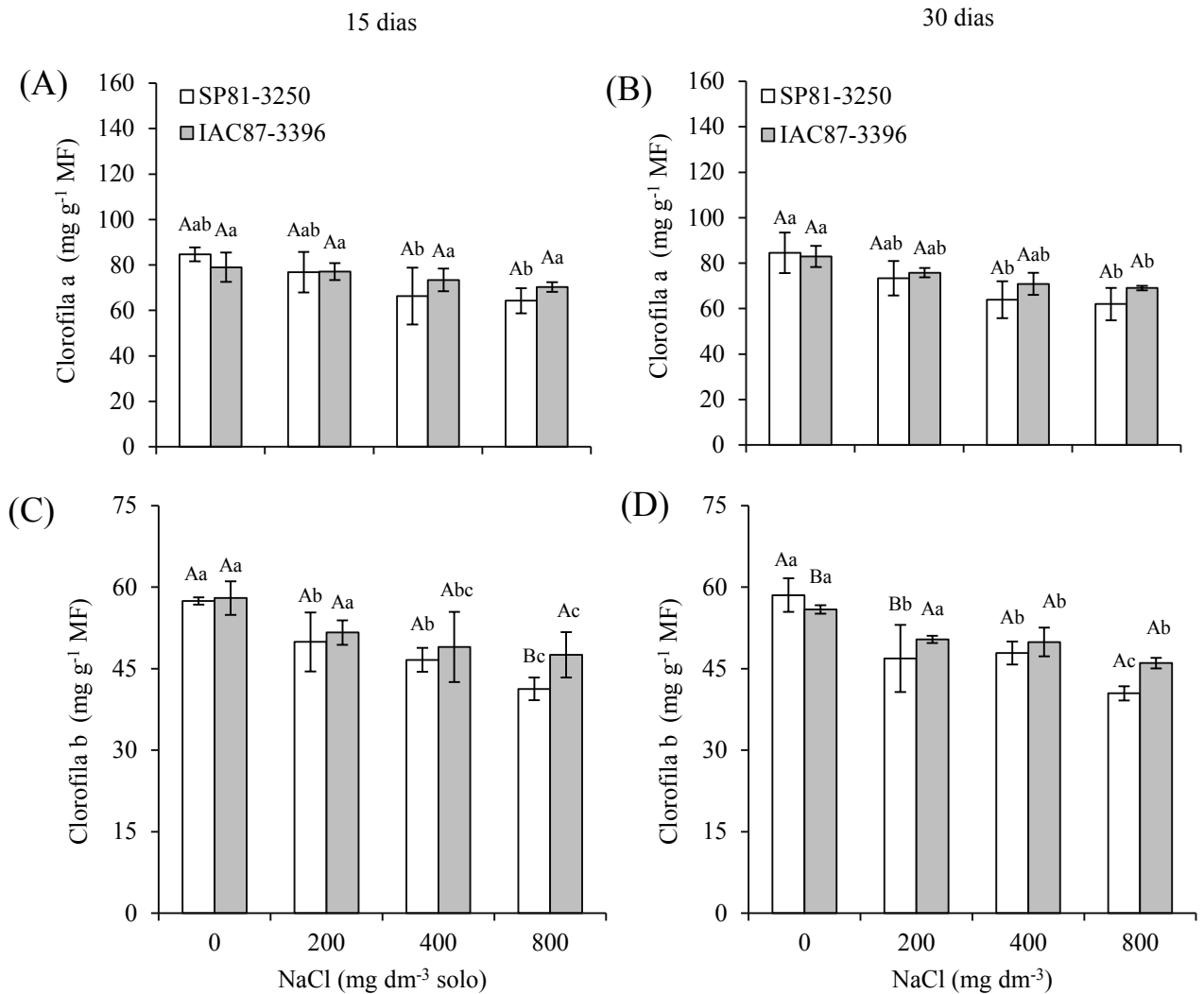


Figura 6. Concentração de clorofila a (A e B) e b (C e D) (mg g<sup>-1</sup> MF) em duas cultivares de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 e 30 dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> NaCl. Letras maiúsculas diferentes entre as cultivares e minúsculas entre as concentrações de NaCl mostram diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ), conforme teste Tukey. Valores são médias  $\pm$  DP ( $n=4$ ).

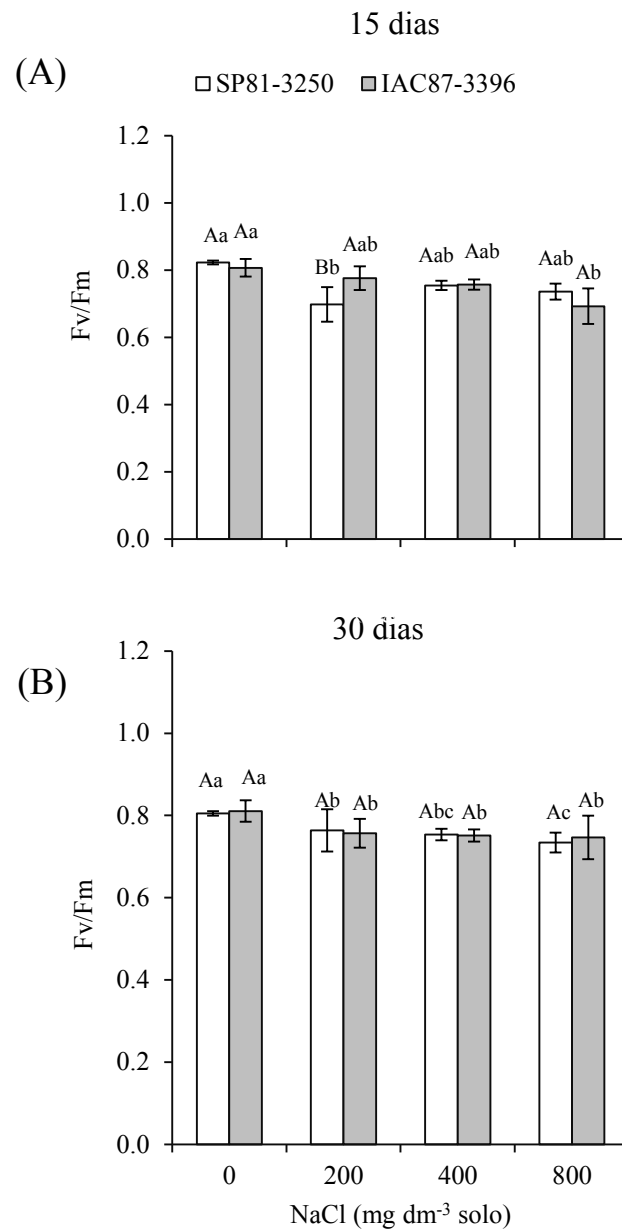


Figura 7. Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) em duas cultivares de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 (A) e 30 dias (B) após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> NaCl. Letras maiúsculas diferentes entre as cultivares e minúsculas entre as concentrações de NaCl mostram diferenças significativas ( $p \leq 0.05$ ), conforme teste Tukey. Valores são médias  $\pm$  DP ( $n=4$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar o conteúdo de Na e o efeito do seu componente íon específico sobre o K foram determinados os teores destes elementos minerais em folhas de cana-de-açúcar. Neste estudo ficou evidente que as concentrações de Na aplicadas no solo incrementaram os teores foliares de Na (Figura 1A e B). No entanto, o aumento das concentrações de NaCl aplicadas no solo não implicou impacto negativo na absorção e translocação de K para as folhas, uma vez que os valores médios dos teores foliares de K dos tratamentos salinos de 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> não variaram entre si, ficando próximos da média geral apresentada pelas cultivares de cana-de-açúcar que foram de 14,76 e 14,53 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para cultivares SP81-3250 e IAC87-3396. O aumento da relação Na/K pode ser devido à considerável absorção de Na pelas cultivares de cana-de-açúcar em relação à absorção de K (Figura 1C e 1D), embora a cv. IAC87-3396 tenha apresentado menor tendência de absorver elevadas quantidades de Na no 15º dia de avaliação em comparação a cv. SP81-3250 (Figura 1A).

Este resultado mostra-se relevante devido às inúmeras funções fisiológicas exercidas pelo íon K em plantas como, por exemplo, regulação do potencial osmótico celular, além de que a manutenção da relação Na/K em um nível ideal é vital para ativar reações enzimáticas no citoplasma que são necessárias para manter o crescimento vegetal (WAKEEL, 2013), sugerindo uma possível estratégia nutricional da cv. IAC87-3396 em manter níveis satisfatórios de K em condições mais severas de estresse por NaCl. Por exemplo, em estudos com genótipos de cana-de-açúcar tolerantes ao estresse salino, a elevada absorção de K foi relacionada à maior seletividade de K em detrimento do Na nos sítios de trocas da membrana plasmática na interface solução do solo e sistema radicular (CARDEN et al., 2003; ASHRAF et al., 2007).

As condições hídricas de ambas as cultivares sob estresse salino foram avaliadas com base no potencial de água de antemanhã ( $\Psi_{wam}$ ) e conteúdo relativo de água (CRA). Diversas pesquisas mostram o impacto negativo do estresse salino no conteúdo hídrico de cana-de-açúcar (PATADE et al., 2008; PATADE et al., 2011; MURAD et al., 2014). O efeito do estresse salino em ambas as cultivares de

cana-de-açúcar reduziram o  $\Psi_{wam}$  em ambas as cultivares de cana-de-açúcar nos dois dias de avaliação (Figura 2A e 2B). Esse resultado ocorreu devido à redução do potencial osmótico do solo promovido pelo estresse salino (YADAV et al., 2011).

O aumento do acúmulo de metabólitos protetores como prolina e glicinabetaína (GB) em plantas sob estresse salino é bastante documentado na literatura (ASHRAF; HARRIS, 2004; ASHRAF; FOOLAD 2005; CARILLO et al., 2008; KAYA et al., 2013). Neste estudo, coincidentemente, as concentrações dos osmoprotetores prolina e GB foram incrementados com o aumento das concentrações de NaCl em ambos os dias de avaliação. Entretanto, a magnitude do aumento da concentração desses osmólitos compatíveis foi maior na cv. IAC87-3396, sobretudo, nas concentrações de 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl.

Alguns estudos têm evidenciado a participação desses dois osmoprotetores como agentes antioxidantes não enzimáticos e, a ação destes osmoprotetores está ligada à capacidade que os mesmos têm proteger e estabilizar enzimas antioxidantes como SOD, APX e CAT (HOQUE et al., 2008; ISLAM et al., 2009; REJEB et al., 2014), detoxificação de radicais hidroxil (SMIRNOFF; CUMBES, 1989) e oxigênio singlete (ALIA et al., 2001). Adicionalmente, a prolina pode estabilizar o DNA, membranas e complexos protéicos (REJEB et al., 2014). Por exemplo, alguns estudos evidenciaram aumentos da atividade de enzimas antioxidantes em paralelo ao acúmulo de prolina e GB (KHOLOVA et al., 2010; HE et al., 2011; PATADE et al., 2011; PAGARIYA et al., 2012; KAYA et al., 2013) e estes resultados foram confirmados no presente estudo, em particular na cv. IAC87-3396, a qual apresentou elevadas concentrações de prolina e GB paralelamente à maior atividade da SOD, APX e CAT, fato refletido na menor concentração de MDA nas concentrações salinas de 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl na cv. IAC87-3396 em comparação à cv. SP81-3250 nos dois dias de avaliação.

Estes resultados evidenciam que a cv. IAC87-3396, sob ação coordenada dos osmoprotetores prolina e GB, e das enzimas antioxidativas apresentou melhor resposta frente ao estresse salino aplicado, em particular quando se considera que o parâmetro fotoquímico  $F_v/F_m$  desta cultivar mostrou variações não significativas no 15º dia de avaliação entre as concentrações de 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup>, bem como alterações muito pouco perceptíveis no 30º dia.

Algumas enzimas antioxidantes chave têm mostrado responder ao estresse oxidativo promovido pelo estresse salino (MITTLER, 2002; ASHRAF; HARRIS, 2004; STEPIEN; KLOBUS, 2005; ASHRAF, 2009; ABOGADALLAH, 2010; MILLER et al., 2010; SHARMA et al., 2012). O aumento da atividade da SOD neste estudo mostrou-se dependente do estresse salino, não evidenciando resposta diferencial de uma cultivar específica de cana-de-açúcar utilizada no estudo e em ambos os dias de avaliação. No entanto, a atividade desta enzima mostrou-se alta, sobretudo, nas concentrações de 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl no 30º dia de avaliação (Figura 4B). Pelo fato desta enzima constituir a primeira linha de detoxificação de radicais livres (ASADA, 2006), promovendo a dismutação do O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o aumento da atividade desta enzima é relevante, visto que tolerância a uma vasta faixa de condições ambientais estressantes tem sido correlacionada com incremento da atividade de enzimas antioxidantes (ABOGADALLAH, 2010; SHARMA et al., 2012). O aumento da atividade da APX ocorreu no tratamento mais severo (800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl) no 15º dia (Figura 4C) e em todos os tratamentos salinos (200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup>) no 30º dia (Figura 4D), com maior magnitude na cv. IAC87-3396. A SOD e APX são enzimas que estão compartimentadas nas mesmas estruturas celulares permitindo uma ação coordenada na detoxificação de radicais livres e manutenção da homeostase em compartimentos celulares (SALES et al., 2013).

Ambas as enzimas têm função primordial no ciclo água-água ao redor do PSI e no ciclo ascorbato-glutationa nos cloroplastos (MITTLER, 2002; ASADA, 2006). A CAT apresentou o mesmo padrão de resposta que a APX em ambos os dias de avaliação (Figura 4E e 4F). Embora a função fisiológica da atividade da CAT em plantas C4 ainda seja controversa (ABOGADALLAH, 2010), esta enzima apresentou o mesmo padrão de resposta que a APX em ambos os dias de avaliação (Figura 4E e 4F). Portanto, este estudo mostra que os componentes antioxidantes de natureza enzimática avaliados constituem importantes estratégias antioxidativas que contribui para minimizar o estresse oxidativo desencadeado pelo estresse salino, particularmente na cv. IAC87-3396.

Pelos estudos realizados sobre o impacto do estresse salino na fisiologia de cana-de-açúcar (HUSSAIN et al., 2004; PATADE et al., 2011; WILLADINO et al., 2011; MEDEIROS et al., 2014), pode-se inferir que esta cultura utiliza a via

antioxidativa gerada pelas enzimas antioxidantes como um dos mecanismos de mitigação do estresse salino. Este fato é confirmado pelas semelhanças significativas na concentração de aldeído malônico (MDA) nas cultivares estudadas neste trabalho (Figura 5B). A maior atividade enzimática pode ter protegido as membranas dos efeitos das EROs gerados pelo estresse oxidativo. Salienta-se que, o MDA é considerado componente bioquímico amplamente utilizado como marcador de injúrias oxidativas aos lipídios das membranas (ABOGADALLAH et al., 2010; SHARMA et al., 2012), cuja concentração varia de acordo com o tipo de estresse (TAULAVUORI et al., 2001; DAVEY et al., 2005). Além disso, a cv. IAC87-3396, nos dois dias de avaliação, apresentou menor extravasamento de eletrólitos em comparação à cv. SP81-3250 nos tratamentos salinos de 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl. Esta resposta pode ser considerada um reforço de que as enzimas antioxidantes avaliadas são os principais compostos bioquímicos para atenuar o impacto do estresse oxidativo sobre as membranas desta cultivar de cana-de-açúcar (Figura 5C e 5D).

De forma geral, foi observado um impacto negativo do estresse salino na concentração das clorofilas com redução das clorofilas *a* e *b* (Figura 6A, 6B, 6C, e 6D). Entretanto, a magnitude desta redução foi menor na cv. IAC87-3396, tanto no 15º como no 30º dia de avaliação, sugerindo menor dano às membranas tilacoidiais, com a consequente preservação e manutenção da funcionalidade do aparato fotoquímico do processo fotossintético. Entretanto, a redução da concentração dos pigmentos clorofilianos observado neste estudo, pode ser atribuída, à diminuição do precursor da clorofila, o ácido  $\delta$ -aminolevulínico cuja síntese é reduzida sob estresse salino severo (SANTOS, 2004) ou mesmo pelo efeito iônico do Na que induz o aparecimento de deficiências de nutrientes minerais importantes ao metabolismo da clorofila, como o Mg (GOMATHI; THANDAPANI, 2005). Os resultados de clorofilas aqui obtidos confirmam o impacto positivo da estratégia antioxidante representada pelas enzimas avaliadas, que possibilitaram menor peroxidação de lipídios e, provavelmente, redução do estresse oxidativo sobre os pigmentos clorofilianos presentes nas membranas tilacoidiais.

As técnicas de investigação do aparato fotossintético com base na fluorescência da clorofila *a* consiste em uma opção não deletéria de estudo *in vivo*

do FSII (MURCHIE; LAWSON, 2013), além de permitir a visualização dos efeitos das condições adversas sobre a fotossíntese, em particular, da etapa fotoquímica (BAKER, 2008). A eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) das plantas sob as concentrações maiores de NaCl não foi severamente afetada, independentemente do dia de avaliação e cultivar avaliada. Este parâmetro fotoquímico constitui uma estimativa da eficiência quântica máxima da atividade fotoquímica do fotossistema II, quando todos os centros de reação do FSII estão abertos (BAKER; ROSENQVST, 2004) e tem sido utilizado com frequência para detectar perturbações no sistema fotossintético causadas por estresses bióticos e abióticos, visto que sua diminuição indica inibição da atividade fotoquímica (KONRAD et al., 2005). Os resultados apresentados pela Fv/Fm, no presente estudo, supostamente ocorreram por conta do estresse oxidativo promovido pelo NaCl, que ativou os mecanismos enzimáticos antioxidantes representados pelas SOD, APX e CAT duas enzimas compartimentadas nos cloroplastos (MITTLER, 2002), visto que com a intensificação da severidade do estresse salino, os valores apresentados pela Fv/Fm foram muito próximos do limite inferior do intervalo considerado como não estressante em plantas que é de 0,81-0,83 (MURCHIE; LAWSON, 2013). Este fato constitui uma importante resposta que permite a manutenção da atividade fotoquímica, evitando, portanto, processos prejudiciais ao aparato fotoquímico como a fotoinibição e outros efeitos deletérios desencadeados pelo estresse oxidativo.

Estes resultados evidenciam que a cv. IAC87-3396, sob ação coordenada dos osmoprotetores prolina e GB e das enzimas antioxidativas apresentou melhor resposta frente ao estresse salino aplicado, em particular quando se considera que o parâmetro fotoquímico Fv/Fm desta cultivar mostrou variações não significativas no 15º dia de avaliação entre as concentrações de 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup>, bem como alterações muito pouco perceptíveis no 30º dia.

## **5. CONCLUSÃO**

Este estudo demonstrou que a cv. IAC87-3396 apresenta melhor resposta frente ao estresse salino em comparação a cv. SP81-3250, pois o aumento da

atividade das enzimas antioxidantes e da concentração dos osmólitos compatíveis constituiu uma excelente estratégia de atenuação do estresse oxidativo com repercussão positiva na diminuição da peroxidação de lipídios e melhoria da resposta da eficiência quântica máxima do fotossistema II. Além disso, a natureza rústica da cv. IAC87-3396 sugere que este genótipo de cana-de-açúcar tolere estresse abiótico do solo, como evidenciado neste estudo, visto que é uma cultivar pouco exigente em fertilidade do solo.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABOGADALLAH, G. M. Antioxidative defense under salt stress. **Plant Signal Behavior**, v. 5, p. 369-374, 2010.
- AGUIAR NETTO A. O.; GOMES C. C. S.; LINS, C. C. V.; BARROS, A. C.; CAMPECHE L. F. S. M.; BLANCO, F. F. Características químicas e salino-sodicidade dos solos do Perímetro Irrigado Califórnia, SE, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 1640-1645, 2007.
- AHMAD, R.; LIM, C.J.; KWON, S.Y. Glycine betaine: a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 1, 2013.
- AKHTAR, S.; WAHID, A.; RASUL, E. Emergence, growth and nutrient composition of sugarcane sprouts under NaCl salinity. **Biologia Plantarum**, Netherlands, v. 46, p. 113-116, 2003
- ALIA, P. S. P.; MOHANTY, P.; MATYSIK, J. Effect of proline on the production of singlet oxygen. **Amino Acids**, Vienna, v. 21, p. 195-200, 2001.
- ASHRAF, M.; RAHMATULLAH; KANWAL, S.; TAHIR, M. A.; SARWAR, A.; ALI, L. Differential salt tolerance of sugarcane genotypes. **Pakistan Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 1, p.85-89, 2007.
- ASADA, K. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 141, n. 2, p. 391-396, 2006.

ASHRAF, M. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 84-93, 2009

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Pre-sowing seed treatment a shotgun approach to improve germination plant growth and crop yield under saline and non-saline conditions. **Advances in Agronomy**, v. 88, p. 223-271, 2005.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, Netherlands, v. 166, p. 3-16, 2004.

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89-113, 2008.

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

CARDEN, D. E.; WALKER, D. J.; FLOWERS, T. J.; MILLER, A. J. 2003. Single-cell measurements of the contributions of cytosolic Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> to salt tolerance. **Plant Physiology**, v. 131, n. 2, p. 676-683.

CARILLO, P.; MASTROLONARDO, G.; NACCA, F.; PARISI, D.; VERLOTTA, A.; FUGGI, A. Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. **Functional Plant Biology**, Clayton South, v. 35, n. 5, p. 412-426, 2008.

CHA-UM, S.; CHUENCHAROEN, S.; MONGKOLSIRIWATANA, C.; ASHRAF, M.; KIRDMANEE, C. Screening sugarcane (*Saccharum* spp.) genotypes for salt tolerance using multivariate cluster analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 1, p. 23-33, 2012.

CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. **Plant, Cell & Environmental**, Weinheim, v. 34, n. 1, p. 1-20, 2011.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, Brasil), 2014. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_12\\_19\\_09\\_02\\_49\\_boletim\\_cana\\_portugues-3olev-2014-15.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_12_19_09_02_49_boletim_cana_portugues-3olev-2014-15.pdf). Acesso em: 15 dez. 2014.

DATTA, J. K.; NAG, S.; BANERJEE, A.; MODAL, N. K. Impact of salt stress on five varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under laboratory condition. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 13, n. 3, p. 93-97, 2009.

DAVENPORT, R.; JAMES, R. A.; ZAKRISSON-PLOGANDER, A.; TESTER, M.; MUNNS, R. Control de sodium transport in durum wheat. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 137, n. 3, p. 807-818, 2005.

DAVEY, M. W.; STALS, E.; PANIS, B.; KEULEMANS, J. K.; SWENNEN, R. L. . High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 347, n. 2, p. 201-207, 2005.

EGESKOG, A.; FREITAS, F.; BERNDDES, G.; SPOROVEK, G.; WIRSENIUS, S. Greenhouse gas balance and land use changes associated with the planned expansion (to 2020) of the sugarcane ethanol industry in Sao Paulo, Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 63, p. 280-290, 2014.

EL-BELTAGI, H.; MOHAMED, H. I. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 41, n. 1, p. 44-57, 2013.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of United Nations, Statistic Division (FAOSTAT), 2012. Disponível em: [http://faostat3.fao.org/browse/Q/\\*/E](http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E). Acesso em: 20/12/2014.

FRANCOISE, L. E.; MAAS, E. V. Crop response and management on salt affected soils. In: PESSARAKLI, M. (Ed.), **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker Press Inc., 1999. p. 169-201.

GHOULAM, C.; AHMED, F.; KHALID, F. Effect of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, n. 1, p. 139-150, 2001.

GOMATHI, R.; THANDAPANI, T. V. Salt stress in relation to nutrient accumulation and quality of sugarcane genotypes. **Sugar Tech**, v. 7, n. 1, p. 39-47, 2005.

HE, C.; ZHANG, W.; GAO, Q.; YANG, A.; HU, X.; ZHANG, J. Enhancement of drought resistance and biomass by increasing the amount of glycine betaine in wheat seedlings. *Euphytica*, v. 177, p. 151-167, 2011.

HOQUE, M.A.; BANU, M.N.A.; NAKAMURA, Y.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*, v. 165, n. 8, p. 813-824.

HUSSAIN, A.; KHAN, Z. I.; GHAFOR, M. Y.; ASHRAF, M.; PARVEEN, R.; RASHID, H. M. Sugarcane, sugar metabolism and some abiotic stresses. **International Journal of Agriculture & Biology**, Beijing, v. 6, n. 4, p. 732-742, 2004.

ISLAM, M. M.; HOQUE, M. A.; OKUMA, E.; BANU, M. N. A.; SHIMOISHI, Y.; NAKAMURA, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer Tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 15, p. 1587-1597, 2009.

KAHLAOUI, B.; HACHICHA, M.; REJEB, S.; REJEB, M. N.; HANCHI, B.; MISLE, E. Response of two tomato cultivars to field-applied proline under irrigation with saline water: Growth, chlorophyll fluorescence and nutritional aspects. **Photosynthetica**, Czech Republic, v. 52, n. 3, p. 421-429, 2014.

KATSUHARA, M.; OTSUKA, T.; EZAKI, B. Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in Arabidopsis. **Plant Science**, Netherlands, v. 169, n. 2, p. 369-373, 2005.

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRILAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher

plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, Bengaluru, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

KAYA, C.; SÖNMEZ, O.; AYDEMİR, S.; DİKİLİTAŞ. Mitigation effects of glycinebetaine on oxidative stress and some key growth parameters of maize exposed to salt stress. **Turkish Journal of Agricultural and Forestry**, v. 37, p. 188-194, 2013.

KHOLOVA, J.; SAIRAM, R. K.; MEENA, R. C. Osmolytes and metal ions accumulation, oxidative stress and antioxidant enzymes activity as determinants of salinity stress tolerance in maize genotypes. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 32, p. 477-486, 2010.

KOCA, H.; BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, İ. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 60, n. 3, p. 344-351, 2007.

KONRAD, M. L. F.; SILVA, J. A. B.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 339-347, 2005.

LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. NaCl induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. **Annals of Botany**, v. 78, n. 3, p. 389-398, 1996.

LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. **Plant Growth Regulation**, v. 19, n. 3, p. 207-218, 1996.

MEDEIROS, C. D.; FERREIRA NETO, J. R. C.; OLIVEIRA, M. T.; RIVAS, R.; PANDOLFI, V.; KIDO, E. A.; BALDANI, J. I.; SANTOS, M. G. Photosynthesis, antioxidant activities and transcriptional responses in two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars under salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 36, n. 2, p. 447-459, 2014.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S. R. M. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environmental**, Weinheim, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Netherlands, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MUNNS, R.; JAMES, R. A.; LÄUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 1025-1043, 2006.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review and Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 651-681, 2008.

MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 13, p. 3983-3998, 2013.

PAGARIYA, M. C.; DEVARUMATH, R. M.; KAWAR, P. G. Biochemical characterization and identification of differentially expressed candidate genes in salt stressed sugarcane. **Plant Science**, Netherlands, v. 184, p. 1-13, 2012.

PATADE, V. Y.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V. A. Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 55, n. 3, p.169-173, 2008.

PATADE, V. Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Salt and drought Tolerance of sugarcane under isosmotic salt and water stress: growth, osmolytes accumulation, and antioxidant defense. **Journal of Plant Interactions**, v. 6, n. 4, 2011.

QUAN, R.; SHANG, M.; ZHANG, H.; ZHAO, Y.; ZHANG, J. Engineering of enhanced glycinebetaine synthesis improves drought tolerance in maize. **Plant Biotechnology Journal**, v. 2, n. 6, p. 477-486, 2004.

REJEB, K. B.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, Netherlands, v. 80, p. 278-284, 2014.

RIVAS, R.; OLIVEIRA, M. T.; SANTOS, M. G. Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, Netherlands, v. 63, p. 200-208, 2013.

RUDORFF, B. F. T.; AGUIAR, D. A.; SILVA, W. F.; SUGAWARA, L. M.; ADAMI, M.; MOREIRA, M. A. Studies on the rapid expansion of sugarcane for ethanol production in São Paulo State (Brazil) using Landsat Data. **Remote Sensing**, Basel, v. 2, n. 4, p. 1057-1076, 2010.

SATBHAI, R. D.; NAIK, R. M. Osmolytes accumulation, cell Membrane integrity, and antioxidant enzymes in sugarcane varieties differing in salinity tolerance. **Sugar Tech**, Índia, v. 16, n. 1, p. 30-35.

SALES, C. R. G.; RIBEIRO, R. V.; SILVEIRA, J. A. G.; MACHADO, E. C.; MARTINS, M. O.; LAGÔA, A. M. M. A. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. **Plant Physiology and Biochemistry**, Netherlands, v. 73, p. 326-336, 2013.

SANTOS, C. V. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 103, p. 93-99, 2004.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 212, p. 1-26, 2012.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 28, p. 1057-1060, 1989.

STEPIEN, P.; KLOBUS, G. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plants under salinity stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 125, n. 1, p. 31-40, 2005.

SZABADOS, L. SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plants Science**, Netherlands, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010.

TAULAVUORI, E.; HELLSTRÖM, E. K.; TAULAVUORI, K.; LAINE, K. Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 365, p. 2375-2380, 2001.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants. **Annals of Botany**, v. 91, n. 5, p. 503-527, 2003

WAHID, A.; RAO, A. R.; RASUL, E. Identification of salt tolerance traits in sugarcane lines. **Field Crops Research**, v. 54, n. 1, p. 9-17, 1997.

WALTER, A.; GALDOS, M. V.; SCARPARE, F. V.; LEAL, M. R. L. V.; SEABRA, E. A.; CUNHA, M. P.; PICOLI, M. C. A.; OLIVEIRA, C. O. F. Brazilian sugarcane ethanol: developments so far and challenges for the future. **WIREs Energy and Environment**, v. 3, n. 1, p. 70-92, 2014.

WAKEEL, A. Potassium-sodium interactions in soil and plant under saline-sodic conditions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, n. 3, p. 344-354, 2013.

WILLADINO, L.; FILHO, R. A. O.; JUNIOR, E. A. S.; NETO, A. G.; CAMARA, T. R. Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidantes e fluorescência da clorofila. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 417-422, 2011.

YADAV, S.; IRFAN, M.; AHMAD, A.; HAYAT, S. Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A view. **Journal of Environmental Biology**, v. 36, n. 5, p. 667-685, 2011.

YEO, A. Molecular biology of salt Tolerance in the context of whole-plant Physiology. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 323, p. 915-929, 1998.

### **Capítulo 3 – Caracterização metabolômica de cultivares cana-de-açúcar sob estresse salino**

**RESUMO** – O estresse salino constitui um dos maiores impedimentos ao crescimento de plantas e produção agrícola, em particular em climas áridos e semiáridos, onde a evapotranspiração mostra-se maior que a precipitação pluviométrica. Este estudo objetivou avaliar o perfil metabolômico de duas cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperatura e umidade relativa média de  $30,2 \pm 1$  °C e  $40.7 \pm 1\%$ . O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4, representado pelas cultivares SP81-3250 e IAC87-3396 e concentrações salinas de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl, com avaliações aos 15 e 30 dias após a aplicação dos tratamentos salinos. Os resultados obtidos revelaram que sob estresse salino severo, as cultivares aumentaram a concentração de derivados de flavonas, enquanto que sob menores concentrações salinas houve aumento da concentração de ácido clorogênico. Estes resultados sugerem que estes componentes metabólicos estejam associados a uma possível estratégia antioxidante em cana-de-açúcar em decorrência do aumento da concentração de ácido clorogênico e, principalmente, de derivados flavonas que ocorrerem em resposta ao estresse salino, além de que estes componentes estão associados em vegetais à redução do estresse oxidativo promovido por agentes estressantes.

**Palavras-chave:** Sódio, metabólitos secundários, compostos fenólicos, flavonas

## 1. INTRODUÇÃO

Salinidade é uma das mais proeminentes e sérias perturbações do solo e sua ampla faixa de efeitos sobre as plantas impõe restrições à produção de alimentos (ASHRAF et al., 2014). Inicialmente, o estresse salino inibe o crescimento vegetal em decorrência de seu componente osmótico, que reduz o potencial de água do solo diminuindo a capacidade das raízes de absorverem água, além de induzir perda hídrica pelas folhas devido ao excessivo acúmulo de Na (MUNNS, 2005). A absorção de íons como o  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  pelas raízes promove inúmeras desordens fisiológicas em plantas, que implicam na redução da fotossíntese, surgimento de desordens nutricionais e geração de espécies reativas de oxigênio com a consequente diminuição do crescimento e produtividade vegetal.

A cultura da cana-de-açúcar é uma importante fonte de alimento, bioenergia e um significativo componente na economia de muitos países nos trópicos e subtropicais (WACLAWOVSKY et al., 2010). O Brasil destaca-se como o principal produtor mundial de cana-de-açúcar, com a produção brasileira concentrada nos Estados da região Centro-sul e Nordeste, sobretudo no Estado de São Paulo (RUDORFF et al., 2010; EGESKOG et al., 2014). São Paulo figura como o maior produtor (37,713 milhões toneladas ano<sup>-1</sup>) e exportador (26,629.993 toneladas ano<sup>-1</sup>) de açúcar obtido a partir da cana-de-açúcar. Com ampla expansão da área de cultivo, a produção desta cultura para a safra de 2013/2014 foi estimada em 653,519 milhões de toneladas (UNICA, 2014). Apesar de sua importância, plantas de cana-de-açúcar são categorizadas como glicófitas, moderadamente sensíveis ao estresse salino (FRANCOISE; MAAS, 1999; PATADE et al., 2008), embora haja diferenças genotípicas no nível de sensibilidade à salinidade desta cultura (WAHID et al., 1997), o que limita seu crescimento e produção em ambientes onde existam consideráveis níveis de sais solúveis, como o NaCl.

Vários estudos têm investigado o efeito da salinidade no contexto fisiológico de cana-de-açúcar, evidenciando o impacto negativo deste estresse nesta cultura (WAHID et al., 1997; PATADE et al., 2008; PATADE et al., 2011). Entretanto, a resposta de cana-de-açúcar quando cultivada sob estresse salino carece de maiores

informações, sobretudo no que tange ao perfil de metabólitos que se expressam nessas condições de cultivo.

As plantas produzem um extenso conjunto de metabólitos especializados (produtos naturais) que não somente são essenciais ao crescimento e desenvolvimento, mas também têm importantes funções na adaptação em ambientes estressantes (QI et al., 2014). Metabólitos são indicadores diretos de atividades bioquímicas e proporcionam a leitura do estado celular (PATTI et al., 2012). Constituem o produto final da expressão gênica (FIEHN, 2002; WECKWERTH, 2002), refletindo a integração da expressão de genes e outros diferentes processos regulatórios, representando, portanto, mais o fenótipo do que os transcritos de mRNA ou proteínas somente (ARBONA et al., 2013). Entretanto, o estudo da biossíntese de produtos naturais é, ainda, incipiente, pois mais de 90% de metabólitos de plantas são desconhecidos e somente um pequeno número de genes/enzimas envolvidos no metabolismo está identificado em modelos de plantas baseados em arroz e *Arabidopsis* (QI et al., 2014).

O acúmulo de metabólitos secundários em plantas, como resposta a estresses abióticos é bastante documentado. Por exemplo, compostos fenólicos se acumulam em decorrência de deficiência nutricional, danos mecânicos, altas temperaturas, estresse osmótico e ataque de patógenos (DIXON; PAIVA, 1995; ABUL EL-SOUD et al., 2013; AL-WAKEEL et al., 2013) e representam um grupo diverso de metabólitos secundários compreendendo simples fenilpropanóides, cumarinas, derivados de ácido benzóico, lignina e seus precursores, flavonóides e taninos (WILFRED; NICHOLSON, 2006). Dependendo da concentração e estrutura, os compostos fenólicos podem detoxificar radicais livres, inibir a peroxidação de lipídios e estabilizar membranas (CATHERINE, 1997; MILIĆ et al., 1998; ARORA et al., 2000).

Para o estudo dos perfis desses metabólitos utiliza-se a metodologia denominada “Fingerprinting” ou “impressão digital” que consiste na análise de um conjunto de amostras de forma rápida em que um grande e diverso número de metabólitos é avaliado, sem a intenção de identificar cada metabólito detectado, mas sim, comparar e classificar perfis ou modelos metabólicos que possam variar em resposta a perturbações genéticas ou ambientais (DETTMER et al., 2007).

O metabolismo primário de cana-de-açúcar tem sido bem estudado em condições normais ou de salinidade, no entanto, há carência de informação sobre a biossíntese e função de metabólitos secundários nesta cultura sob condições de crescimento de salinidade, embora se acumulem em baixos níveis sob condições normais (FRANÇA et al., 2001). A hipótese segundo a qual o acúmulo de metabólitos secundários ocorre em resposta ao estresse salino como mecanismo de tolerância foi avaliada. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de metabólitos em plantas jovens de duas cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino simulado em condições de crescimento em solo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal, condições de crescimento, salinização do solo e tratamentos**

O presente estudo foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal, São Paulo, Brasil em condições de casa de vegetação com temperatura e umidade relativa média de  $30,2 \pm 1$  °C e  $40.7 \pm 1\%$ , respectivamente, entre os meses de fevereiro a abril de 2013. Mini-toletes de aproximadamente 10 cm de comprimento das cultivares de cana-de-açúcar SP81-3250 e IAC87-3396 foram plantados em areia estéril e irrigados com água deionizada por 15 dias. Após esse período, as plântulas de cana-de-açúcar foram transplantadas para vasos de 8 dm<sup>3</sup> contendo solo tipo Latassolo Vermelho coletado na profundidade de 0-20 cm com a seguinte caracterização química: pH de 5.7; 10 mg dm<sup>-3</sup> de matéria orgânica; 0.1 mg kg<sup>-1</sup> de Na; 26 mg dm<sup>-3</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 1.6 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de K<sub>2</sub>O; 34 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de Ca; 21 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> Mg; 12 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de H + Al; 341 g kg<sup>-1</sup> de argila; 28 g kg<sup>-1</sup> de silte; 310 g kg<sup>-1</sup> de areia fina; 321 g kg<sup>-1</sup> de areia grossa; classe textural média e densidade de 1.24 kg dm<sup>-3</sup>.

A salinização do solo foi realizada conforme método proposto por Raij et al. (2001). Para tanto foi realizado um teste preliminar que consistiu na salinização de 0,1 dm<sup>3</sup> de solo com 30 mL das soluções salinas nas doses de 0, 200, 400 e 800 mg NaCl dm<sup>-3</sup> solo, utilizando-se NaCl como fonte salina (Sigma-Aldrich). Após 24 h de

secagem das amostras sob ambiente de casa de vegetação, as amostras foram peneiradas (malha de 2 mm ) e uma amostra de 10 cm<sup>3</sup> foi coletada a qual foi adicionado 50 mL de água deionizada. Após agitação por 15 min, seguido de decantação, o sobrenadante foi filtrado e medida a condutividade elétrica do extrato do solo em 0,074, 0,264, 0,462, 0,816 dS m<sup>-1</sup>, respectivamente para 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl, conforme curva de calibração a qual relacionou a concentração de Na no solo e sua respectiva condutividade elétrica:  $CE \text{ (dS m}^{-1}\text{)} = 0,1848[\text{NaCl}] - 0,1047$   $R^2 = 0,9989$ . A adubação do solo foi realizada em três parcelas intervalares de 10 dias fornecendo-se 1,18 g vaso<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,40 g vaso<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (primeira parcela) e 1,77 g vaso<sup>-1</sup> de uréia e 1,42 g vaso<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (segunda e terceira parcelas). A aplicação das soluções salinas foi realizada quando as plantas jovens de cana-de-açúcar apresentaram 45 dias de vida. As avaliações foram feitas no 15° e 30° dia após a aplicação dos tratamentos salinos (plantas com 60 e 75 dias de vida, respectivamente).

## 2.2. Teores foliares de sódio

Amostras de tecido foliar seco (folha +3) foram inicialmente solubilizadas em solução nitro-perclórica e os teores de sódio (Na) foram determinados por espectrometria de chama de emissão (Carmo et al., 2000).

## 2.3. Condição hídrica da planta

O potencial de água de antemanhã ( $\Psi_{w_{am}}$ ) foi determinado entre 3:30 e 4:30 h segundo Scholander (1956), a partir de aproximadamente 10 cm do segmento apical da folha +3 , utilizando-se uma câmara de pressão modelo m670 (Pms Instrument Co., Albany, USA).

## 2.4. *Fingerprinting* de metabólitos

### 2.4.1. Preparação das amostras

As folhas das cultivares de cana-de-açúcar SP81-3250 e IAC87-3396 sob condição de estresse salino e controle foram coletadas aos 15 e 30 dias após a aplicação das concentrações salinas no solo. Imediatamente após a coleta das folhas, a atividade enzimática foi inibida por congelamento em nitrogênio líquido e, em seguida, o material vegetal foi armazenado em freezer -80°C. As amostras foliares (folha +3) foram submetidas à liofilização e, a seguir, trituradas em moinho (Modelo IKA A11). Nesta etapa, as amostras foram mantidas sob baixa temperatura utilizando-se nitrogênio líquido antes e após submetê-las à trituração.

As etapas de preparo dos extratos e análise por UHPLC-DAD foram realizadas de acordo com a metodologia desenvolvida por Leme et al. (2014). Os extratos foram preparados a partir de 100 mg de material vegetal seco, no qual adicionou-se 1 mL da mistura de água/etanol/isopropanol (35:45:25 v/v/v), com sonicação durante 15 minutos em banho de ultra-som (ELMA®, modelo TANSSONIC 700, de frequência de 35 kHz), centrifugação por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e ao resíduo foram adicionados mais 1 mL para segunda extração. Após a segunda extração, o material vegetal restante no frasco foi lavado com 1 mL da mistura de solvente e adicionado mais 1 mL para terceira extração em ultra-som. O volume final de 4 mL foi seco em evaporador rotativo a vácuo (Speedvac - Thermo).

Depois de seco o extrato foi solubilizado em 1 mL da mistura água/etanol (1:1 v/v), aplicado em cartucho de extração em fase sólida (EFS) C18 (10 x 3 mL, com 500 mg de adsorvente, Agilent Technologies) e eluído com 4 mL de etanol/água 1:1 v/v. O volume final de 4 mL foi filtrado e seco em evaporador rotativo a vácuo. O extrato seco foi reconstituído em 500 µL de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1 v/v) para análise.

#### 2.4.2. Análise instrumental

As análises foram realizadas empregando o cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (UHPLC) *Ultimate3000*, marca Dionex<sup>®</sup> equipado com duas bombas modelo DGP-3600RS, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo DAD3000(RS), amostrador automático modelo WPS3000RS e *software* Chromeleon versão 6.80. A frequência de aquisição de dados foi de 5,0 Hz. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas para o sistema da Shimadzu, com exceção da fase móvel onde se utilizou 1% de ácido acético na fase móvel ao invés de 0,1%.

#### 2.4.3. Análise dos dados

Os dados cromatográficos obtidos foram organizados na forma de matrizes  $X_{I \times J}$ , onde I são as linhas (amostras) e J colunas (variáveis). As variáveis foram as intensidades (em mV) de absorbância, medidas a 350 nm, a cada 640 ms de corrida cromatográfica. O processamento dos dados foi realizado empregando o software Matlab 7.10.0 (The MathWorks, Co., Natick, MA, USA) e o pacote computacional PLS-Toolbox (Eigenvector Research, Inc.). A análise de componente principal (PCA) foi utilizada como método exploratório.

Os dados foram submetidos à etapa de pré-tratamento. Os métodos de pré-tratamento utilizados foram alinhamento, normalização e centragem na média. A determinação da complexidade do modelo em PCA foi baseada na seleção de componentes principais que correspondessem ao número de PCs em que a curva porcentagem de variância explicada por n° da PC (componente principal) começa a decrescer assintoticamente para zero e considerando todas as componentes principais que descrevessem 95% da informação original dos dados. Os dados referentes ao teor de sódio e potencial de água foram apresentados através de médias e desvio padrão.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Teor de Na foliar e potencial de água no antemanhã

Em ambos os dias o teor de Na aumentou com a severidade do estresse salino nas duas cultivares de cana-de-açúcar, sobretudo, nas concentrações de 400 e 800 mg NaCl dm<sup>-3</sup> (Fig. 1A e 1B). No 15º dia, o teor de Na da cv. SP81-3250 foi 151 e 23% maior nas concentrações de 400 e 800 mg NaCl dm<sup>-3</sup> em comparação a cv. IAC87-3396 respectivamente (Figura 1A). No 30º dia, ambas as cultivares apresentaram teores de Na similares. No entanto, na concentração de 800 mg dm<sup>-3</sup> a cv. IAC87-3396 teve um incremento observado de 152% em relação à cv. SP81-3250 (Figura 1B).

Nos dois dias de avaliação e em ambas as cultivares de cana-de-açúcar o  $\Psi_{w_{am}}$  foi reduzido com o aumento da severidade dos tratamentos salinos (Fig. 2A e 2B). No 15º dia, o  $\Psi_{w_{am}}$  da cv. IAC87-3396 foi 16 e 6% menor em comparação à cv. SP81-3250 nas respectivas concentrações de 400 e 800 mg NaCl dm<sup>-3</sup> (Fig 2A). Similarmente, o  $\Psi_{w_{am}}$  no 30º dia da cv. IAC87-3396 foi 36 e 14% menor em comparação a cv. SP81-3250 nas concentrações de 400 e 800 mg NaCl dm<sup>-3</sup> respectivamente (Fig. 2B).

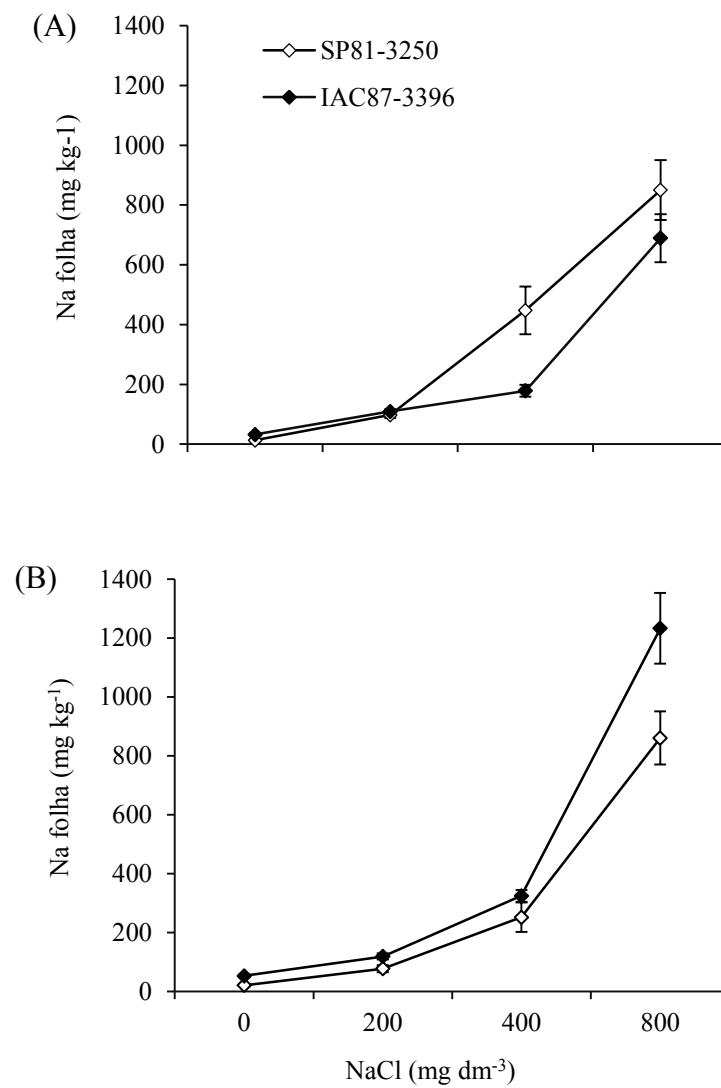


Figura 1. Teores de Na ( $\text{g kg}^{-1}$ ) em duas cultivares de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 (A) e 30 (B) dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800  $\text{mg dm}^{-3}$  NaCl no solo. Valores são médias  $\pm$  DP ( $n=4$ ).

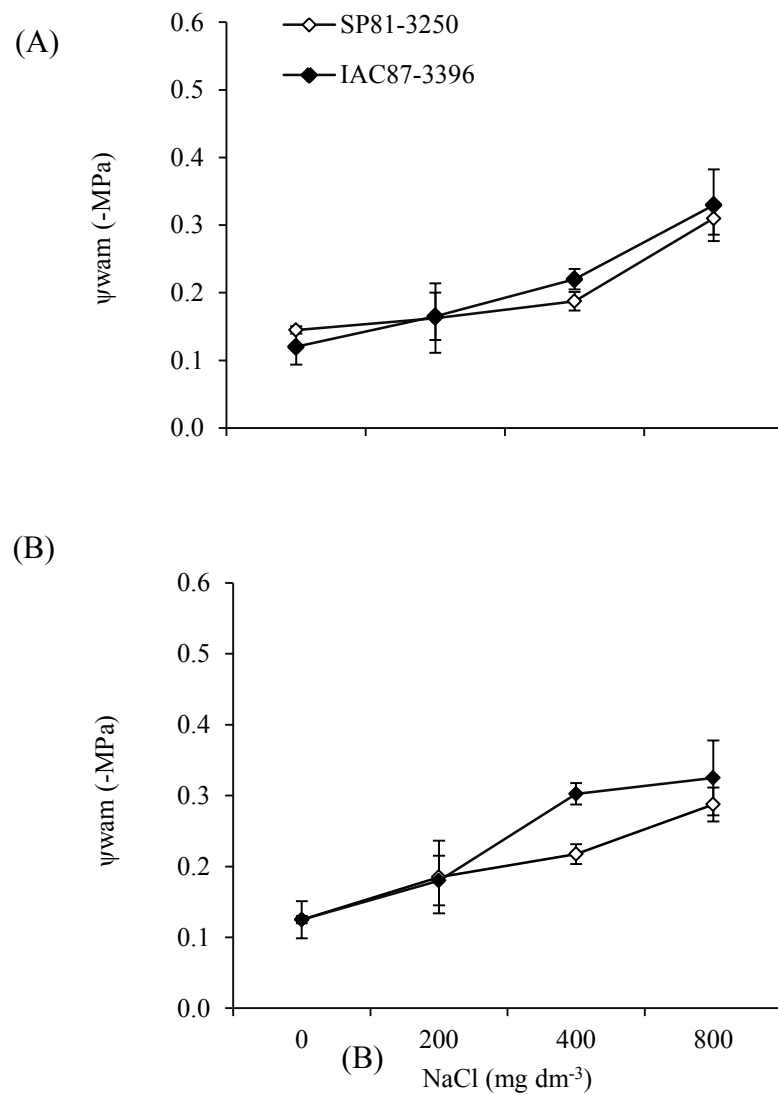


Figura 2. Potencial de água de antemanhã ( $\psi_{wam}$ ) em duas cultivares de cana-de-açúcar avaliadas aos 15 (A) e 30 (B) dias após aplicação das concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> NaCl no solo. Valores são médias  $\pm$  DP ( $n=4$ ).

### 3.2. *Fingerprinting* de metabólitos

O perfil cromatográfico dos genótipos SP81-3250 e IAC87-3396 em condição de estresse salino e controle estão ilustrados nas figuras 3A e 3B. As amostras compreendidas entre 1 e 8 são referentes ao genótipo SP81-3250 e as compreendidas entre 9 e 16 são referentes ao genótipo IAC87-3396. Os números representados por 1, 2, 3 e 4, bem como 5, 6, 7 e 8 são referentes às concentrações de 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl. Todas as análises foram realizadas em triplicata, mas por questão de visualização, somente um cromatograma de cada amostra está ilustrado.

Como pode ser observado no cromatograma há uma pequena diferença no perfil qualitativo sob diferentes condições de estresse salino devido ao aumento do pico em 27,5 minutos e na região entre 2,5-10 minutos em ambos os genótipos. Além do que podem ser observadas diferenças qualitativas entre os genótipos na região de 17,5-27,5 minutos. Os picos observados na região entre 2-12 minutos são referentes aos ácidos fenólicos e as flavonas C e O glicosilados entre 17-40 minutos (COUTINHO, 2014).

Para uma avaliação mais minuciosa dos dados, foi realizada a PCA como método exploratório para uma melhor visualização do *fingerprinting* metabólico. O gráfico de *scores* representa as amostras no espaço. No gráfico de *scores* PC1 x PC2 (Figura 3) foi possível observar três grupos, sendo o controle (C) na parte negativa da PC1 e positiva da PC2, o genótipo IAC87-3396 na parte positiva da PC1 e PC2, e a SP81-3250 na parte negativa da PC1 e PC2. A PC2 foi responsável pela discriminação entre os genótipos. A replicata 2\_2 é considerada *outlier* por estar fora do limite de confiança de 95%. Além da discriminação entre as amostras, pode ser observada a tendência das amostras da parte positiva da PC2 para a parte negativa quando aumenta a concentração de solução salina e o tempo de 15 para 30 dias.

Através do gráfico de *loadings* PC1 x PC2 foi possível localizar quais as variáveis (picos cromatográficos) responsáveis pela discriminação entre as amostras no gráfico de *scores*. Como podemos observar no gráfico de *loadings* da figura 4, a discriminação entre as amostras na PC1 é devido a maior quantidade de flavonas nas amostras localizadas na parte positiva da PC1, principalmente derivados de

tricina (32,5-35 minutos, figura 1) nas amostras sob maior concentração de solução salina, enquanto que as amostras controle localizadas na parte negativa da PC1 e positiva da PC2 mostraram maior correlação com os ácidos fenólicos, principalmente o ácido clorogênico (9 minutos na figura 1). Com base nos resultados apresentado acima, podemos inferir que, de uma forma muito sutil, há um aumento na concentração de derivados de flavonas nas amostras sob maior condição de estresse salino, enquanto que as amostras com menor concentração salina, como a controle mostrou maior correlação com o ácido clorogênico.

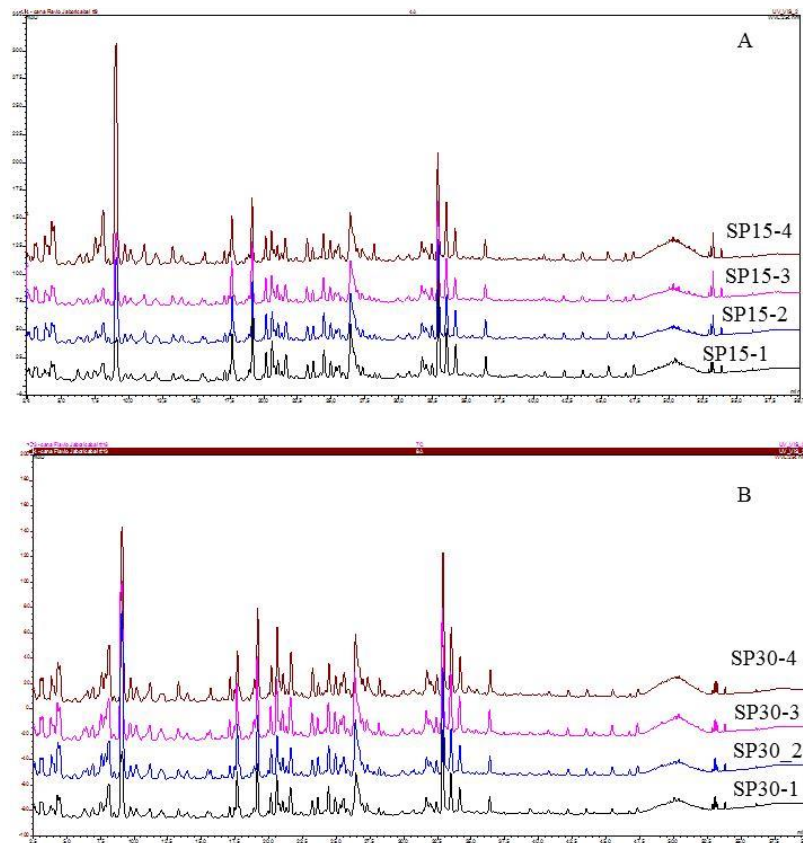


Figura 1. Perfil cromatográfico do extrato das folhas da cultivar SP81-3250. Araraquara, São Paulo. 2012-2013. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl respectivamente.

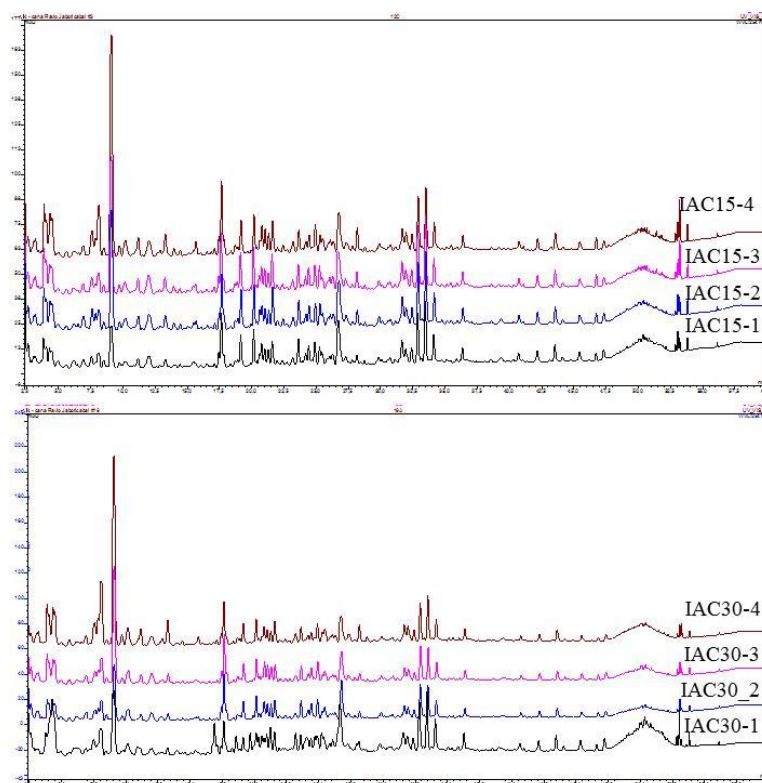


Figura 2. Perfil cromatográfico do extrato das folhas da cultivar IAC87-3396. Araraquara, São Paulo. 2012-2013. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações 0, 200, 400 e 800 mg dm<sup>-3</sup> de NaCl respectivamente.

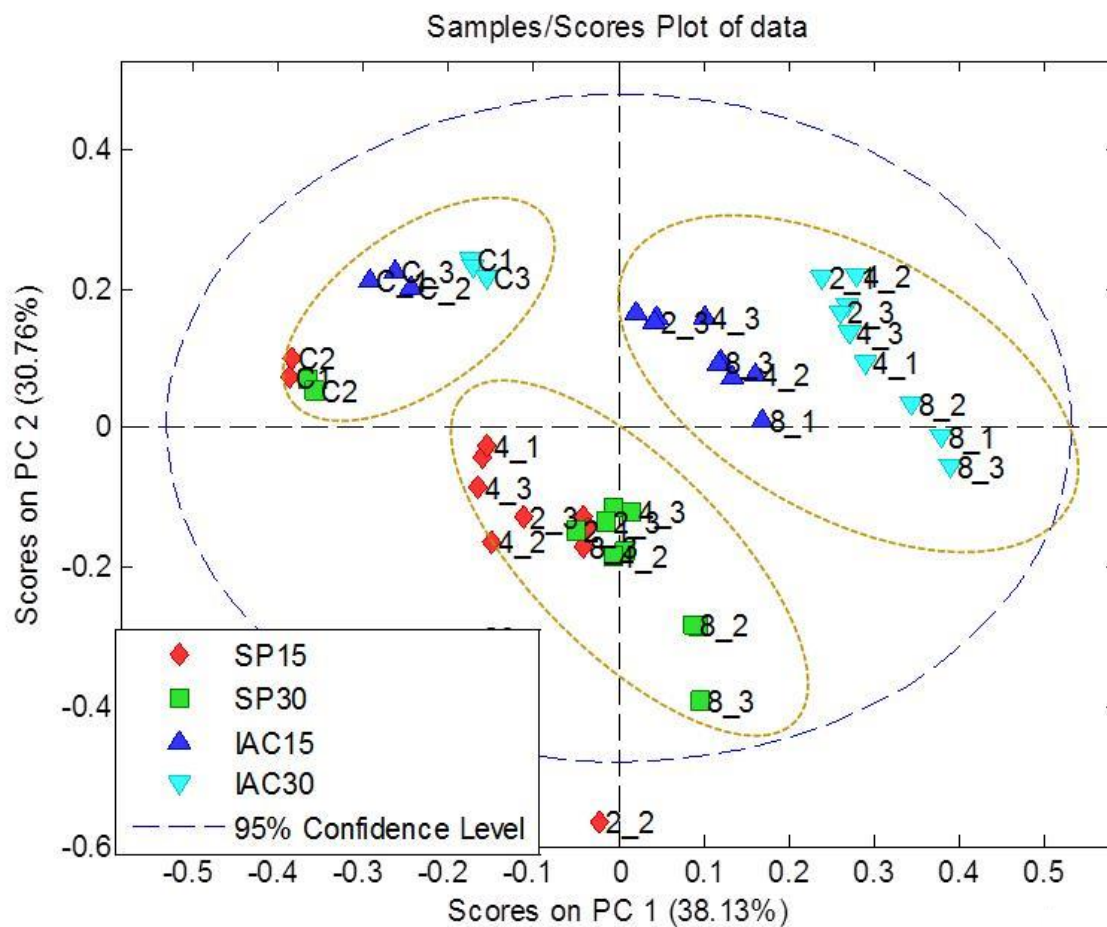


Figura 3. Gráfico de scores PC1 x PC2 do perfil cromatográficos dos genótipos SP81-3250 e IAC87-3396. Os números 1, 2, 3 e 4 correspondem às concentrações 0, 200, 400 e 800  $\text{mg dm}^{-3}$  de NaCl respectivamente. Cada concentração é representada por três replicatas (1, 2 e 3).

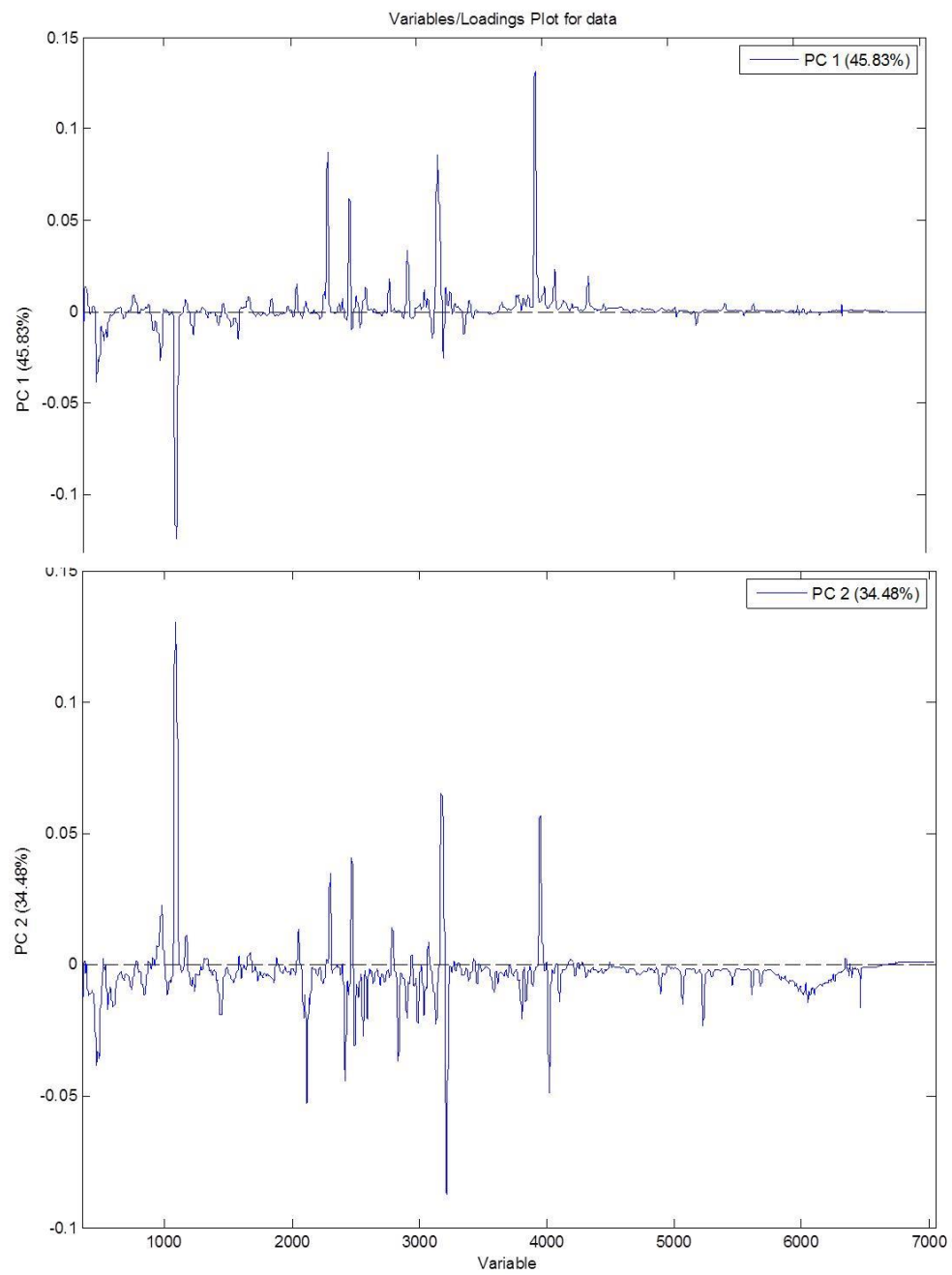


Figura 4. Gráfico de Loadings PC1 x PC2.

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo, o teor de Na foi determinado com o objetivo de avaliar a capacidade das cultivares de cana-de-açúcar em absorvê-lo e translocá-lo à parte aérea a fim de se ter um referencial de seu efeito tóxico. Os resultados mostraram que, com o aumento da severidade do estresse salino os teores foliares de Na em ambas as cultivares de cana-de-açúcar incrementaram, desencadeando tanto o estresse osmótico, evidenciado pela redução do  $\Psi_{w_{am}}$  como toxicidade por acúmulo de Na e isto ficou evidente na cv. IAC87-3396, a qual apresentou maior teor de Na e menor  $\Psi_{w_{am}}$  (Figura 2B). Os resultados encontrados neste estudo, bem como nos de Patade et al. (2008), Patade et al. (2011) e Murad et al. (2014), confirmam o efeito iônico e osmótico do estresse salino em plantas de cana-de-açúcar, dado a absorção crescente de Na e redução  $\Psi_{w_{am}}$  em ambas as cultivares de cana-de-açúcar nos dias de avaliação.

Alguns estudos reportam o acúmulo de metabólitos secundários em cana-de-açúcar, como resultado do estresse salino (WAHID; GHAZANFAR, 2006). No presente estudo, o estresse salino promoveu maior concentração de flavonas e ácido clorogênico nas cultivares de cana-de-açúcar. Flavonas e ácido clorogênico caracterizam-se por serem metabólitos secundários produzidos por plantas e pertencerem ao grupo dos compostos fenólicos.

Em plantas, estes compostos estão associados a vários tipos de respostas ambientais. Por exemplo, o ácido clorogênico tem sua concentração aumentada em plantas sob excesso de radiação ultravioleta ou luz visível, danos mecânicos e infecções por patógenos (FARAH; DONAGELO, 2006) e o aumento de sua concentração nas cultivares de cana-de-açúcar do presente estudo pode ter ocorrido em resposta à restrição hídrica dos tratamentos menos severos de salinidade. Entretanto, o padrão de resposta do ácido clorogênico mostra-se dependente da espécie de planta e órgão analisado, pois em algodoeiro submetido à limitação hídrica a concentração foliar deste ácido manteve-se baixa em comparação ao tratamento controle (YILDIZ-AKTAS et al., 2009).

O aumento na concentração dos derivados de flavonas nas cultivares de cana-de-açúcar nos tratamentos salinos mais severos pode estar relacionado à

capacidade antioxidante destes compostos, pois a restrição hídrica desencadeada pelo estresse salino resulta em estresse oxidativo, com a formação de radicais livres em vários sítios celulares. Nesse sentido, supõe-se que as propriedades relacionadas aos compostos fenólicos, destacando-se os flavonóides, são baseadas principalmente na sua atividade antioxidante, atuando como seqüestradores de radicais livres (PRIOR; CAO, 2000) e quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos (TERAO et al., 1999), contribuindo para reduzir o estresse oxidativo. Portanto, sugere-se que tanto o ácido clorogênico como as flavonas encontradas nos tecidos foliares das cultivares estudadas de cana-de-açúcar podem contribuir como uma estratégia a mais na diminuição do estresse oxidativo resultante dos tratamentos salinos adotados neste estudo.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados acima, podemos inferir que de uma forma muito sutil que há um aumento na concentração de derivados de flavonas nas amostras de cana-de-açúcar sob maior severidade de estresse salino, enquanto que as amostras com menor severidade do estresse salino mostraram maior correlação com o ácido clorogênico. Possivelmente estes metabólitos encontrados constituam uma estratégia visando diminuir o estresse oxidativo resultante da salinidade em cana-de-açúcar.

## 6. REFERÊNCIAS

ARBONA, V.; MANZI, M.; de OLLAS, C.; GÓMEZ-CADENAS. Metabolomics as a tool investigate abiotic stress Tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, p. 4885-4911, 2013.

ARORA, A.; BYREM, T. M.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 102-109, 2000.

ASHRAF, M. Y.; IQBAL, N.; AKHTER, J. Modulation of physiological and biochemical metabolites in salt stressed rice by foliar application of zinc. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, p. 447-457, 2014.

CATHERINE, A. R. Antioxidant properties of phenolic. **Trends Plant Science**, Netherlands, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

COUTINHO, I. D. **Dinâmica do metabolismo micromolecular da cana-de-açúcar em resposta à infecção com o fungo *Puccinia kuehnii* (ferrugem alaranjada)**. 2014. 177 f. Tese (Doutorado em química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2014.

DETTMER, K.; ARONOV, P. A.; Hammock, B. D. Mass spectrometry-based Metabolomics. **Mass Spectrometry Review**, v. 26, n. 1, p. 51-78, 2007.

EGESKOG, A.; FREITAS, F.; BERNDDES, G.; SPOROVEK, G.; WIRSENIUS, S. Greenhouse gas balance and land use changes associated with the planned expansion (to 2020) of the sugarcane ethanol industry in Sao Paulo, Brazil. **Biomass and Bioenergy**, Netherlands, v. 63, p. 280-290, 2014.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FIEHN, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 48, p. 155-171, 2002.

FRANÇA, S. C.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. A.; PUGA, R. D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J. O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 243-50, 2001.

FRANCOISE, L. E.; MAAS, E. V. Crop response and management on salt affected soils. In: PESSARAKLI M, (Ed.). **Handbook of plant and crop stress**. New York: Marcel Dekker Press Inc., 1999. p. 169-201.

FRANGNE, N.; EGGMANN, T.; KOBLISCHKE, C.; WEISSENBO, W.; MARTINOIA, E.; KLEIN, M. Flavone glucoside uptake into barley mesophyll and arabidopsis cell culture vacuoles. Energization occurs by  $H^+$ -antiport and ATP-binding cassette-type mechanisms. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 128, n. 2, p. 7263, 2002.

LEME, G. M.; COUTINHO, I. D.; CRESTE, S.; HOJO, O.; CARNEIRO, R. L.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. HPLC - DAD method for metabolic fingerprinting of the phenotyping of sugarcane genotypes. **Analytical Methods**, Cambridge v. 6, p. 7781-7788, 2014.

MILIĆ, B. L.; DJILAS, S. M.; ČANADANOVIĆ-BRUNET, J. M. Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. **Food Chemistry**. v. 61, n. 4, p. 443-447, 1998.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, Lancaster, v. 167, p. 645-662, 2005.

PATADE, V.Y.; 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 Interaction**, v. 6, n. 4, p. 275-282, 2011.

PATADE, V.Y.; SUPRASANNA, P.; BAPAT, V.A. Effects of salt stress in relation to osmotic adjustment on sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) callus cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 55, n. 3, p. 169-173, 2008.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, p. 263-269, 2012.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implication. **Horticulturae Science**, Netherlands, v. 35, p. 588-592, 2000.

QI, X.; ZHANG, D. Plant metabolomics and metabolic biology. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 56, n. 9, p. 814-815, 2014.

RUDORFF, B. F. T.; AGUIAR, D. A.; SILVA, W. F.; SUGAWARA, L. M.; ADAMI, M.; MOREIRA, M. A. Studies on the rapid expansion of sugarcane for ethanol production in São Paulo State (Brazil) using Landsat Data. **Remote Sensing**, Basel, v. 2, n. 4, p. 1057-1076, 2010.

TERAO, J.; PISKULA, M. K. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. **Nutrition**, v. 15, n. 10, p.790-791, 1999.

ÚNICA – União da Indústria de cana-de-açúcar. Disponível em: < <http://www.unica.com.br/?idioma=1>>. Acesso em: 10/12/2014.

WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 263-276, 2010.

WAHID, A.; RAO, A. R.; RASUL, E. Identification of salt tolerance traits in sugarcane lines. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 9-17, 1997.

WAKEEL, A. Potassium-sodium interactions in soil and plant under saline-sodic conditions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, n. 3, p. 344-354, 2013.

WECKWERTH, W. Metabolomics in systems biology. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 669-689, 2002.

WILFRED, V., NICHOLSON, R., 2006. Families of phenolic compounds and means of classifications. In: Wilfred, V.; Nicholson, R. (Eds.). **Phenolic compound biochemistry**. Springer, 2006. p. 1-34.

YILDIZ-AKTAS, L.; DAGNON, S.; GUREL, A.; GESHEVA, E.; EDREVA, A. Drought tolerance in cotton: involvement of non-enzymatic ROS-scavenging compounds. **Journal Agronomy & Crop Science**, v. 195, n. 4, p. 1-7, 2009.