

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO E ACÚMULO DE
PROLINA LIVRE EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR
SUBMETIDAS AOS ESTRESSES HÍDRICO E ÁCIDO NO
SOLO**

Andressa Freitas de Lima Rhein
Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO E ACÚMULO DE
PROLINA LIVRE EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR
SUBMETIDAS AOS ESTRESSES HÍDRICO E ÁCIDO NO SOLO

Andressa Freitas de Lima Rhein

Orientadora: Profa. Dra. Durvalina Maria Mathias dos Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Julho – 2008

Rhein, Andressa Freitas de Lima
R469a Atividade da redutase do nitrato e acúmulo de prolina livre em
raízes de cana-de-açúcar submetidas aos estresses hídrico e ácido
no solo / Andressa Freitas de Lima Rhein. -- Jaboticabal, 2008
ix, 67 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

Orientador: Durvalina Maria Mathias dos Santos

Banca examinadora: Isabel Cristina Leite, Marcelo de Almeida
Silva

Bibliografia

1. *Saccharum spp.*-sistema radicular. 2. Metabolismo do
nitrogênio. 3. Estresses abióticos-osmoprotetor. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRESSA FREITAS DE LIMA RHEIN - nascida no município de São Paulo, em 05 de agosto de 1979, Engenheira Agrônoma, graduada pela UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), *Campus* de Jaboticabal, SP, em 06 de janeiro de 2006. No período de setembro de 2002 a julho de 2005, foi bolsista do Programa de Educação Tutorial da Secretaria de Ensino Superior do Ministério da Educação – PET MEC/SESu e de agosto a dezembro de 2005, participou de atividades de monitoria na disciplina de Artropodologia junto ao Departamento de Entomologia da UNESP/FCAV. No período de março de 2003 a dezembro de 2007 foi professora de Química Inorgânica do Cursinho Pré-Vestibular Ativo da UNESP/FCAV, onde também atuou como coordenadora durante dois anos consecutivos (2006 e 2007), ambas as atividades em caráter voluntário. Em março de 2006, ingressou no programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *Campus* de Jaboticabal, desenvolvendo a pesquisa da dissertação como bolsista da CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, vinculada à área de Fisiologia do Estresse. No ano de 2007 e início de 2008 também atuou como professora voluntária de Química Inorgânica do Cursinho Unificado Popular, entidade mantida pelo Lar do Colégio Santo André, da cidade de Jaboticabal. Também em 2007 foi aprovada em concurso da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para o cargo de Assistente Agropecuário I (classificação geral: 714º lugar). Em julho de 2008 foi aprovada em concurso da Secretaria Municipal do Verde e Meio Ambiente da Prefeitura do Município de São Paulo para os cargos de Especialista em Meio Ambiente I com Habilitação em Engenharia Agrônoma (classificação geral: 25º lugar) e de Especialista em Desenvolvimento Urbano I Disciplina de Engenharia Agrônoma (classificação geral: 186º lugar).

“Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela como único objetivo, obtém, ao cabo, a capacidade de fazer qualquer coisa”.

Mahatma Ghandi (*1869 - †1948)

A minha querida mãe Sandra Lúcia Freitas de Lima Rhein, que sempre foi o motivo de toda minha luta, que com um abraço renova minhas forças e me faz sentir que tudo vale à pena... A quem devo todos os valores e ensinamentos, exemplo de caráter, honestidade e determinação. Obrigado pelo amor, carinho e toda atenção dedicada em todos os momentos de minha vida.

A minha querida irmã Thammy Freitas de Lima Rhein cuja presença e dedicação foram imprescindíveis para o meu sucesso acadêmico. Alicerce... Inspiração... A quem devo o significado do verdadeiro amor...

Agradeço pela presença constante, por compartilharem todas as lutas, dificuldades, conquistas e vitórias, por me ensinarem a viver...

OFEREÇO

Ao meu querido pai Wilson da Silva Rhein

Pelos grandes valores e ensinamentos de vida, pelo caráter, perseverança e determinação.

Ao meu querido padrasto Luís Barbosa Vargas

Pelo carinho, apoio, incentivo e luta sempre ao lado de minha mãe em favor do meu crescimento profissional. Minha eterna gratidão.

Aos meus avós Rosaly Freitas de Lima e José Mariano de Lima, Tereza da Silva Rhein e Wilson Ramos Rhein (in memoriam) pela luta incessante em favor do meu bem-estar, pelo amor, apoio e dedicação, acompanhando-me em pensamento mesmo que distantes.

Aos meus tios Ana Cristina Freitas de Lima, Marco Aurélio Freitas de Lima e sua esposa, Ana Cristina Mendes de Lima, pelo auxílio financeiro e incentivo fundamentais para esta difícil conquista.

A minha querida e inesquecível família

Por todo amor, carinho, incentivo e atenção dedicados nesta difícil etapa de minha vida. Obrigada...

A atenciosa e dedicada família Pavan da Silva, que adquiri com todo amor, carinho e gratidão...

Ao meu amor Diogo Pavan da Silva

Por sempre estar ao meu lado compartilhando todos os momentos agradáveis e difíceis que tenho passado. Por sua completa doação e amor... Que com um singelo olhar me fortalece e a quem devo a certeza de dias melhores para sempre...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas dificuldades da vida que contribuíram para o meu crescimento pessoal, pela possibilidade e valorização de mais uma grande conquista.

À Prof^a. Dr^a. Durvalina Maria Mathias dos Santos, uma profissional exemplar e de grande competência, que me orientou durante toda a graduação e o mestrado, mostrando-me o verdadeiro significado da disciplina e do profissionalismo. Agradeço pela orientação incomensurável, grande amizade e confiança, determinantes para minha formação acadêmico-científica.

Ao Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), por toda a atenção e auxílio dispensados, além de seus valiosos conselhos e amizade que sempre acolheram minhas lágrimas nos momentos mais difíceis.

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA Pólo Regional Centro-Oeste Jaú-SP, por intermédio do Pesquisador e excelente profissional Dr. Marcelo de Almeida Silva que, gentilmente, forneceu as mudas da cv. IAC91-5155 de cana-de-açúcar, sem as quais não seria possível a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Orlando Di Mauro, do Departamento de Produção Vegetal da UNESP/FCAV, pela concessão do uso da casa de vegetação para a montagem e condução experimentais.

Ao Prof. Dr. José Frederico Centurion, do Departamento de Solos e Adubos da UNESP/FCAV, pelas valiosas sugestões quanto ao solo utilizado no trabalho e aos procedimentos adequados para a montagem e condução do experimento, e pela realização das análises de solo.

Ao Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta, do Departamento de Tecnologia da UNESP/FCAV, pelas informações indispensáveis quanto às análises da atividade da redutase do nitrato e pela utilização do Laboratório de Bioquímica de Plantas para a determinação da atividade enzimática.

Ao Prof. Dr. Manoel Vitor Franco Lemos, do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da UNESP/FCAV, pela amizade, atenção e grande auxílio na elaboração do Summary.

Aos Professores responsáveis pela banca de qualificação, Dr. José Frederico Centurion e Dr. Jairo Osvaldo Cazetta, e aos Profissionais da comissão examinadora, Prof^ª. Dr^ª. Isabel Cristina Leite e Dr. Marcelo de Almeida Silva, pela disponibilidade no exercício da avaliação, pelas sugestões salutareis que muito contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho e de minha formação acadêmica, além da grande amizade e profissionalismo.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação e da Seção de Graduação da UNESP/FCAV, pela valiosa amizade, profissionalismo e auxílio em momentos difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos, indispensável ao prosseguimento e finalização do trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, pela formação acadêmico-científica e crescimento profissional.

À grande amiga Karina Mitie Navarro, pela amizade desmedida que desde adolescência nos acompanha repleta de carinho, cumplicidade e respeito.

Às minhas queridas e inesquecíveis irmãs, amigas e companheiras da república “Rancho das Ditas”: Rachel Rattis Motta, Tatiane Moreno Ferrarias, Aline Silva e Paula e Michele do Carmo Souza, pela amizade, incentivo, irmandade, solidariedade, convivência, carinho, afeto e apoio indelévels nos momentos mais difíceis da minha vida, a vocês minha eterna e singela gratidão...

À nova geração das “Ditas”: Josiane e Patrícia, pelo companheirismo e pelas horas de descontração.

À grande amiga Samira Domingues Carlin, pela inesquecível amizade, companheirismo, carinho, afeto e inabalável convivência durante a realização deste trabalho.

À minha “mãezinha” e “protetora” Marisa, amiga de todas as horas, pela inesquecível convivência, amizade, carinho, afeto, compreensão e apoio nas horas mais difíceis, a você destino infindáveis gratidão e respeito...

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal: Adriano, Eric, Gisele Bonacin, Giuliana, Juliana, Maísa, Marco, Maria Letícia, Luiz Felipe, Rafaela, Vanessa e Vinícius, pela agradável convivência e momentos de descontração.

Aos meus queridos amigos Adão Marin, Antônio Machado (Tonhão) e Rodrigo Vezzani Franzé (Bolaxão) pela amizade, afeto, respeito, companheirismo e auxílio profissional, fundamentais para a continuidade deste trabalho.

À técnica do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Sônia Maria Raymundo Carregari, pelo grande amor, afeto e carinho característicos de uma verdadeira mãe, destinando-me valiosa amizade, momentos agradáveis e incomensurável auxílio profissional na execução deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da UNESP/FCAV Aldo Antônio de Souza, Jamil Aparecido Ferraz, Maria Lucina de Oliveira Moraes da Silva, José Valcir Fidelis Martins e Ivana Aparecida Martucci Garcia, pela valiosa amizade, momentos agradáveis e profissionalismo.

Ao inesquecível Grupo PET Agronomia e ao tutor Prof. Dr. José Eduardo Corá, pela oportunidade em fazer parte de um programa cuja consciência coletiva, a harmonia, a amizade e o amor à profissão sedimentam a ideologia do grupo.

Aos alunos, professores e coordenadores do Cursinho Pré-Vestibular Ativo da UNESP/FCAV e do Cursinho Unificado Popular do Lar do Colégio Santo André, pela amizade, agradável convivência, oportunidade de lecionar e compartilhar histórias de vida, essenciais para o meu crescimento pessoal.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iv
SUMMARY	v
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	3
2.1.1 Origem e importância econômica.....	3
2.1.2 Aspectos gerais da cultura	6
2.2 Estresses abióticos	8
2.2.1 Deficiência hídrica no solo	8
2.2.2 Acidez do solo.....	10
2.3 Mecanismos de tolerância aos estresses abióticos	12
2.3.1 Atividade da redutase do nitrato	12
2.3.2 Prolina livre	15
III. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Cana-de-açúcar cv. IAC91-5155	18
3.2 Instalação e condução experimental	19
3.3 Tratamentos de disponibilidade hídrica e acidez do solo.....	20
3.4. Coleta e preparo das amostras	24
3.5. Avaliações bioquímico-fisiológicas	24
3.5.1. Atividade da redutase do nitrato.....	24
3.5.2. Teores de prolina livre.....	25
3.5.3. Crescimento inicial	26
3.6. Tratamento estatístico	27
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Atividade da redutase do nitrato	28
4.2. Teores de prolina livre	35
4.3. Crescimento inicial das raízes	47
V. CONCLUSÕES.....	51
VI. REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise química e granulométrica de um Latossolo Vermelho distrófico.	21
Tabela 2. Análise química de um Latossolo Vermelho distrófico, após 30 dias de incubação com calcário calcinado (PRNT 130%).	23
Tabela 3. Análise de variância da atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.	29
Tabela 4. Regressão polinomial da atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.	30
Tabela 5. Análise de variância dos teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.	37
Tabela 6. Regressão polinomial dos teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.	38
Tabela 7. Análise de variância e teste de Tukey do crescimento de raízes (diâmetro médio; densidade e massa seca) de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.	50

APÊNDICE

Tabela I. Teste de Tukey da atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.	vi
Tabela II. Desdobramento do teste de Tukey da atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.	vi
Tabela III. Teste de Tukey dos teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.	vii
Tabela IV. Desdobramento do teste de Tukey dos teores de prolina livre raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.	vii

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez moderada do solo, durante 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.....	31
Figura 2. Atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica moderada e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.....	32
Figura 3. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Ausência de estresse ácido ($A_1 = 55\%$) nos tratamentos de estresse hídrico. Jaboticabal, SP. 2006-2007.	41
Figura 4. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Estresse ácido moderado ($A_2 = 33\%$) nos tratamentos de estresse hídrico. Jaboticabal, SP. 2006-2007.	42
Figura 5. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Estresse ácido severo ($A_3 = 23\%$) nos tratamentos de estresse hídrico. Jaboticabal, SP. 2006-2007.	43
Figura 6. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Ausência de estresse hídrico ($H_1 = 70\%$) nos tratamentos de estresse ácido. Jaboticabal, SP. 2006-2007.	44
Figura 7. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Estresse hídrico moderado ($H_2 = 55\%$) nos tratamentos de estresse ácido. Jaboticabal, SP. 2006-2007.	45
Figura 8. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Estresse hídrico severo ($H_3 = 40\%$) nos tratamentos de estresse ácido. Jaboticabal, SP. 2006-2007.	46

APÊNDICE

Figura I. Diâmetro de raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito da disponibilidade hídrica do solo, após 60 dias.	viii
Figura II. Densidade de raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito da disponibilidade hídrica do solo, após 60 dias.	viii
Figura III. Densidade de raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito da acidez do solo, após 60 dias.	ix
Figura IV. Massa seca de raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito da disponibilidade hídrica do solo, após 60 dias.	ix

ATIVIDADE DA REDUTASE DO NITRATO E ACÚMULO DE PROLINA LIVRE EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS AOS ESTRESSES HÍDRICO E ÁCIDO NO SOLO

RESUMO – No presente trabalho verificou-se a atividade da redutase do nitrato, o acúmulo de prolina livre e o crescimento inicial em raízes de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, considerada tolerante à seca, sob interação dos estresses hídrico e ácido no solo. O estudo teve o intuito de propor a utilização destes compostos como indicadores bioquímico-fisiológicos, para aferir o grau de tolerância em plantas jovens de cana-de-açúcar cultivadas sob efeito dos estresses associados. Aos 30 dias de idade, as mudas, originadas da brotação de gemas, foram transferidas para vasos com 12 dm³ de Latossolo Vermelho distrófico e submetidas à associação de três tratamentos de disponibilidade hídrica: sem estresse (70%), estresse moderado (55%) e estresse severo (40%), de acordo com a capacidade de campo, e três níveis de acidez no solo: sem estresse (55%), estresse moderado (33%) e estresse severo (23%), considerando-se o índice de saturação por bases. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 3x3, com quatro repetições. Aos 60 dias sob associação dos estresses foram determinados os teores de prolina livre, a atividade da redutase do nitrato e o crescimento inicial do sistema radicular de plantas jovens de cana-de-açúcar. Pelos resultados obtidos evidenciou-se que a redução da atividade da redutase do nitrato ocorreu em moderada acidez e restrição hídrica associadas à severidade dos estresses. O acúmulo de prolina livre pode ser considerado indicador fisiológico em plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob condições severas de disponibilidade hídrica e acidez do solo. A deficiência hídrica reduziu o crescimento das raízes.

Palavras-Chave: crescimento inicial, estresses abióticos, nitrogênio, osmoprotetor, raiz, *Saccharum* spp.

NITRATE REDUCTASE ACTIVITY AND FREE PROLINE ACCUMULATION IN SUGARCANE ROOTS SUBMITTED TO WATER AND ACID STRESS IN SOIL

SUMMARY – In the present work it was observed the nitrate reductase activity, the accumulation of free proline, and the sugarcane cv. IAC91-5155 roots initial growth, under interaction between the water and acid stress in soil. The study reasoning was to propose the use of these compounds as biochemical-physiological indicators, so as to detect the tolerance level of sugarcane seedlings grown under the effect of the stress factors. After 30 days the seedlings, originated from the shoot sprouting, were transferred to pots with 12 dm³ of dystrophic Red Latosol and submitted to three treatments of water availability: no stress (70%), moderate stress (55%) and severe stress (40%), in accordance with field capacity and three acidity treatments: no stress (55%), moderate stress (33%) and severe stress (23%), considering the base saturation index. The experimental design was in randomized blocks under factorial scheme of 3x3, with four replicates. After 60 days under the stress association, the levels of free proline, the nitrate reductase activity and the growth of the sugarcane roots system were evaluated. The results indicate that the reduction of the nitrate reductase activity took place under moderate levels of acidity and water restriction associated to the stress intensities. The accumulation of free proline can be considered as a biochemical-physiological indicator for sugarcane cv. IAC91-5155 seedlings, when under the interaction of soil severe stress conditions. The water deficiency reduced the roots growth.

Keywords: initial growth, abiotic stresses, nitrogen, osmoprotector, root, *Saccharum* spp.

I. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, *Saccharum* spp., cultivada no Brasil desde o século XVI, apresentou grande expansão nas últimas três décadas do século XX, destacando-se como uma das principais plantas cultivadas no país (AGRIANUAL, 2008). Atualmente, representa um dos grandes mercados agrícolas brasileiros, com previsão de aumento de 40% na área plantada e da ordem de 100% na produção, nos próximos 10 anos (CASARIN et al., 2006). Para alcançar estas previsões, a cultura deve apresentar ganhos em produtividade, entretanto, os estresses ambientais influenciam negativamente a agroindústria canavieira. Entre os diversos fatores abióticos, a deficiência hídrica e a acidez do solo devem ser destacadas, devido aos efeitos prejudiciais causados no desenvolvimento das plantas (VITORELLO et al., 2005).

A disponibilidade hídrica do solo é um dos fatores ambientais que mais influenciam a produção da cana-de-açúcar, pois determina o estabelecimento da cultura durante o estágio vegetativo (RAMESH, 2000). O aumento do aquecimento global tem ocasionado a ampliação dos períodos de seca, influenciando de forma direta na disponibilidade de água do solo em canaviais, o que reduz significativamente os rendimentos destas áreas (TERAMOTO, 2003).

Além das condições hídricas desfavoráveis existentes no solo, a acidez também pode interferir negativamente no estabelecimento de uma cultura. Aproximadamente 66% dos solos da América do Sul são ácidos, cuja elevada saturação por alumínio é limitante para a agricultura no continente (DRUMMOND et al., 2001). Nestas regiões tropicais e subtropicais, os solos tendem a ser ácidos pela ocorrência de elevada precipitação, que lixivia quantidades apreciáveis de bases permutáveis, ou pela ausência de minerais primários e secundários, responsáveis pela reposição dessas bases (CUSTÓDIO et al., 2002).

A demanda por cultivares tolerantes às adversidades ambientais tem gerado interesse na investigação dos mecanismos fisiológicos que possam ser utilizados pelas plantas em respostas aos estresses abióticos (KAVI KISHOR et al., 2005). Dentre estes mecanismos, destacam-se o ajustamento osmótico e a atividade da redutase do nitrato.

O ajustamento osmótico é importante para evitar a diminuição do potencial hídrico celular mediante o acúmulo de solutos compatíveis (ABDUL JALEEL et al., 2007). Os compostos envolvidos na osmolaridade dos vegetais compreendem substâncias orgânicas, inorgânicas e, principalmente, aminoácidos livres, como a prolina, que se acumula no citoplasma e mantém o turgor celular sob condições de estresse, preservando a integridade das células para as atividades vitais do crescimento e desenvolvimento vegetal (BARTELS & SUNKAR, 2005).

A deficiência hídrica e a acidez do solo também influenciam negativamente o metabolismo de compostos nitrogenados, pelo fato de que o nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas (FERREIRA et al., 2002). A redutase do nitrato, principal enzima responsável pela assimilação de nitrogênio pelas plantas, tem a atividade influenciada pela disponibilidade de água e pela acidez do solo (SHARMA & DUBEY, 2005), podendo ser utilizada como parâmetro indicativo da resposta fisiológica das plantas aos estresses ambientais (OLIVEIRA et al., 2005).

Atualmente, existe a necessidade de se compreender como os vegetais respondem às condições adversas, uma vez que os mecanismos fisiológicos e bioquímicos de tolerância das plantas aos estresses ambientais ainda não estão completamente elucidados (GRENNAN, 2006). Devido à importância da cana-de-açúcar, o entendimento destes mecanismos de tolerância aos estresses contribuirá significativamente para indicar o melhor manejo visando obter maior produtividade agrícola (KAVI KISHOR et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho foi determinar o acúmulo de prolina livre e a atividade da redutase do nitrato nas raízes da cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob interação dos estresses hídrico e ácido no solo. O estudo teve o intuito de propor a utilização destes compostos como indicadores bioquímico-fisiológicos, para aferir o grau de tolerância em plantas jovens de cana-de-açúcar cultivadas sob efeito desses estresses associados.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

2.1.1 Origem e importância econômica

A cana-de-açúcar, *Saccharum* spp., originária do sudeste Asiático, na região central da Nova Guiné e Indonésia, é uma planta alógama, de ciclo semiperene e elevada rusticidade (DANIELS & ROACH, 1987). A cultura foi usada inicialmente como xarope, mas 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 deve-se aos Árabes, na época das invasões. Nesse mesmo período, os chineses a levaram para Java e Filipinas. A partir do século VIII, as conquistas árabes no Ocidente disseminaram o cultivo da cana-de-açúcar nas margens do mar Mediterrâneo (MOZAMBANI et al., 2006). A partir deste local, os portugueses e espanhóis introduziram a cana-de-açúcar nas ilhas do Cabo Verde, Canárias, Madeira, São Tomé e na África Ocidental (LANDELL et al., 2006). No Brasil, o desenvolvimento da cultura se constituiu com a criação de engenhos e plantações por meio de mudas trazidas pelos portugueses (MOZAMBANI et al., 2006).

Em 1532, Martim Afonso de Souza introduziu as primeiras mudas de cana-de-açúcar no Brasil, provenientes da Ilha da Madeira, impulsionando a formação dos primeiros engenhos no país (LANDELL et al., 2006). Essas instalações foram responsáveis pelo desenvolvimento da produção, do comércio e da cultura do Nordeste brasileiro, onde foi implantado o primeiro centro açucareiro do país (UNICA, 2004). No final do século XVI, os estados de Pernambuco e Bahia lideravam a produção mundial de açúcar, com grande repercussão no mercado europeu. No século XVII, a cultura disseminou-se pelo planalto paulista, com a região de Itu destacando-se como maior centro açucareiro do estado de São Paulo até meados do século XIX (MOZAMBANI et al., 2006).

Atualmente, metade da produção mundial de cana-de-açúcar é assegurada por

quatro nações das Américas: Brasil, Cuba, México e EUA. Os países asiáticos Índia, China e as Filipinas destacam-se por manter safras importantes. No Brasil, depois da década de 1970, a crise do petróleo tornou intensa a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, para a utilização direta em motores a explosão (hidratado) ou em mistura com a gasolina (anidro). Desde então, o álcool combustível destacou-se como matéria-prima, cuja fração principal destinava-se, sobretudo, à extração do açúcar (MOZAMBANI et al., 2006).

A cana-de-açúcar destaca-se como uma das melhores opções de fonte de energia renovável, justificando-se como importante cultura no país e no mundo, cujas perspectivas são extremamente favoráveis a médio e longo prazo. Para cada unidade de energia consumida na produção, o álcool de cana produz 8 unidades de energia equivalentes; no caso do milho, a produção é de apenas 1,3 unidades equivalentes por unidade de energia consumida (AGRIANUAL, 2008). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e detém um pouco mais de um terço da cana cultivada no mundo (CANAOESTE, 2006). Em 2005, o país produziu 386 milhões de toneladas de cana-de-açúcar nos 5,9 milhões de hectares cultivados, os quais resultaram em 17 bilhões de litros de álcool e 26,7 milhões de toneladas de açúcar. A região Centro-Sul, formada pelos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás, concentra 85% da produção do setor sucroalcooleiro, cujo maior produtor e exportador é o estado de São Paulo, responsável por 60% de todo o açúcar produzido no país (ORTOLAN, 2006).

A importância do setor sucroalcooleiro na sociedade brasileira é evidenciada pelo grande potencial na geração de empregos diretos e indiretos, além das exportações de açúcar colaborarem com o equilíbrio da balança comercial (MARQUES et al., 2006). As estimativas para a safra brasileira de 2007/08 mostram um ganho superior a 2,5% na produtividade média do país e acima de 12% na área plantada, de forma que a cana-de-açúcar ocupa atualmente 6,92 milhões de hectares, dos quais 82% concentram-se na região Centro-Sul. A colheita deve ultrapassar 547 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, representando um crescimento de 15% em relação à safra anterior. A indústria sucroalcooleira deve moer 473,2 milhões de toneladas (86,5% do total) e o restante deve

ser destinado à alimentação animal, produção de mudas e cachaça e outros fins. A redução nas cotações internacionais deve fazer com que a moagem seja destinada primordialmente à produção de álcool (53,1%), que pode atingir 21,3 bilhões de litros (22% superior à safra anterior). O álcool anidro, para mistura na gasolina, pode representar 40,3% do total produzido e o hidratado 59,6%. A produção de açúcar, estimada em 30 milhões de toneladas, deve apresentar exportação na ordem de 19 milhões de toneladas nesta safra. Com o intuito de atender à demanda internacional, o Brasil terá de produzir mais de 750 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra de 2017/18 e a área cultivada deverá ser de 11 milhões de hectares (AGRIANUAL, 2008).

Para alcançar essas previsões, a cultura deve apresentar ganhos em produtividade, de forma que novas unidades produtoras terão que ser implantadas até 2010; muitas já estão em funcionamento desde 2004. Os investimentos na área industrial estão calculados em R\$ 14,3 bilhões, dos quais R\$ 4,1 bilhões serão investidos em projetos de expansão das usinas instaladas. O aumento da área plantada deverá requisitar R\$ 7,2 bilhões (ORTOLAN, 2006).

A perspectiva de ampliação da área total de cana-de-açúcar no país, para os próximos dez anos, pode promover o deslocamento do cultivo para a região oeste paulista, que dispõe de propriedades rurais mais baratas e logística para escoamento da produção, constituindo-se em uma importante fronteira agrícola à cana-de-açúcar (VIEIRA JUNIOR et al., 2008). Estima-se que, das 40 novas usinas previstas para instalação até o ano de 2010, 30 serão implantadas no oeste do estado de São Paulo (ANSELMi, 2005).

A região Centro-Oeste brasileira também se constitui em uma área de expansão para a cultura, pois apresenta terrenos com topografia propícia à mecanização e apenas 3,3% dos 17 milhões de hectares agricultáveis, cultivados com cana-de-açúcar (IBGE, 2007). O relevo predominante na região Centro-Oeste caracteriza-se por apresentar variações de plano a ondulado, adequado à agricultura mecanizada. Os solos são antigos, profundos e, à exceção da depressão do Pantanal, bem drenados. O bioma dos cerrados apresenta solos com baixa fertilidade natural e acidez caracterizada, principalmente, pela elevada saturação por alumínio tóxico às plantas,

limitação superada pela técnica de “construção do solo de cerrado”, desenvolvida na década de 1960. Esta técnica se consistiu na adequação da fertilidade dos solos de cerrado para produção agrícola por uma sucessão de espécies pouco exigentes, como o arroz, cultivado por dois a três anos, seguido por espécies medianamente exigentes, como a soja. Após quatro a cinco anos de cultivos sucessivos com a cultura da soja, a área encontra-se apta ao plantio da cana-de-açúcar (Miyasaka, 1986 citado por VIEIRA JUNIOR et al., 2008).

A cana-de-açúcar apresenta ampla escala de adaptação sendo cultivada principalmente em regiões situadas entre os paralelos 35°N e 35°S, e no Brasil as variações climáticas possibilitam colheitas anuais de setembro a abril, no Norte-Nordeste e de maio a dezembro, no Centro-Sul (ALFONSI et al., 1987). Embora o cultivo da cana-de-açúcar se concentre nas regiões Sudeste e Nordeste, a produção se desloca preferencialmente para a Região Centro-Oeste do país, notadamente nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul (VIEIRA JUNIOR et al., 2008). Dessa forma, a cana-de-açúcar é cultivada em diferentes tipos de solos, sob influência de diversos fatores abióticos peculiares a cada região, evidenciando distintos níveis de produção (MAULE et al., 2001).

2.1.2 Aspectos gerais da cultura

A cana-de-açúcar foi descrita por Linneu, em 1753, que a classificou como *Saccharum officinarum* e *Saccharum spicatum*. Posteriormente, várias formas de classificação foram apresentadas (MOZAMBANI et al., 2006). De acordo com Cronquist (1981), a cana-de-açúcar pertence à Divisão Magnoliophyta; Classe Liliopsida; Ordem Graminales; Família Poaceae; Gênero *Saccharum*; Espécies *Saccharum officinarum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinensis*, *Saccharum barberi* e *Saccharum robustum*.

A espécie *Saccharum officinarum* L. apresenta alto teor de açúcar e baixa porcentagem de fibra, constituindo-se das chamadas “canas nobres”. Consideradas

canas tropicais, possuem colmos grossos (3,5 cm de diâmetro ou mais), sistema radicular reduzido e superficial; são exigentes quanto ao clima e solo, suscetíveis ao mosaico, mas resistentes a um grande número de outras doenças (MOZAMBANI et al., 2006). Até o século XX, a espécie *Saccharum officinarum* foi responsável por grande parte da matéria-prima mundial, entretanto, o surgimento da doença do *sereh*, posteriormente, o mosaico e a gomose contribuíram para o início do melhoramento genético, a partir de 1980 (LANDELL et al., 2006). Os programas de melhoramento genético desenvolveram híbridos resistentes aos estresses bióticos e adaptados às diversas condições ambientais, favorecendo a expansão da cultura pelo Brasil e o mundo (QUEIROZ, 2006).

Atualmente, os plantios comerciais são constituídos por híbridos provenientes do cruzamento entre as espécies do gênero *Saccharum* spp., cuja variedade Crioula, resultado da hibridação natural entre *Saccharum officinarum* e *Saccharum barberi*, foi cultivada por aproximadamente 250 anos (LANDELL et al., 2006).

A cana-de-açúcar apresenta elevada taxa fotossintética e maior eficiência na utilização de gás carbônico (CO₂) da atmosfera, caracterizando-se como uma planta de ciclo C₄. Esta cultura, embora adaptada às condições de elevada intensidade luminosa, altas temperaturas e relativa escassez de água, necessita de grandes quantidades de água, uma vez que somente 30% do peso constitui-se de massa seca e 70% de água, dependendo do estágio fenológico. A capacidade de assimilação hídrica pelas folhas é superior às outras gramíneas, de forma que o orvalho e os chuviscos, que não atingem o solo, também são absorvidos. No entanto, as raízes, através dos pêlos absorventes, apresentam maior capacidade de absorção de água (SEGATO et al., 2006).

Em virtude de apresentar ciclo semiperene, a cana-de-açúcar é influenciada por grandes variações climáticas durante o ano, o que pode interferir na produção, maturação e qualidade da cultura. Para manter índices de produção satisfatórios, esta cultura necessita de um período quente e úmido, com intensa radiação solar durante o estágio vegetativo, seguido de um período seco na fase de maturação e colheita (ALFONSI et al., 1987). A qualidade e a intensidade luminosa exercem influência no crescimento vegetativo e na maturação, pois estabelece correlação direta com a

síntese, translocação e acúmulo de carboidratos das folhas para o colmo (MARQUES et al., 2001).

A cana-de-açúcar é plenamente adaptada em regiões de clima tropical, quente e úmido (SEGATO et al., 2006). Quanto às condições edáficas, os solos arejados, profundos, férteis e com valores de pH entre 5,0 e 6,5 são satisfatórios às exigências da cultura (Van RAIJ et al., 1997; MARQUES et al., 2001). No Brasil, a cana-de-açúcar tem sido cultivada em escala comercial em todas as regiões, resultando em uma grande diversidade de condições edafoclimáticas, que ocasionam variabilidade na adaptação dos cultivares nas diversas regiões de cultivo de cana-de-açúcar (QUEIROZ, 2006).

2.2 Estresses abióticos

2.2.1 Deficiência hídrica no solo

O estresse é considerado um fator externo, que exerce influência desvantajosa sobre a planta e induz respostas em todos os níveis funcionais do organismo. Em condições naturais e agricultáveis, as plantas estão freqüentemente expostas aos estresses ambientais, os quais limitam o desenvolvimento e as chances de sobrevivência (ALEXIEVA et al., 2003).

Dentre os estresses ambientais que reduzem o crescimento e o desenvolvimento vegetal, a deficiência hídrica constitui uma das mais importantes limitações à produtividade e à distribuição dos vegetais, apresentando influência negativa em mais de 10% das áreas agrícolas do globo terrestre (BARTELS & SUNKAR, 2005), principalmente em lavouras de espécies economicamente importantes como o arroz, o milho, o trigo e a cana-de-açúcar (GARG et al., 2002). Esta cultura necessita de elevada disponibilidade de água, durante o estágio vegetativo, a fim de apresentar rendimento adequado, sendo necessárias 130 a 150 litros de água para a produção de 1Kg de massa seca (CASTRO, 2000). No decorrer dos anos, verificou-se que a

produção da cana-de-açúcar foi negativamente influenciada pela deficiência hídrica do solo, apresentando variações na produtividade (MAULE et al., 2001).

Os problemas causados pela diminuição da disponibilidade hídrica do solo são comuns nos canaviais. O aumento do aquecimento global tem gerado a ampliação dos períodos de seca, influenciando de forma direta na disponibilidade de água no solo (TERAMOTO, 2003). Nas regiões brasileiras produtoras de cana-de-açúcar observou-se, nos últimos anos, significativa redução nas quantidades de chuva, com conseqüente aumento de “veranicos”, que causam maiores prejuízos quando ocorrem no estágio vegetativo da planta (DIAS, 1999). Estes veranicos influenciaram negativamente a safra de 2005/2006 da cana-de-açúcar, determinando redução na produtividade da cultura em todas as regiões produtoras do Brasil (REVISTA ALCOOLBRAS, 2005).

Em condições de estresse hídrico, vários processos fisiológicos são alterados, tais como: fotossíntese, respiração, transpiração, abertura estomática, produção de ácido abscísico, abscisão foliar e ajuste osmótico (MARIN et al., 2006). Além disso, a deficiência hídrica provoca severos danos no crescimento vegetal, através, primordialmente, da diminuição da expansão celular. De fato, é indiscutível a importância da água para o crescimento, devido à turgidez celular ocasionada pelo influxo de água no vacúolo, quando os hormônios do crescimento vegetal (auxinas ou giberelinas) estão promovendo o alongamento celular (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Como a água é limitante para o crescimento e fundamental para a fotossíntese, a produtividade das plantas depende da quantidade disponível deste recurso e da eficiência de seu uso pelo vegetal. A diminuição da disponibilidade hídrica do solo provoca redução do alongamento celular, e conseqüentemente, do consumo de carbono e energia, sendo uma maior proporção de fotoassimilados distribuída ao sistema radicular, diminuindo dessa forma a razão parte aérea/raiz das plantas, provavelmente, porque em condições de deficiência hídrica o sistema radicular tende a se desenvolver até que sua necessidade em fotoassimilados seja igual à quantidade que é produzida na parte aérea (TAIZ & ZEIGER, 2004). Assim, as raízes desempenham importante função de tolerância às condições de deficiência hídrica e são determinantes para o estabelecimento das culturas (PADILHA et al., 2007).

Os estresses abióticos, como a deficiência hídrica, limitam a produtividade vegetal, pois são considerados problemas eminentes para a agricultura e reduzem significativamente os rendimentos das lavouras, além de restringir as latitudes e os solos onde espécies comercialmente importantes podem ser cultivadas (MITTLER, 2006). No mundo, dos 3,3 bilhões de hectares considerados aptos para a agricultura, aproximadamente 28% podem apresentar deficiência hídrica (PURCINO, 2004). Dessa forma, um dos maiores desafios da agricultura está na manutenção da produtividade sob deficiência hídrica, sendo necessária a compreensão dos mecanismos de adaptação das plantas à seca (LIZANA et al., 2006; ABDUL JALEEL et al., 2007).

2.2.2 Acidez do solo

A acidez do solo causa sérios prejuízos ao desenvolvimento das plantas (FUENTE-MARTINÉZ & HERRERA-ESTRELLA, 1999; MARIN, 2003; VITORELLO et al., 2005). No Brasil, os solos que se apresentam alcalinos ou com pH próximo ao neutro são praticamente raros (HUNGRIA & VARGAS, 2000). Na realidade, 2/3 do território nacional, isto é, mais de 500 milhões de hectares são constituídos por solos ácidos (VITORELLO et al., 2005). Assim, devido às grandes áreas de solos ácidos com possibilidade de cultivo, a importância da acidez sob o aspecto prático é relevante (CUSTÓDIO et al., 2002). Os problemas da baixa fertilidade dos solos ácidos são bem generalizados em muitas partes do mundo, sendo particularmente comuns nos trópicos úmidos (FUENTE-MARTINÉZ & HERRERA-ESTRELLA, 1999).

No mundo, cerca de 80% dos solos agricultáveis são ácidos e impossibilitam a exploração economicamente viável das culturas, uma vez que os processos de formação do solo que originam a acidez, freqüentemente, ocasionam também o esgotamento de alguns elementos essenciais para as plantas (HAMEL et al., 1998). Aproximadamente 40% desses solos aráveis e um 1/3 dos solos tropicais apresenta acidez por causa da disponibilidade do alumínio solúvel (Al^{3+}), que limita severamente o crescimento das espécies (VITORELLO et al., 2005).

O alumínio é o terceiro elemento mais abundante da crosta terrestre, após o oxigênio e o silício, sendo encontrado sob diferentes formas, como aluminossilicatos insolúveis ou óxidos (DELHAIZE & RYAN, 1995). O principal íon presente sob condições de acidez no solo está tanto na forma de Al^{3+} quanto na forma de Al(OH)^{+2} que pode tornar-se solúvel dependendo do valor do pH (HUNGRIA & VARGAS, 2000), isto é, pH menor que 5,0 permite que a forma Al^{3+} exista como hexahidrato octaedral, $(\text{Al(H}_2\text{O)}_6)^{3+}$, mas conforme o pH aumenta, ocorre sucessiva desprotonização do $\text{Al(H}_2\text{O)}_6^{3+}$ para a forma Al(OH)^{+2} e Al(OH)_2^{+1} (SIMPLÍCIO, 1999). A forma trocável Al^{3+} é, predominantemente, encontrada em 32% dos solos brasileiros com pH abaixo de 5,6 (ABREU JR. et al., 2003). A maioria dos solos destinados à produção agrícola no Brasil apresenta problemas de acidez e toxicidade por alumínio (Al^{3+}), que em níveis tóxicos no solo pode causar injúrias nas plantas, limitando o crescimento (MAZZOCATO et al., 2002).

Em plantas de diversas espécies, os efeitos prejudiciais do Al^{3+} são observados na parte aérea e no sistema radicular, contudo, por ser um elemento de pouca mobilidade dentro da planta, os efeitos biológicos do alumínio são muito mais evidentes nas raízes (SANDERSON et al., 1997; BENNET, 1998; BENNET & GRANGER, 2000; MARIN, 2003). A toxicidade do alumínio causa a inibição do alongamento celular (VASCONCELOS et al., 2002), o engrossamento e a diminuição da permeabilidade das células radiculares (BENNET & GRANGER, 2000), conseqüentemente, acarretando efeitos prejudiciais na translocação e absorção de nutrientes (BENNET, 1998), alterações em diversos processos fisiológicos e bioquímicos e, finalmente, inibição no crescimento da planta (DRUMMOND et al., 2001). Entretanto, muitas espécies de plantas comercialmente importantes, como a cana-de-açúcar, desenvolveram mecanismos de tolerância à toxicidade do alumínio, mostrando-se mais adaptadas em solos ácidos (WATT, 2003).

A necessidade de plantas tolerantes à toxicidade de alumínio vem despertando o interesse de muitas áreas de pesquisa agrícola, particularmente quando se pretende explorar eficientemente solos com acidez subsuperficial e elevado nível de alumínio, de difícil correção com manejo químico (PANDEY et al., 1994).

A demanda por cultivares tolerantes às adversidades do ambiente tem gerado interesse na investigação dos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares que possam ser utilizados pelas plantas em respostas aos estresses abióticos (KAVI KISHOR et al., 2005).

As pesquisas têm revelado que as respostas das plantas devido à ocorrência de um único estresse não podem ser diretamente extrapoladas às condições de ocorrência simultânea de diferentes estresses, pois nestas condições as respostas podem ser singulares; desta forma, os futuros programas de pesquisa deveriam investigar as respostas das plantas sob efeito associado de estresses abióticos que retratam mais fielmente a realidade dos ambientes agrícolas atuais (MITTLER, 2006).

2.3 Mecanismos de tolerância aos estresses abióticos

2.3.1 Atividade da redutase do nitrato

Os estresses ambientais também influenciam o metabolismo de compostos nitrogenados, pelo fato de que o nitrogênio é o nutriente mineral mais limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas (CAZETTA, 1997; TISCHNER, 2000). O metabolismo do nitrogênio é influenciado negativamente pelo estresse ácido causado pelo alumínio (AMARAL et al., 2000) e pela deficiência hídrica (FERREIRA et al., 2002).

O nitrogênio, constituinte de aminoácidos, nucleotídeos e enzimas, é o quarto elemento mais abundante na planta, depois do carbono, hidrogênio e oxigênio (DONATO et al., 2004). Em relação aos nutrientes essenciais, o nitrogênio é um dos mais absorvidos pela cana-de-açúcar, perdendo apenas para o potássio (COLETI et al., 2006); representa apenas 1% da matéria seca total da cana-de-açúcar e está envolvido diretamente na síntese de aminoácidos, na composição da molécula de clorofila e na produção de carboidratos (CONTIN, 2007). A necessidade do nitrogênio pela cana-de-açúcar é crucial no período de formação da cultura, isto é, imediatamente após a germinação até o fechamento do canavial, normalmente, entre o terceiro e o quinto

mês. Nessa época, ocorre a formação dos perfilhos, sendo determinante para o estande final de plantas e, conseqüentemente, para a produtividade (CONTIN, 2007).

As plantas adquirem o nitrogênio do solo na forma de nitrato, amônia, uréia e aminoácidos (MORIKAWA et al., 2004). A assimilação do nitrogênio é um processo vital que controla o crescimento e o desenvolvimento das plantas e tem efeitos marcantes sobre a produtividade final das culturas (LAM et al., 1996). Embora a maior parte do nitrogênio seja absorvida pelas plantas na forma de nitrato (PEREZ, 2003), para que possa ser utilizado é necessário que seja reduzido à amônia, e então incorporado em composto orgânico. A conversão do nitrato à amônia é constituída por várias etapas, sendo uma delas a redução do nitrato a nitrito, que é dependente da atividade da enzima redutase do nitrato, e a conversão de nitrito à amônia, pela redutase do nitrito (MEGURO & MAGALHÃES, 1987). A amônia produzida participa dos aminoácidos elaborados pelas plantas em reações catalisadas por várias enzimas e magnésio. Diversas proteínas são formadas pelas diferentes combinações de aminoácidos, nas quais 18% são representadas pelo nitrogênio (EPSTEIN, 2006).

A redutase do nitrato (RN) é primeira enzima atuante na rota de assimilação do N-inorgânico, assumindo, portanto, função de extrema importância no metabolismo vegetal, além de ser induzida, caracteristicamente, pelo seu substrato (DONATO et al., 2004). Essa enzima é uma flavoproteína formada por duas subunidades idênticas, com três grupos: FAD, heme e o complexo constituído por molibdênio (Mo) e uma molécula orgânica, a pterina, razão pela qual é, também, denominada de molibdopterina, que se localiza no citossol das células corticais da epiderme da raiz e nas células do mesófilo (Vaughn & Campbell, 1988 citados por ANDRADE NETTO, 2005).

Atualmente existem mais de 40 seqüências de aminoácidos da RN que constituem as formas da enzima nas plantas superiores, algas e fungos. A maioria dessas formas apresenta como agente redutor o NADH, produzido no citossol, ao contrário de outras, cujo agente redutor é o NADPH, formado no cloroplasto. Entretanto, algumas formas da enzima apresentam dupla especificidade, podendo utilizar ambos agentes redutores (ANDRADE NETTO, 2005).

O fluxo catalítico da RN ou a capacidade total de redução do nitrato pelas plantas depende: a) da disponibilidade de substrato no citoplasma (concentração em estado de equilíbrio do NADPH e nitrato); b) do nível funcional de RN (quantidade de RN polipeptídica e da disponibilidade de cofatores e íons metálicos, FAD, heme, Fe, Mo-MPT (molibdênio-molibdopterina) e molibdênio; c) da intensidade da atividade da RN funcional. Dessa forma, o teor de nitrato é, provavelmente, um dos metabólitos-chave que controlam a capacidade de redução do nitrato nos vegetais (CAMPBELL, 1999).

Na célula, a meia vida de uma enzima RN, recém sintetizada, é de poucas horas e, quando há diminuição do teor de nitrato para o vegetal, a quantidade da RN é rapidamente reduzida (TAIZ & ZEIGER, 2004). Em condições de deficiência hídrica no solo, ocorre decréscimo do fluxo de nitrato para a planta, contribuindo, portanto, para a redução da atividade da enzima (ANDRADE NETTO, 2005).

Ainda que as causas fisiológicas sobre tolerância ao alumínio não estejam totalmente esclarecidas, existem estudos que sugerem uma possível inter-relação entre a toxidez de alumínio e o metabolismo do nitrogênio (AMARAL et al., 2000). Isto pode ser comprovado, pelo fato da atividade da redutase do nitrato ser acentuadamente reduzida em plantas sob estresse ácido (SHARMA & DUBEY, 2005). A estimativa da atividade da enzima redutase de nitrato tem sido utilizada, com sucesso, como parâmetro indicativo da resposta fisiológica de plantas submetidas às condições adversas (OLIVEIRA et al., 2005; CASTRO et al., 2007).

A identificação e a compreensão dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos auxiliam significativamente no desenvolvimento e desempenho de novas cultivares mais produtivas (MELONI et al., 2004). Devido à importância da cana-de-açúcar, o entendimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos da tolerância aos estresses contribuirá significativamente para indicar o melhor manejo visando obter maiores rendimentos e produtividade agrícola (KAVI KISHOR et al., 2005).

2.3.2 Prolina livre

Os estresses abióticos induzem respostas metabólicas e fisiológicas, como o acúmulo de solutos compatíveis (BRAY et al., 2001). A capacidade de acúmulo de solutos compatíveis é uma resposta comum em organismos sob estresses, e vem sendo investigada, nos últimos anos, nos vegetais superiores (El-BASHITI et al., 2005; HONGBO et al., 2006). Os solutos compatíveis são moléculas ou íons atóxicos que não interferem no metabolismo e se acumulam, predominantemente, no citoplasma, onde têm a função de manter o turgor celular, além de estabilizar proteínas e estruturas celulares (BRAY et al., 2001; BARTELS & SUNKAR, 2005).

A prolina livre é um “ α – iminoácido”, que possui um grupo amino ligado a dois átomos de carbono, conferindo características de neutralidade à molécula. O acúmulo deste aminoácido pode ocorrer por duas vias paralelas nas plantas, uma direta, dependente do glutamato, e outra indireta, dependente da ornitina (KAVI KISHOR et al., 2005). Pela via direta, após a formação do glutamato semi-aldeído, a molécula se transforma em uma estrutura cíclica (Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato), precursor da prolina. A estrutura cíclica é formada pela reação intramolecular (não enzimática) dos grupos amino e aldeído do glutamato-semi-aldeído. Na via dos derivados acetilados (dependente de ornitina), a presença do grupo acetil ligado ao grupo 2-amino impede essa reação interna e uma estrutura aberta, a ornitina, é formada e pode levar à formação da estrutura cíclica da prolina, após a perda do grupo amino por transaminação (SODEK, 2004).

A prolina é particularmente reconhecida pela efetiva participação como soluto compatível (VERSLUES & BRAY, 2006). Este aminoácido é considerado osmólito-chave para o ajustamento osmótico de plantas sob deficiência hídrica e toxicidade de alumínio (GIANNAKOULA et al., 2008).

Em condições de estresse, o metabolismo de aminoácidos é amplamente alterado, sendo a síntese de proteínas diminuída e a proteólise aumentada (SODEK, 2004). Como consequência disto, ocorre a indução da biossíntese de prolina promovida pelo incremento de metabólicos como poliaminas, amônia, arginina, ornitina, glutamina

e glutamato (SILVEIRA et al., 2002). O aumento dos teores de prolina pode ativar várias funções celulares: ajustamento osmótico, reserva de carbono e nitrogênio utilizado no crescimento para restabelecimento após estresse, desintoxicação do excesso de amônia, estabilizador de proteínas e membranas e eliminadores de radicais livres. Adicionalmente, existem evidências de que a biossíntese desse aminoácido poderia estar também associada à regulação do pH citosólico ou mediação do incremento da razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, influenciando o fluxo de carbono devido à via oxidativa da pentose fosfato (SILVEIRA et al., 2002; KAVI KISHOR et al., 2005). Além disso, pode atuar ainda como fonte acessível de energia, em que uma única molécula oxidada é capaz de produzir 30 ATP (KAVI KISHOR et al., 2005).

Para tolerar os efeitos dos estresses ambientais, as plantas utilizam o mecanismo de ajustamento osmótico, processo pelo qual o potencial hídrico pode diminuir sem que haja redução da turgidez das células vegetais, permitindo a continuidade de processos fisiológicos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas (DI MARTINO et al., 2003; DESTRO, 2006). Este mecanismo capacita a célula a acumular compostos, denominados solutos compatíveis ou osmoprotetores, que preservam a integridade celular, principalmente de proteínas, enzimas e membranas, e promovem a redução do potencial hídrico durante os períodos de estresse osmótico proporcionados em condições de maior deficiência hídrica (MELONI et al., 2004). O potencial matricial (ψ_m) torna-se cada vez menor conforme aumenta a restrição hídrica no solo, e a absorção de água pelas plantas decresce devido o potencial hídrico celular ser maior que o potencial hídrico do solo (TAIZ & ZEIGER, 2004). Na realidade, o ajustamento osmótico não é devido ao aumento na concentração de solutos que ocorre durante a desidratação e na diminuição de volume celular, pois neste mecanismo o aumento na concentração de solutos compatíveis é independente das alterações no volume das células resultantes da perda de água (VERSLUES & BRAY, 2006).

De um modo geral, a prolina livre está presente em pequenas quantidades nas plantas, aproximadamente entre 1 a 5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa seca (NOGUEIRA et al., 2001) e, devido à sua importância no ajustamento osmótico, é o composto mais

estudado em plantas sob estresses abióticos (KAVI KISHOR et al., 2005). O acúmulo de prolina livre em plantas sob estresse pode ser consequência tanto do aumento na sua síntese como do decréscimo na sua degradação (FERREIRA et al., 2002).

Em muitos trabalhos, tem sido relatado o aumento dos teores de prolina livre na caracterização de cultivares tolerantes à seca (HONGBO et al., 2006). Na cultivar SP-79-1011 de cana-de-açúcar, tolerante à deficiência hídrica, ocorreu acúmulo de prolina livre conforme a redução dos níveis de água no solo (BIDOIA et al., 2006).

O acúmulo de prolina livre não ocorre somente como uma resposta das plantas à restrição hídrica, também sob condições de elevada acidez do solo, proporcionada pelo aumento da concentração de Al^{3+} (MOSSOR, 2001).

Os efeitos associados do estresse hídrico e de alumínio causam aumento nos teores de prolina, tanto na parte aérea quanto no sistema radicular de gramíneas, mas para uma melhor compreensão desses efeitos ainda necessita-se de muitas pesquisas em plantas agronomicamente importantes, pois são raras as informações na bibliografia pertinente (ZAIFNEJAD et al., 1997).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cana-de-açúcar cv. IAC91-5155

A cultivar IAC91-5155, desenvolvida pelo Programa de Melhoramento de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), foi selecionada na região de Pindorama - SP, onde predominam os argissolos. Esta cultivar também é indicada para as regiões de Ribeirão Preto e Jaú, além dos estados de Minas Gerais e Goiás (JORNAL CANA, 2004). Ainda, apresenta grande adaptação às condições da região Centro-Oeste brasileira (SOCICANA, 2006), cuja estação seca coincide com o período da colheita, estágio em que as precipitações pluviais são importunas, isto é, o regime pluvial é uma vantagem adicional para a produção da cana-de-açúcar (VIEIRA JUNIOR et al., 2008).

A tolerância à seca e aos solos de baixa fertilidade é uma das principais características que justificam o plantio da cv. IAC91-5155 nessas regiões de produção, destacando-se, ainda, pela rusticidade, elevada produtividade de soqueira em áreas de cana crua e queimada, rápido crescimento inicial e adequado fechamento das entrelinhas (ROSSETO, 2000). O período de utilidade industrial é longo, pois apresenta adequada produção na cana-planta e elevada produção nas soqueiras; alto teor de sacarose e baixo teor de fibra. Essa cultivar é apropriada para a colheita no período compreendido entre maio a outubro, com satisfatória brotação sob palha em qualquer período da safra (LANDELL et al., 2004). Ainda, por apresentar porte ereto, altura uniforme e desfolha espontânea, a cv. IAC91-5155 favorece a colheita mecânica e manual sem que haja queimadas (ROSSETO, 2000).

Quanto aos aspectos fitossanitários, é sensível à ferrugem, resistente ao carvão, à escaldadura e à broca (*Diatraea saccharalis*), considerada a praga de maior importância na cultura da cana-de-açúcar (LANDELL et al., 2004). Nas regiões mais favoráveis à ferrugem, deve ser colhida no período inicial da safra, entre maio e julho (SOCICANA, 2006).

3.2 Instalação e condução experimental

O experimento foi conduzido a 21°15'Sul e 48°18'Oeste, em casa de vegetação localizada no Departamento de Produção Vegetal da UNESP - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Campus de Jaboticabal, SP, no período de agosto a novembro de 2006. As avaliações dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária (DBAA) e do Departamento de Tecnologia, respectivamente.

Para a obtenção das mudas da cultivar IAC91-5155 de cana-de-açúcar, os toletes foram provenientes da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Pólo Regional Centro-Oeste, localizada no município de Jaú, SP.

Após 24 horas da realização da coleta, os toletes foram plantados em recipientes com capacidade de 250 cm³, contendo areia lavada e esterilizada. Para tanto, a areia foi mantida em bacias de plástico com solução de ácido clorídrico (HCl), 50 mL L⁻¹, por aproximadamente 12 horas e, a seguir, foi lavada em água corrente até a completa eliminação do ácido. Para verificar a presença do cloreto foi utilizada solução de nitrato de prata (AgNO₃) a 0,1%, pois a reação do cloreto com a prata forma um precipitado branco, o cloreto de prata (AgCl), segundo a metodologia de VINCENT (1970). Após a lavagem, a areia foi submetida à secagem em estufa de circulação forçada de ar.

As mudas, originadas da brotação das gemas, foram mantidas em areia estéril, sem qualquer restrição hídrica, durante 30 dias. Após este período, as mudas foram selecionadas quanto à sanidade e transferidas para vasos com 12 dm³ de solo com os respectivos tratamentos de disponibilidade hídrica e acidez do solo. Os efeitos da associação dos estresses hídrico e ácido no solo foram verificados aos 90 dias de crescimento das mudas (60 dias sob estresse). Este critério foi adotado devido ao primeiro estágio da cana-planta, isto é, início do desenvolvimento e perfilhamento se encerrar aos 180 dias (ROSENFELD & LEME, 1984).

3.3 Tratamentos de disponibilidade hídrica e acidez do solo

Para o estudo da cultivar IAC91-5155 de cana-de-açúcar sob efeito da interação dos estresses hídrico e ácido no solo foi utilizado Latossolo Vermelho distrófico (ANDRIOLI & CENTURION, 1999), retirado de área localizada na Fazenda Experimental da UNESP, FCAV, Campus de Jaboticabal, na profundidade de 20-40 cm. As análises química e granulométrica do solo foram realizadas no Departamento de Solos e Adubos (Tabela 1).

Foram estabelecidos três tratamentos de disponibilidade hídrica e três níveis de acidez. Os tratamentos de disponibilidade hídrica foram determinados a partir dos valores de porosidade total, microporosidade, macroporosidade e capacidade de campo (KIEHL, 1979; EMBRAPA, 1997). A porosidade total foi obtida pela diferença entre a massa do solo saturado e a massa do solo seco em estufa a 110°C durante 24h. A microporosidade do solo foi determinada pelo método da mesa de tensão com uma coluna de água de 60 cm de altura, considerando-se a densidade do solo, obtida pela relação entre a massa do solo seco, em estufa a 110°C durante 24 h, da amostra de solo indeformada e o volume do cilindro. A macroporosidade foi calculada pela diferença entre a porosidade total e a microporosidade (KIEHL, 1979; EMBRAPA, 1997). A capacidade de campo do solo foi estabelecida em 70% da microporosidade, considerada adequada para a maioria das plantas cultivadas. De acordo com os valores obtidos deste parâmetro, a quantidade de água, em litros, foi estabelecida para cada tratamento de disponibilidade hídrica: H₁ - sem estresse (70%); H₂ - estresse moderado (55%) e H₃ -estresse severo (40%).

Os vasos, umedecidos de acordo com os respectivos tratamentos H₁, H₂ e H₃, constituíram-se as unidades experimentais formadas por uma única muda de cana-de-açúcar. O controle do regime hídrico foi realizado pelo método das pesagens de acordo com COGO & GUERRA (1978). Os vasos foram pesados a cada dois dias e a reposição de água foi realizada sempre que a variação entre a massa inicial e a massa obtida no dia da avaliação fosse igual ou superior a 2%, assim a diferença entre as massas correspondeu à quantidade de água a ser completada (MARIN, 2003).

Tabela 1. Análise química e granulométrica de um Latossolo Vermelho distrófico.

Análise Química									
pH	CaCl ₂	M.O. g dm ⁻³	P resina mg dm ⁻³	K	Ca	Mg	H+Al	SB	V
						mmol _c dm ⁻³			%
4,1		14	4	1,4	3	2	42	6,4	48,4
									13
Análise Granulométrica									
Argila	Limo	Areia		Classe Textural					
		Fina	Grossa						
g Kg ⁻¹									
360	50	220	370	Argilosa					

M.O.: Matéria Orgânica; SB: Soma de Bases; T: Capacidade de Troca de Cátions; V: Saturação por Bases.

Para os níveis de acidez do solo foram adotados os critérios de Van RAIJ et al. (1997), a saber: baixa (51% a 70%), média (26% a 50%) e alta (0 a 25%). Considerando-se o índice de saturação por bases (V%) da análise de solo inicial (Tabela 1) foram estabelecidos três tratamentos de acidez: A₁ – sem estresse (V = 55%; 0,0 mol_c dm⁻³ de Al⁺³), A₂ – estresse moderado (V = 33%; 3,0 mol_c dm⁻³ de Al⁺³) e A₃ - estresse severo (V = 23%; 6,0 mol_c dm⁻³ de Al⁺³), que correspondem, respectivamente, aos valores de pH CaCl₂: 5,1; 4,6 e 4,2 obtidos através da incubação do solo com calcário calcinado, por 30 dias (Tabela 2). Salienta-se que, o tratamento de ausência de acidez (V = 55%) foi estabelecido por estar próximo ao de solos com índice de saturação por bases igual a 60%, que proporciona adequada produtividade para a cultura da cana-de-açúcar (ROSSETTO et al., 2004).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados em esquema fatorial 3x3, constituindo três tratamentos de deficiência hídrica (H₁, H₂ e H₃) e acidez do solo (A₁, A₂ e A₃), com quatro repetições por tratamento.

Tabela 2. Análise química de um Latossolo Vermelho distrófico, após 30 dias de incubação com calcário calcinado (PRNT 130%).

Análise Química												
Tratamentos De	pH CaCl ₂	M.O.	P	resina	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	m
Acidez	g dm ⁻³ mg dm ⁻³				mmol _c dm ⁻³							%
A ₁	5,1	14	4		1,4	14	11	0,0	22	26,4	48,4	55 0,0
A ₂	4,6	14	5		1,3	8	6	3,0	31	15,3	46,3	33 16,4
A ₃	4,2	14	4		1,4	6	4	6,0	38	11,4	49,4	23 34,5
Análise inicial	4,1	14	4		1,4	3	2	8,0	42	6,4	48,4	13 55,6

M.O.: Matéria Orgânica; SB: Soma de Bases; T: Capacidade de Troca de Cátions; V: Saturação por Bases; m: Saturação de Aluminio.

3.4. Coleta e preparo das amostras

Ao final do experimento, 60 dias sob efeito associado dos estresses hídrico e ácido no solo (90 DAP)¹, as plantas foram cortadas na altura do colo, para realização das avaliações fisiológicas e bioquímicas nas raízes da cultivar IAC91-5155 de cana-de-açúcar. Para tanto, imediatamente após o corte da parte aérea, o conteúdo de cada vaso foi colocado sobre peneira de 16 mm para separar o sistema radicular do solo, por meio de lavagem com direcionamento de corrente fraca de água. A seguir, as raízes foram cuidadosamente separadas em alíquotas de 1 g, as quais foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio para imediata determinação da atividade da redutase do nitrato por método *in vivo*. Os teores de prolina livre foram determinados em alíquotas de 0,5 g de raízes acondicionadas em envelopes de papel alumínio e armazenadas sob temperatura de 80°C negativos.

As raízes restantes das raízes foram, cuidadosamente, separadas, acondicionadas em frascos contendo solução de álcool a 20% (v/v) e conservadas sob refrigeração, para as posteriores determinações de densidade (mm cm^{-3}), diâmetro médio (mm) e massa seca das raízes (g).

3.5. Avaliações bioquímico-fisiológicas

3.5.1. Atividade da redutase do nitrato

A atividade da redutase do nitrato no sistema radicular da cultivar IAC91-5155 de cana-de-açúcar foi determinada de acordo com o método *in vivo* descrito por Jaworski (1971) adaptado por CAZETTA (1997).

Imediatamente após a coleta de 1 g do sistema radicular dos respectivos tratamentos, as raízes foram colocadas em frascos escuros com 10 mL do meio de incubação composto por 6,0 mL de tampão fosfato 400 mM, pH 7,2; 6,0 mL de KNO_3

¹Dias após o plantio.

200 mM; 6,0 mL de n-propanol 4% (v/v); 2,4 mL de triton X-100 a 0,1% (v/v) e 3,6 mL de H₂O deionizada. Os frascos, colocados em dessecador, foram submetidos a vácuo com uma pressão de 60 cm Hg por um minuto, com posterior reintrodução do ar, repetindo-se este procedimento por três vezes. Em seguida, os frascos foram transferidos para incubação em banho-maria a 30°C, no escuro, durante 90 minutos. A reação foi interrompida com adição de 1 mL da solução de sulfanilamida a 1%. Devido à formação de nitrito, pela reação com redutase do nitrato, 0,5 mL do meio de incubação foi retirado para a determinação do nitrito segundo NICHOLAS et al. (1976). Posteriormente, à esta alíquota adicionou-se 0,5 mL de solução de sulfanilamida a 1% e 0,5 mL de solução de cloridrato de N-1naftil-etilendiamina a 0,02 %. Esta solução final permaneceu em repouso por 20 minutos, quando, então, adicionou-se água deionizada até completar o volume final para 4,0 mL.

A leitura de absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro Beckman DU 640 no comprimento de onda 540 nm (JAWORSKI, 1971). A curva de padronização foi realizada para a determinação da concentração de NO₂⁻, utilizando-se: solução padrão (1 mg de N-NO₂ mL⁻¹), 500 µL de sulfanilamida 1% e 500 µL de cloridrato N-naftil 0,02%. Esta solução foi homogeneizada, após 20 minutos de repouso completou-se o volume para 4 mL com água deionizada e procederam-se as leituras das absorbâncias, cuja curva de padronização definiu a equação: $y = 0,8021x - 0,000$ e $R^2 = 0,9987$, por meio da qual foram determinadas as concentrações de nitrito (NO₂⁻) na solução. A atividade da enzima redutase do nitrato foi calculada com base na equação da curva de padronização, na quantidade e no tempo do meio de incubação, bem como na massa fresca do tecido vegetal. Assim, a atividade da enzima foi expressa em µg g⁻¹ h⁻¹ N-NO₂ de massa fresca de raízes.

3.5.2. Teores de prolina livre

Os teores de prolina livre do sistema radicular da cultivar IAC91-5155 de cana-de-açúcar foram determinados de acordo com o método descrito por BATES et al. (1973), que consiste na homogeneização de 0,5 g de massa fresca das alíquotas do

sistema radicular de cada tratamento com 10 mL de ácido sulfosalicílico 3%. A solução homogeneizada foi submetida a duas filtrações para eliminação parcial dos interferentes e diluída com ácido ninhidrina. Primeiramente, procedeu-se o preparo do ácido ninhidrina, para tanto, foi necessário a diluição sob aquecimento (60°C) de 1,25 g de ninhidrina ($C_9H_4O_3 \cdot H_2O$) em 30 mL de ácido acético glacial PA (CH_3COOH) e 20 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) 6 M. Em um tubo de ensaio foram colocados 2 mL do filtrado das raízes que reagiram com 2 mL de ácido ninhidrina e 2 mL de ácido acético glacial por 60 minutos em banho-maria à temperatura de 100°C. Decorrido este tempo, o tubo de ensaio foi colocado em um recipiente com gelo para finalizar a reação, em seguida foram adicionados 4 mL de tolueno ($C_6H_5CH_3$) e a solução foi homogeneizada agitando-se por 15 a 20 segundos.

A leitura de absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro Beckman DU 640 no comprimento de onda 520 nm (BATES et al., 1973). A curva de padronização foi realizada para quantificar a prolina, utilizando-se solução estoque na concentração de 1 mM de prolina PA e diluições em água destilada, segundo metodologia descrita. De acordo com as leituras de absorbância obtidas da curva de padronização definiu-se a equação: $y = 0,0287x - 0,0255$ e $R^2 = 0,99$, por meio da qual foram determinadas as concentrações de prolina livre na solução. Os teores de prolina livre nas raízes foram calculados com base na massa fresca, segundo a fórmula: $[(\mu g \text{ prolina/mL} \times mL \text{ tolueno}) / 115,5 \mu g / \mu mol] / [(g \text{ amostra}) / 5] = \mu mol \text{ de prolina/g massa fresca de raízes}$.

3.5.3. Crescimento inicial

Para a determinação do comprimento e do diâmetro médio das raízes, foi utilizado o sistema de análise de imagens Delta-T Devices LTD. Para tanto, as raízes de cada planta foram submetidas à coloração com azul de metileno por aproximadamente dois minutos e, em seguida, dispostas sobre uma bandeja com água onde foi realizada a leitura da imagem por um scanner Hewlett Packard modelo 5C. A imagem de cada sistema radicular foi analisada pelo software Delta-T Scan Root

Analysis System, que determina o comprimento (mm) e o diâmetro médio (mm) pelo método de HARRIS & CAMPBELL (1989). A densidade das raízes foi calculada dividindo-se o comprimento encontrado pelo volume de solo (mm de raiz cm^{-3} de solo).

Após a mensuração da densidade e do diâmetro médio, as raízes foram colocadas em saco de papel e levadas para secar em estufa de circulação forçada de ar em temperatura de 80°C até a obtenção da massa constante. Para determinação da massa seca foi utilizada uma balança analítica Denver Instrument Company AA-200, com precisão de 1×10^{-8} g.

3.6. Tratamento estatístico

Para a análise dos resultados obtidos foi empregado o tratamento estatístico das características individuais. A análise de variância foi realizada pelo teste F utilizando-se do teste de Tukey para a comparação entre médias. A análise da regressão polinomial foi utilizada para o desdobramento dos graus de liberdade dos fatores quantitativos, disponibilidade hídrica e acidez do solo (BANZATTO & KRONKA, 2006).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade da redutase do nitrato

A análise de variância da atividade da redutase do nitrato, nas raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo estão apresentados na Tabela 3.

De acordo com os resultados da análise de variância evidencia-se que a interação HxA (disponibilidade hídrica x acidez do solo) e a acidez do solo foram significativas para a atividade da redutase do nitrato. Entretanto, para a disponibilidade hídrica (H) verifica-se que não houve efeito dos tratamentos H₁, H₂ e H₃ para este parâmetro bioquímico, evidenciando semelhança estatística entre os tratamentos (Tabela 3; *vide* Tabelas I e II do apêndice).

Pelo desdobramento dos graus de liberdade da interação HxA, apresentado na Tabela 4, constatou-se que a atividade da enzima aumentou sob associação de acidez moderada (V = 33%) e até 53,17% de disponibilidade hídrica no solo (Figura 1). Este aumento também se verificou na associação de estresse hídrico moderado e até 39,42% de saturação por bases (Figura 2). Nas raízes de plântulas de arroz também se constatou elevada atividade da redutase do nitrato sob disponibilidade hídrica e acidez moderada do solo (SHARMA & DUBEY, 2005).

A tolerância dos vegetais à redução da disponibilidade hídrica envolve mecanismos complexos, dependentes da ação e da interação de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, como o aumento da atividade da redutase do nitrato (MITRA, 2001). Esta enzima citosólica de extrema importância para o metabolismo vegetal tem a síntese e atividade induzidas pelo substrato (DONATO et al., 2004). Tal fato pode explicar o aumento da atividade enzimática até os valores de menor disponibilidade hídrica e maior acidez no solo, provavelmente, devido à presença constante do nitrato (NO₃⁻) no meio de incubação, que permite a síntese *de novo* da enzima (ANDRADE NETTO, 2005). Isto porque o método de JAWORSKI (1971), aplicado para a determinação da atividade da enzima, utiliza o n-propanol para

Tabela 3. Análise de variância da atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios
		Atividade da redutase do nitrato ($\mu\text{g N-NO}_2 \text{ g}^{-1}$ de massa fresca de raízes h^{-1})
Disponibilidade hídrica (H)	2	0,0103 ^{ns}
Acidez (A)	2	0,0347 ^{**}
Interação HxA	4	0,0146 [*]
Tratamentos	8	0,0185
Blocos	3	0,0242 ^{**}
Resíduo	24	0,0043
CV (%)		21,8005

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

Tabela 4. Regressão polinomial da atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboaticabal, SP. 2006-2007.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios	Coeficiente de Determinação (R ²)
		Atividade da redutase do nitrato (µg N-NO ₂ g ⁻¹ de massa fresca de raízes h ⁻¹)	
R.L. H ₁ dentro de A	1	0,0002 ^{ns}	0,1375
R.Q. H ₁ dentro de A	1	0,0011 ^{ns}	1,0000
R.L. H ₂ dentro de A	1	0,0013 ^{ns}	0,0110
R.Q. H ₂ dentro de A	1	0,1194 ^{**}	1,0000
R.L. H ₃ dentro de A	1	0,0002 ^{ns}	0,0372
R.Q. H ₃ dentro de A	1	0,0052 ^{ns}	1,0000
R.L. A ₁ dentro de H	1	0,0045 ^{ns}	0,7579
R.Q. A ₁ dentro de H	1	0,0014 ^{ns}	1,0000
R.L. A ₂ dentro de H	1	0,0094 ^{ns}	0,1513
R.Q. A ₂ dentro de H	1	0,0526 ^{**}	1,0000
R.L. A ₃ dentro de H	1	0,0036 ^{ns}	0,3381
R.Q. A ₃ dentro de H	1	0,0071 ^{ns}	1,0000
Resíduo	24	0,0043	

ns: não significativo (P > 0,05); **: significativo (P < 0,01); R.L.: regressão linear; R.Q.: regressão quadrática. Disponibilidade hídrica (H): H₁ = 70%, H₂ = 55%, H₃ = 40%. Acidez (A): A₁ = 55%, A₂ = 33%, A₃ = 23%.

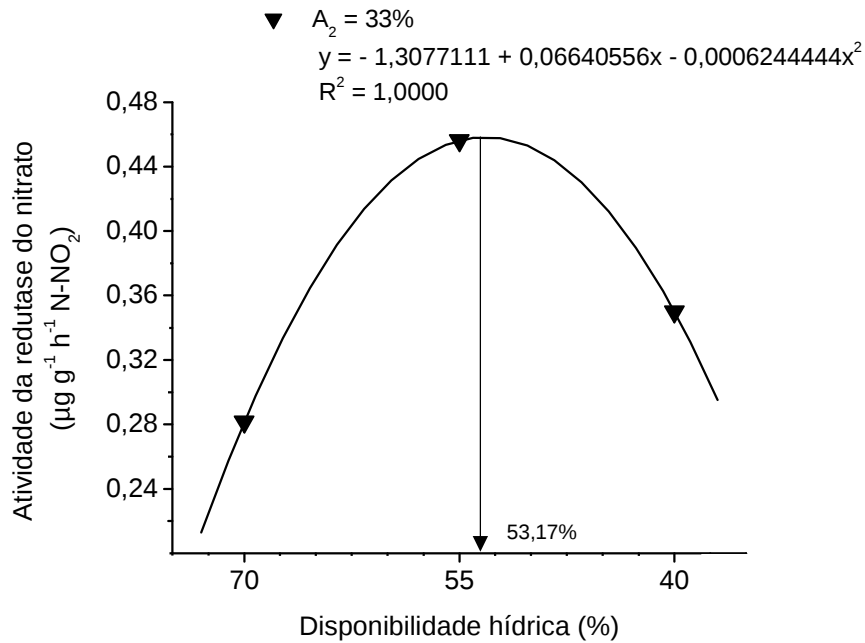


Figura 1. Atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez moderada do solo, durante 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.

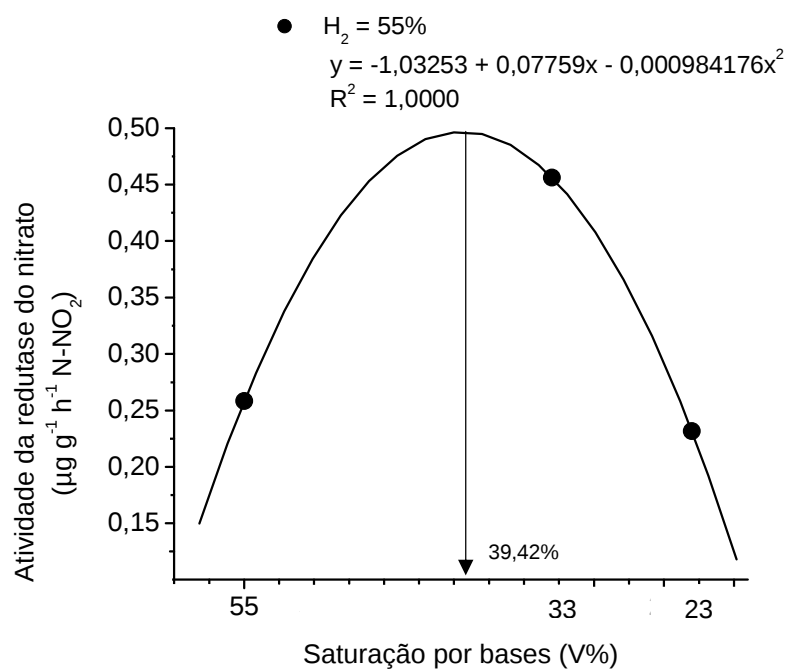


Figura 2. Atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica moderada e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.

aumentar a permeabilidade celular ao nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-), além de facilitar a transferência do nitrato presente no meio de incubação, ou oriundo do vacúolo, para o citoplasma, onde se disponibiliza para ação da redutase de nitrato, saturada com o substrato (OLIVEIRA et al., 2005).

Verifica-se que, sob moderada acidez ($V = 33\%$) associada à diminuição da disponibilidade hídrica do solo, as raízes da cv. IAC91-5155 apresentam redução da atividade da redutase do nitrato, a partir de 53,17% de água no solo (Figura 1; *vide* Tabela II do apêndice). Neste caso, a redução da atividade da enzima pode ser explicada em função do decréscimo no fluxo de NO_3^- por falta de umidade no solo, pois este íon é o principal regulador da síntese da redutase do nitrato (ANDRADE NETTO, 2005).

Em cana-de-açúcar sob deficiência hídrica e acidez moderada do solo também se constatou redução desta enzima (NAIK et al., 2002), corroborando com os resultados do presente trabalho. Em raízes de plântulas de arroz e milho (SHARMA & DUBEY, 2005; LIU-SHENGQUN & SONG-FENGBIN, 2007) e em *Arabidopsis* (XU & ZHOU, 2004) houve redução da atividade da redutase do nitrato com o aumento da severidade da deficiência hídrica no solo.

O estresse hídrico moderado ($H_2 = 55\%$) associado aos tratamentos de acidez do solo provocou redução da atividade da redutase do nitrato a partir de 39,42% de saturação por base no solo (Figura 2; *vide* Tabela II do apêndice). Pelos resultados obtidos sugere-se que condições moderadas de disponibilidade hídrica e acidez do solo interferem na assimilação de nitrogênio na cana-de-açúcar cv. IAC91-5155.

De modo geral, o metabolismo do nitrogênio é influenciado negativamente pela deficiência hídrica (FERREIRA et al., 2002) e pela acidez do solo (AMARAL et al., 2000). A elevada acidez do solo pode causar inibição da atividade da redutase do nitrato (SHARMA & DUBEY, 2005). Em plantas de milho cultivadas sob elevada acidez do solo houve redução da atividade da enzima (LIN-XIANYONG et al., 2002). Este decréscimo pode ser devido ao efeito inibitório do Al^{+3} , principal íon presente sob condições de acidez no solo, diretamente na atividade da enzima (CAMPBELL, 1999).

Nos solos ácidos, o amônio (NH_4^+), o qual é a principal fonte de nitrogênio, fica adsorvido às partículas coloidais, enquanto o nitrato (NO_3^-), por ter carga negativa, torna-se componente da solução do solo, facilmente lixiviado, e indisponível para a absorção radicular (CORDEIRO, 2004). Considerando este aspecto, se houver deficiência hídrica associada à acidez do solo, a absorção e o transporte de NO_3^- pelas raízes diminui significativamente. A redução da disponibilidade do íon nitrato para as plantas pode inibir a transcrição do gene da redutase do nitrato, bem como a estabilidade dos mRNAs desta enzima (SHARMA & DUBEY, 2005).

Pelos resultados obtidos no presente trabalho evidencia-se que as raízes da cv IAC91-5155 de cana-de-açúcar apresentaram diminuição da atividade da redutase do nitrato, em condições moderadas de acidez e restrição hídrica associadas à severidade dos estresses abióticos estudados. Em virtude da importância da redutase do nitrato na incorporação do nitrogênio e no metabolismo primário das plantas superiores, quaisquer alterações na atividade desta enzima têm sido freqüentemente utilizadas como indicadora de estresses nos vegetais (Oji et al., 1988 citados por SHARMA & DUBEY, 2005; CASTRO et al., 2007). Deste modo, a redução da atividade da enzima pode ser considerada um indicador fisiológico de estresses em plantas jovens de cana-de-açúcar cv IAC91-5155.

4.2. Teores de prolina livre

A análise de variância dos teores de prolina livre nas raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo estão apresentados na Tabela 5.

Pelos resultados da análise de variância evidencia-se que a interação HxA (disponibilidade hídrica x acidez do solo) e a acidez do solo foram significativas para os teores de prolina livre (Tabela 5). Nos resultados do teste de Tukey para a disponibilidade hídrica (H) verifica-se que não houve efeito dos tratamentos H₁, H₂ e H₃ nos teores de prolina livre das raízes, evidenciando semelhança estatística entre esses tratamentos (*vide* Tabela III do apêndice). Os níveis de acidez no solo (A) provocaram efeito nos teores de prolina livre das raízes, em que o tratamento de estresse ácido moderado (A₂ = 33%) causou alteração significativa no conteúdo deste aminoácido quando comparado ao estresse ácido severo (Tabela III do apêndice). Nos vegetais, verifica-se alta correlação entre modificações nos teores de prolina livre e o aumento da tolerância ao estresse hídrico, particularmente. Todavia, atribui-se a estas modificações resposta elementar ao efeito de um estresse abiótico (MADAN et al., 1995). Assim, para as raízes da cultivar IAC91-5155 de cana-de-açúcar, os teores de prolina livre dependeram da interação entre os fatores estudados (disponibilidade hídrica x acidez do solo).

Pelo desdobramento dos graus de liberdade da interação HxA observa-se que sob baixa acidez do solo (V = 55%), os teores de prolina livre aumentam linearmente com o estresse hídrico (Figura 3 e Tabela 6; *vide* Tabela IV do apêndice). Mediante estes resultados verifica-se que a prolina atuou como osmoprotetor para a manutenção hídrica das células radiculares da cv. IAC91-5155. Em estudos realizados com esta cultivar, também se constatou aumento linear dos teores de prolina livre, conforme a diminuição da disponibilidade hídrica do solo (QUEIROZ, 2006).

Os vegetais, quando expostos aos estresses ambientais, especialmente a deficiência hídrica, podem apresentar acúmulo de prolina livre. Este mecanismo regulador da perda de água, mediante aumento da osmolaridade celular, tem sido

associado à tolerância das plantas às condições desfavoráveis (ASPINALL & PALEG, 1981). Para a cana-de-açúcar, outros autores também constataram aumento dos teores deste aminoácido, conforme a diminuição da disponibilidade hídrica do solo, porém, o acúmulo de prolina livre nas cultivares estudadas foi superior ao registrado no presente trabalho (RÍNCONES, 1997; BIDOIA et al., 2006). O ajustamento osmótico em cana-de-açúcar sob deficiência hídrica evidencia o acúmulo de prolina livre, porém, indica significativas diferenças nas quantidades deste aminoácido entre as cultivares (NAIK et al., 2004).

A concentração de prolina livre acumulada nas plantas varia conforme o estágio vegetativo, tipo de órgão ou tecido e, principalmente entre espécies (KAVI KISHOR et al., 2005). O aumento dos teores de prolina livre da cv. IAC91-5155, possivelmente, pode ser devido a um aumento da biossíntese deste aminoácido, em função da redução da disponibilidade de água nos tecidos, mostrando-se como um mecanismo de proteção contra a falta de água (QUEIROZ, 2006). Isto ocorre porque a prolina auxilia a diminuir o conteúdo de água dos tecidos radiculares, promovendo a retenção de água *in situ* e a manutenção da integridade destes tecidos (KAVI KISHOR et al., 2005). Em plantas sob estresse hídrico, é sintetizado também nos tecidos foliares, translocado pelo floema até as raízes onde se acumula para preservar e manter o turgor das células radiculares, como foi observado em milho (RAYMOND & SMIRNOFF, 2002). Nesse contexto, é importante conhecer como o acúmulo de prolina livre influencia outras vias relacionadas à produção de energia durante o estresse hídrico (KAVI KISHOR, et al., 2005).

Verifica-se que sob moderada acidez ($V = 33\%$) associada à diminuição da disponibilidade hídrica do solo, as raízes da cv. IAC91-5155 apresentam diminuição dos teores de prolina livre (Figura 4; *vide* Tabela IV do apêndice). O estresse hídrico moderado ($H_2 = 55\%$) associado aos tratamentos de acidez do solo não possibilitou o acúmulo de prolina livre, cujo decréscimo apresentou comportamento linear (Figura 7; Tabela 6; *vide* Tabela IV do apêndice). Mediante estes resultados constata-se que condições moderadas de disponibilidade hídrica e acidez do solo interferem na capacidade da planta em acumular prolina livre, como um mecanismo de ajustamento

Tabela 5. Análise de variância dos teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios
		Teores de prolina livre ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa fresca de raízes)
Disponibilidade hídrica (H)	2	0,0143 ^{ns}
Acidez (A)	2	0,2797 ^{**}
Interação HxA	4	0,1621 ^{**}
Tratamentos	8	0,1545
Blocos	3	0,0096 ^{ns}
Resíduo	24	0,0058
CV (%)		10,6710

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

Tabela 6. Regressão polinomial dos teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboaticabal, SP. 2006-2007.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios	Coeficiente de Determinação (R ²)
		Teores de prolina livre ($\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa fresca de raízes)	
R.L. H ₁ dentro de A	1	0,1499**	0,3490
R.Q. H ₁ dentro de A	1	0,2797*	1,0000
R.L. H ₂ dentro de A	1	0,2253**	0,9754
R.Q. H ₂ dentro de A	1	0,0057*	1,0000
R.L. H ₃ dentro de A	1	0,2392**	0,4375
R.Q. H ₃ dentro de A	1	0,3075**	1,0000
R.L. A ₁ dentro de H	1	0,3121**	0,9631
R.Q. A ₁ dentro de H	1	0,0120 ^{ns}	1,0000
R.L. A ₂ dentro de H	1	0,0024 ^{ns}	0,0698
R.Q. A ₂ dentro de H	1	0,0322*	1,0000
R.L. A ₃ dentro de H	1	0,0843**	0,2645
R.Q. A ₃ dentro de H	1	0,2342**	1,0000
Resíduo	24	0,0058	

ns: não significativo (P > 0,05); *: significativo (P < 0,05); **: significativo (P < 0,01); R.L.: regressão linear; R.Q.: regressão quadrática. Disponibilidade hídrica (H): H₁ = 70%, H₂ = 55%, H₃ = 40%. Acidez (A): A₁ = 55%, A₂ = 33%, A₃ = 23%.

osmótico. Isto porque, como osmólito compatível, a prolina se acumula na planta, principalmente, sob condições severas de estresse (MOLINARI, 2006). Os teores de prolina livre das raízes da cana-de-açúcar também apresentaram significativa redução até 52,40% de disponibilidade hídrica associada à acidez severa ($V = 23\%$), entretanto, a partir deste percentual de água no solo, houve acúmulo de prolina livre mesmo sob condições de elevada acidez (Figura 5; *vide* Tabela IV do apêndice). As raízes da cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 apresentaram aumento dos teores de prolina livre sob a associação dos estresses hídrico e ácido em condições severas, revelando o efeito osmoprotetor deste aminoácido. Estes resultados corroboram com os encontrados em plântulas de guandu, em que condições severas de acidez e restrição hídrica no solo apresentaram um efeito sinérgico sobre os teores de prolina livre. (MARIN, 2003). Em plântulas de arroz também foi observado o acúmulo de prolina livre sob condições severas de deficiência hídrica e de acidez do solo (SHARMA & DUBEY, 2005). Nestas condições, o acúmulo de prolina livre pode ser decorrente do decréscimo na degradação ou do aumento da biossíntese deste aminoácido (HARE et al., 1999). A indução da biossíntese de prolina pode ser provocada pelo aumento de metabólitos como poliaminas, amônia, arginina, ornitina, glutamina, glutamato (SILVEIRA et al., 2002). Assim, o metabolismo de aminoácidos em plantas sob estresse é amplamente alterado (SODEK, 2004).

Ainda, a disponibilidade hídrica nos tratamentos de acidez do solo, verifica-se que, na medida em que houve redução da saturação por bases a partir de 55%, os teores de prolina livre também reduziram, apresentando diferentes valores mínimos (42,59% e 36,47%), dependendo da disponibilidade hídrica (Figuras 6 e 8, respectivamente). A partir destes valores, as raízes da cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 apresentaram acúmulo de prolina livre, principalmente sob elevada acidez do solo (Figuras 6 e 8). Notadamente, a associação dos estresses hídrico e ácido em condições severas, revela o efeito osmoprotetor deste aminoácido e, conseqüentemente, um mecanismo de ajustamento osmótico. Este mecanismo não é devido ao aumento na concentração de solutos na célula durante a desidratação e diminuição de volume celular, mas protege a integridade celular conduzindo ao aumento na concentração de

solutos independentemente das alterações no volume das células resultantes da perda de água (VERSLUES & BRAY, 2006).

O acúmulo de prolina livre não está associado somente às plantas que se desenvolvem sob condições de estresse hídrico, também pode ser verificado em plantas sob condições de elevada acidez do solo (MOSSOR, 2001). No sistema radicular de gramíneas sob efeito associado dos estresses hídrico e ácido, verificou-se aumento nos teores de prolina livre (ZAIFNEJAD et al., 1997). Em plântulas de grão de bico cultivadas sob elevada concentração de alumínio houve aumento dos teores de prolina livre (SATAKOPAN et al., 1992). Em plantas de milho, o acúmulo de prolina livre sob baixa saturação por bases revelou um mecanismo de tolerância à acidez severa (GIANNAKOULA et al., 2008). Observou-se também que, sob elevada acidez, houve aumento nos teores de prolina livre em raízes de sorgo e em genótipos de ervilha, trigo, cevada, milho e ervilhaça, tolerantes ou sensíveis ao alumínio (Galvez et al., 1991 e Klimashevskii, 1983 citados por ZAIFNEJAD, 1993). Assim, os mecanismos fisiológicos envolvidos em resposta ao estresse ácido devem ser similares àqueles em resposta à deficiência hídrica (ZAIFNEJAD et al., 1997).

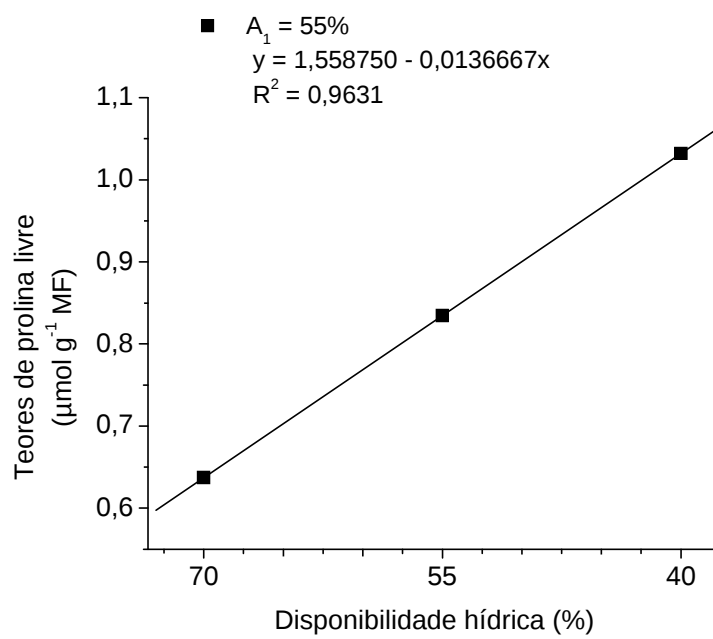


Figura 3. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Ausência de estresse ácido ($A_1 = 55\%$) nos tratamentos de estresse hídrico. Jaboticabal, SP. 2006-2007.

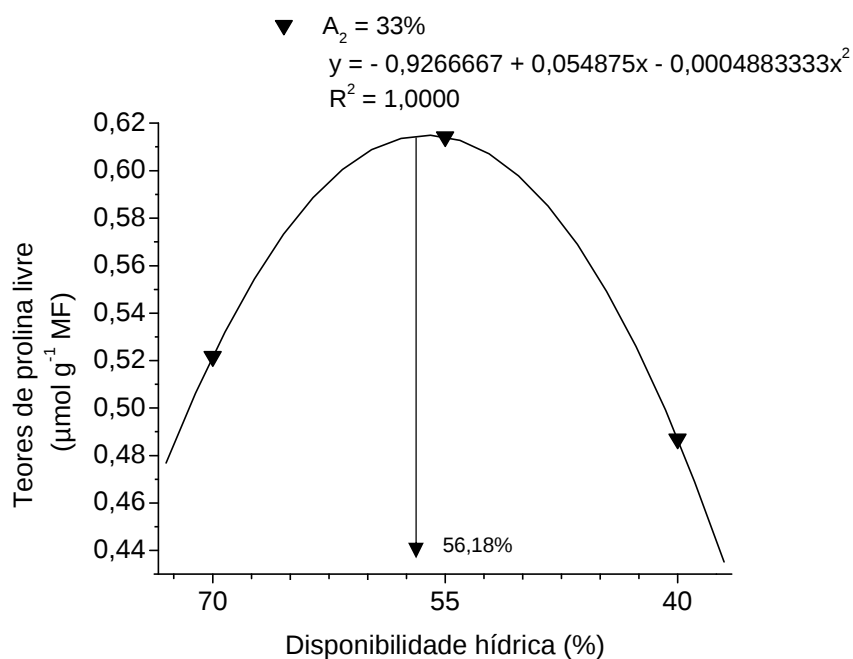


Figura 4. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Estresse ácido moderado ($A_2 = 33\%$) nos tratamentos de estresse hídrico. Jaboticabal, SP. 2006-2007.

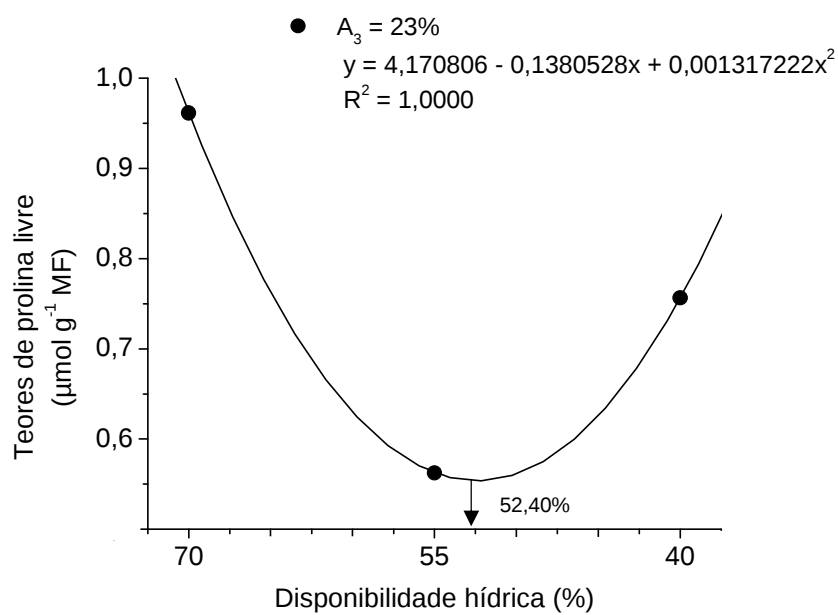


Figura 5. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Estresse ácido severo ($A_3 = 23\%$) nos tratamentos de estresse hídrico. Jaboticabal, SP. 2006-2007.

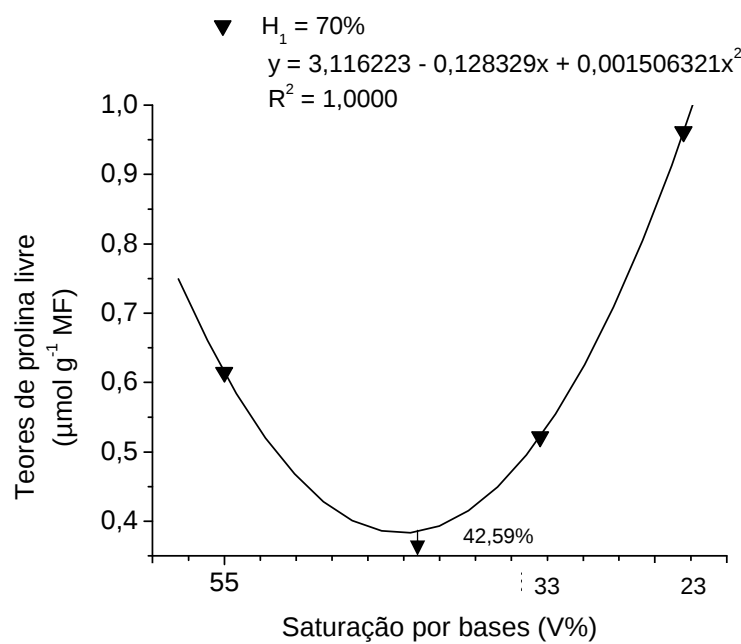


Figura 6. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Ausência de estresse hídrico ($H_1 = 70\%$) nos tratamentos de estresse ácido. Jaboticabal, SP. 2006-2007.

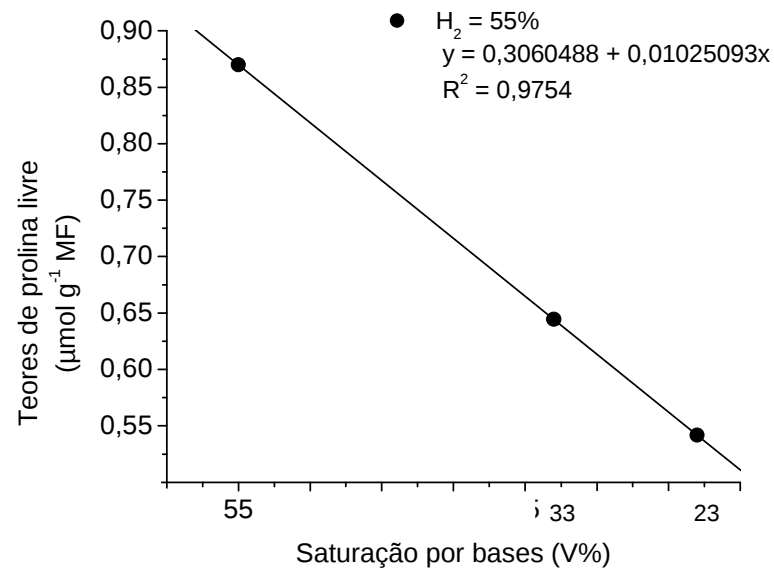


Figura 7. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Estresse hídrico moderado ($H_2 = 55\%$) nos tratamentos de estresse ácido. Jaboticabal, SP. 2006-2007.

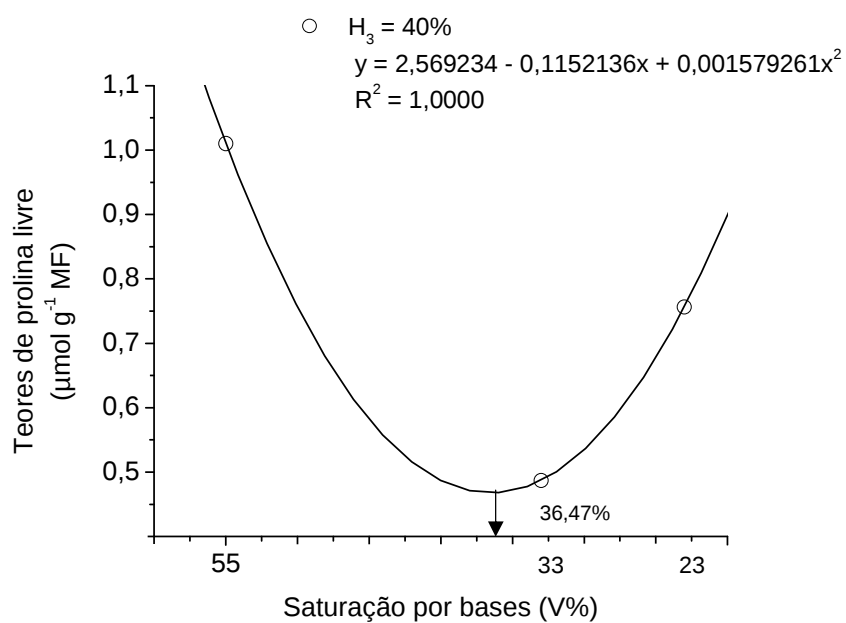


Figura 8. Teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, durante 60 dias (90 DAP). Estresse hídrico severo ($H_3 = 40\%$) nos tratamentos de estresse ácido. Jaboticabal, SP. 2006-2007.

4.3. Crescimento inicial das raízes

A análise de variância das avaliações do crescimento inicial das raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo está apresentada na Tabela 7. Pelos resultados da análise de variância evidencia-se que a interação HxA (disponibilidade hídrica x acidez do solo) não foi significativa para o crescimento de raízes. Entretanto, verifica-se pelo teste de Tukey que houve diferenças significativas entre os tratamentos de disponibilidade hídrica, nas avaliações de diâmetro, densidade e massa seca das raízes, e de acidez do solo para a densidade de raízes (Tabela 7).

Pelo teste de Tukey nota-se que conforme o aumento da deficiência hídrica houve redução em todos os parâmetros de crescimento avaliados nas raízes da cv. IAC91-5155 de cana-de-açúcar (Tabela 7; Figuras I, II, III e IV do apêndice), fato que pode comprometer o desenvolvimento desta cultivar e, portanto, reduzir a produtividade. Em estudos realizados com cana-de-açúcar sob deficiência hídrica, por 120 dias, houve significativa redução da massa seca das raízes e da densidade das raízes, conforme a diminuição da disponibilidade de água no solo (BIDOIA, 2005). No período de máximo desenvolvimento da cana-de-açúcar, a deficiência hídrica provoca significativa redução na produtividade (ROSENFELD & LEME, 1984). A deficiência hídrica pode ser considerada fator limitante para a produtividade agrícola devido ao fato de causar severos danos no crescimento vegetal, mediante, primordialmente, a diminuição da expansão celular (TAIZ & ZEIGER, 2004).

No presente trabalho, o estresse hídrico severo ($H_3 = 40\%$) provocou acentuada redução na massa seca, na densidade e no diâmetro médio das raízes do cv. IAC91-5155 de cana-de-açúcar (Tabela 7), indicando maior crescimento de raízes mais finas. Estes resultados corroboram com os obtidos na literatura em estudos realizados com a cv. IAC91-5155, que sob estresse hídrico severo também apresentou maior crescimento de raízes mais finas (QUEIROZ, 2006). As plantas em condições de seca apresentam maior produção de pêlos absorventes (raízes mais finas) para aumentar absorção de água (FARONI, 2004).

Particularmente na cana-de-açúcar, o desenvolvimento do sistema radicular constitui-se um importante aspecto para tolerância ao estresse hídrico, pois quanto maior a profundidade máxima das raízes maior o potencial de produção, dependendo da distribuição das chuvas e da demanda evaporativa durante a estação de crescimento (Van den BERG et al., 2000). Em diferentes estádios de crescimento da cana-de-açúcar submetida à deficiência hídrica, em condições de campo, houve significativa diminuição da massa seca no estágio vegetativo, conduzindo a redução do crescimento da cultura em 46,3% e 60,8%, sob condições de estresse hídrico moderado e severo, respectivamente (RAMESH, 2000).

As modificações fisiológicas do sistema radicular em plantas de cana-de-açúcar sob estresse hídrico são influenciadas pelo estágio vegetativo da cultura, pela severidade e periodicidade da deficiência hídrica e, ainda, pelas características granulométricas do solo, que interferem no conteúdo de água disponível (QUEIROZ, 2006). Assim, a produtividade das plantas, limitada pela água, depende da quantidade disponível deste recurso e da eficiência de seu uso pelo vegetal (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A acidez do solo também influenciou o sistema radicular da cv. IAC91-5155, entretanto, somente a densidade de raízes evidenciou significativa redução, que se verificou sob 35,11% de acidez do solo (Figura III do apêndice). Este resultado pode inferir que a densidade de raízes é um parâmetro adequado para avaliar o crescimento das raízes da cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito da acidez do solo.

A densidade evidencia o crescimento em quantidade de raízes, enquanto que o diâmetro evidencia o crescimento mais vigoroso das raízes (raízes mais grossas). Assim, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, verifica-se que a deficiência hídrica é limitante para o crescimento das raízes da cana-de-açúcar, cv. IAC 91-5155, pois causou redução em todos os parâmetros avaliados. Além da restrição hídrica no solo, o sistema radicular da cana-de-açúcar é influenciado pela acidez do solo, principalmente quanto à toxicidade do alumínio, interferindo no desenvolvimento e na absorção de água e nutrientes (SOBRAL & GUIMARÃES, 1992). Todavia, muitas cultivares são adaptados aos solos ácidos e de baixa fertilidade (ROSSETTO et al.,

2004), haja vista a maioria dos solos destinados à produção agrícola no Brasil apresentar problemas de acidez e toxicidade por alumínio (MAZZOCATO et. al., 2002).

O desenvolvimento das raízes é típico de cada variedade ou cultivar, havendo crescimento radicular acumulativo durante os ciclos da cultura, da cana-planta para as socas sucessivas, sendo que a morte ou a renovação do sistema radicular não é causada pela colheita da cultura e sim pela deficiência hídrica, independente da fase de desenvolvimento (FARONI, 2004). Portanto, no decorrer dos anos pode ser notado que a produção da cana-de-açúcar é muito dependente da disponibilidade hídrica do solo, proporcionando elevada variação na produtividade (TERAMOTO, 2003).

Tabela 7. Análise de variância e teste de Tukey do crescimento de raízes (diâmetro médio; densidade e massa seca) de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios		
		Diâmetro (mm)	Densidade (mm cm ⁻³)	Massa seca (g)
Disponibilidade hídrica (H)	2	376,6398**	1702,8087**	40,0992**
Acidez (A)	2	0,2785 ^{ns}	55,7210*	0,3908 ^{ns}
Interação HxA	4	12,3195 ^{ns}	23,4839 ^{ns}	0,6923 ^{ns}
Tratamentos	8	100,3893	451,3744	10,4686
Blocos	3	10,4373 ^{ns}	12,9393 ^{ns}	0,1305 ^{ns}
Resíduo	24	4,4878	15,5261	0,6642
C.V.%		15,2808	19,7374	23,3900
Tratamentos ¹		Teste de Tukey ²		
H ₁ = 70%		18,5038A	31,6073A	5,0112A
H ₂ = 55%		15,4487B	20,4841B	3,9834B
H ₃ = 40%		7,6398C	7,7999C	1,4588C
A ₁ = 55%		13,7291A	22,2867A	3,6928A
A ₂ = 33%		13,8322A	18,0300B	3,3819A
A ₃ = 23%		14,0289A	19,5746AB	3,3786A
DMS		2,1587	4,0153	0,8305

ns: não significativo (P>0,05); *: significativo (P<0,05); **: significativo (P<0,01); C.V.: coeficiente de variação; D.M.S.: Diferença Mínima Significativa; ¹Disponibilidade hídrica: H₁ = 70%, H₂ = 55%, H₃ = 40%. Acidez: A₁ = 55%, A₂ = 33%, A₃ = 23%. ²Médias seguidas de mesma letra na vertical (nos tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

V. CONCLUSÕES

- ✓ A redução da atividade da redutase do nitrato ocorreu em condições moderadas de acidez e restrição hídrica associadas à severidade dos estresses.
- ✓ O acúmulo de prolina livre pode ser considerado indicador fisiológico em plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob condições severas de disponibilidade hídrica e acidez do solo.
- ✓ A deficiência hídrica reduziu o crescimento das raízes.

VI. REFERÊNCIAS

ABDUL JALEEL, C.; MANIVANNAN, P.; KISHOREKUMAR, A.; SANKAR, B; GOPI, R.; SOMASUNDARAM, R.; PANEERSELVAM, R. Alterations in osmoregulations, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.59, n.2, p.150-157, 2007.

ABREU JÚNIOR.; H. C.; MURAOKA, T.; LAVORANTE, A. F. Relationship between acidity and chemical properties of Brazilian soils. **Scientia Agrícola**, v. 60, n. 2, p. 337-343, 2003.

AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2008. 502p.

ALEXIEVA, V.; IVANOV, S.; SERGIEV, I.; KARANOV, E. Interaction between stresses. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Varna, p.1-17, 2003.

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

AMARAL, J. A. T DO; CORDEIRO, A. T.; RENA, A. B. Efeitos do alumínio, nitrato e amônio sobre a composição de metabólitos nitrogenados e de carboidratos em *Stylosanthes guianensis* e *Stylosanthes macrocephala*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 313-320, 2000.

ANDRADE NETTO, J. F. **Atividade das enzimas redutase do nitrato e glutamina sintetase em cafeeiro arábica**. 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ANDRIOLI, I.; CENTURION, J. F. Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 27,1999. Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999. (CD-Rom).

ANSELM, R. De 40 novas usinas, 30 serão no oeste paulista. **Jornal Cana**, Campinas, fevereiro de 2005. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/pdf/134/FEICANA05.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 2007.

ASPINALL, D.; PALEG, L. G. **Proline accumulation: Physiological aspects**. The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants, 1981. 25-240p.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 4^a ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237p.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BENNET, R. J. The aluminium response network in wheat (*Triticum aestivum* L.): I. The root growth reactions. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 15, n. 1, p. 38-45, 1998.

BENNET, R. J.; GRANGER, J. E. The aluminium response network in *Themeda triandra* Fosc. III: Regulatory mechanisms and aluminium tolerance. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 17, n. 4, p. 160-169, 2000.

BIDOIA, M. A. P. **Desenvolvimento inicial e acúmulo de prolina livre em cultivares de cana-de-açúcar sob efeito da disponibilidade hídrica do solo**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista,

Jaboticabal.

BIDOIA, M. A. P.; SANTOS, D. M. M.; MARIN, A.; LANDELL, M. G. A.; BANZATTO, D. A.; CAZETTA, J. O. Efeito da deficiência hídrica no acúmulo de prolina livre em cana-de-açúcar, em diferentes períodos de desenvolvimento. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 24, n. 5, p. 6-9, 2006.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. 3. ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2001. p. 1158-1203.

CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure function and regulation on bridging to gap between biochemistry and physiology. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**. v. 50, p. 277-303, 1999.

CANAOESTE. **Setor sucroalcooleiro**. Disponível em: <http://www.canaoeste.com.br/principal.php?ago=35&local=setor_canavieiro>. Acesso em: 19 de julho de 2006.

CASARIN, V.; VILLA NOVA, V. S.; FORLI, F. Micronutrientes em cana-de-açúcar. In: MARQUES, M. O.; MUTTON, M. A.; AZANIA, A. A. P. M.; TASSO JUNIOR, L. C. NOGUEIRA, G. A.; VALE, D. W. (Ed.). **Tópicos em Tecnologia Sucroalcooleira**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda., 2006. p. 65-76.

CASTRO, D. S.; LOBATO, A. K. S.; MENDES, F. S.; OLIVEIRA NETO, C. F.; CUNHA, R. L. M.; COSTA, R. C. L. Atividade da redutase do nitrato em folhas de teca (*Tectona grandis* L.) sob déficit hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 936-938, 2007.

CASTRO, P. R. C. Aplicações da fisiologia vegetal no sistema de produção da cana-de-açúcar. In: **Simpósio Internacional de Fisiologia da Cana-de-Açúcar - STAB**, 2000, 01 CD-ROM.

CAZETTA, J. O. **Influência do nitrogênio e potássio no metabolismo, no desenvolvimento e na produção de plantas de milho**. Jaboticabal, 1997. 121 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, FCAV, Campus de Jaboticabal, 1997.

COGO, N. P.; GUERRA, M. Água no solo e rendimento das culturas em experimentos em casa de vegetação. I. Sorgo (*Sorghum vulgare*), em solos vertissolo, latossolo roxo distrófico e podzólico vermelho amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 2, p. 10-17, 1978.

COLETI, J. T.; CASAGRANDE J. C.; STUPIELLO, J. J.; RIBEIRO, L. D.; OLIVEIRA, G. R. Remoção de macronutrientes pela cana-planta e cana-soca, em argissolos, variedades RB83-5486 e SP81-3250. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 24, n. 5, p. 32-36, 2006.

CONTIN, T. L. M. **Uréia tratada com o inibidor da urease NBPT na adubação de cana-de-açúcar colhida sem despalha a fogo**. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico, Campinas, 2007.

CORDEIRO, L. Fixação do nitrogênio. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. 452 p.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press., 1981. 126p.

CUSTÓDIO, C. C.; BOMFIM, D. C.; SATURNINO, S. M.; MACHADO NETO, N. B. Estresse por alumínio e por acidez em cultivares de soja. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 1, p. 145-153, 2002.

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

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, n. 2, p. 315-321, 1995.

DESTRO, M. V. P. **Interação estresse salino e aplicação exógena de espermidina nos teores de glicina betaína de guandu**. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

DI MARTINO, C.; DELFINE, S.; PIZZUTO, R.; LORETO, F.; FUGGI, A. Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. **New Phytologist**, Cambridge, v.158, p.455-463, 2003.

DIAS, F. L. F. Produtividade de cana-de-açúcar em relação ao clima e solo da Região Noroeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 627-634, 1999.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G. DE; SOUZA, E. S. DE; FRANÇA, J. G. E. DE; MACIEL, G. A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1087-1093, 2004.

DRUMMOND, R. D.; GUIMARÃES, C. T.; FELIX, J.; NINAMANGO-CÁRDENAS, F. E.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E.; MENOSSI, M. Prospecting sugarcane genes involved in aluminium tolerance. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1-4, p. 221-230, 2001.

EI-BASHITI, T.; HAMAMCI, H.; OKTEM, H. A; YUCEL, M. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. **Plant Science**, Limerik, v. 169, p. 47-54, 2005.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Produção de informação, 1997. 212p.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição Mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Trad. M.E.T. Nunes. Londrina: Editora Planta, 403p., 2006.

FARONI, C. E. **Sistema radicular de cana-de-açúcar e identificação de raízes metabolicamente ativas**. 2004. 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2004.

FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; OLIVEIRAS, L. E. M. DE; PURCINO, A. A. C. Metabolismo do nitrogênio associado à deficiência hídrica e sua recuperação em genótipos de milho. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 13-17, 2002.

FUENTE-MARTINÉZ, J. M.; HERRERA-ESTRELLA, L. Advances in the understanding of aluminum toxicity and the development of aluminum-tolerant transgenic plants. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 66, p. 103-120, 1999.

GARG, A. K.; JU-KON, K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; DO CHA, Y.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **PNAS**, v. 99, n. 25, p. 15898-15903, 2002.

GIANNAKOULA, A.; MOUSTAKAS, M.; MYLONA, P.; PAPADAKIS, I.; YUPSANIS, T. Aluminum tolerance in maize is correlated with increased levels of mineral nutrients, carbohydrates and proline, and decreased levels of lipid peroxidation and Al accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 385-396, 2008.

GRENNAN, A. K. Abiotic Stress in Rice. An "Omic" Approach. **Plant Physiology**, v. 140, p. 1139–1141, 2006.

HAMEL, F.; BRETON, C.; HOUDE, M. Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor. **Planta**, Berlin, v. 205, p. 531-538, 1998.

HARE, P. D.; CRESS, W. A., VAN STANDEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 413-434, 1999.

HARRIS, G. A.; CAMPBELL, G. S. Automated quantification of roots using a simple image analyser. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, p. 935-938, 1989.

HONGBO, S.; ZONGSUO, L.; MINGAN, S. Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 47, n. 2, p. 132-139, 2006.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2-3, p. 152-164, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 29 mar. 2007.

JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Londres, v.43, p.1274-1279, 1971.

JORNAL CANA. **Novidades tecnológicas atendem demandas do setor**. 2004, p. 30. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/pdf/124/producao.pdf>> Acesso em 20.06.2006.

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

KIEHL, E. J. **Manual de Edafologia** - relações solo-planta. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1979, 262p.

LAM, H. M.; COSCHIGANO, K. T., OLIVEIRA, I. C. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 569-593, 1996.

LANDELL, M. G. A.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; VASCONCELOS, A. C. M.; PINTO, L. R.; CRESTE, S. Potencialidade de novas variedades de cana-de-açúcar. In: MARQUES, M. O.; MUTTON, M. A.; AZANIA, A. A. P. M.; TASSO JUNIOR, L. C.; NOGUEIRA, G. A.; VALE, D. W. (Ed.). **Tópicos em Tecnologia Sucroalcooleira**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda., 2006. p. 17-30.

LANDELL, M.G.A.; CAMPANA, M.P.; FIGUEIREDO, P.; SILVA, M.A.; VASCONCELOS, A.C.M.; BIDOIA, M.A.P.; XAVIER, M.A.; DINARDO-MIRANDA, L.L.; PRADO, H.; ROSSETO, R.; SANTOS, A.S.; CAVICHIOLI, J.C.; MARTINS, A.L.M.; KANTHACK, R.A.D.; GALLO, P.B.; VEIGA FILHO, A.A.; SILVA, D.N. **Variedades de cana-de-açúcar para o Centro-Sul do Brasil: 14ª liberação do programa cana IAC (1959-2004)**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2004. 33p. (Boletim Técnico, 195).

LIN - XIANYONG; ZHANG - YONGSONG; LUO - ANCHENG; TAO - QINNAN. Tolerance of wheat genotypes to Al toxicity as related to their variation in rhizosphere pH, NH_4^+ and NO_3^- uptake and nitrate reduction under Al stress. **Plant Nutrition and Fertilizer Science**. v.8, n. 3, p. 330-334, 2002.

LIU-SHENGQUN; SONG-FENGBIN. Study on physiological character of root system between maize genotypes with different tolerance to drought. **Journal of Zhejiang University Agriculture and Life Sciences**, v.33, n.4, p.407-412, 2007.

LIZANA, C.; WENTWORTH, M.; MARTINEZ, J.P.; VILLEGAS, D.; MENESES, R.; MURCHIE, E.H.; PASTENES, C.; LERCARI, B.; VERNIERI, P.; HORTON, P.; PINTO, M. Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress. I. Effects of drought on yield and photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 3, p.685-697, 2006.

MADAN, S.; NAINAWATEE, H. S.; JAIN, R. K.; CHOWDHURY, J. B. Proline and proline metabolizing enzymes in in-vitro selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress. **Annals of Botany**, v. 76, p. 51-57, 1995.

MARIN, A. **Influência associada do estresse hídrico e do alumínio na germinação e crescimento inicial do guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.)**. 2003. 87f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MARIN, A.; SANTOS, D. M. M. DOS; BANZATTO, D. A.; CODOGNOTTO, L. M. Influência da disponibilidade hídrica e da acidez do solo no teor de prolina livre de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 355-358, 2006.

MARQUES, M. O.; MUTTON, M. A.; AZANIA, A. A. P. M.; TASSO JUNIOR, L. C.; NOGUEIRA, G. A.; VALE, D. W. (Ed.). **Tópicos em Tecnologia Sucroalcooleira**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda., 2006. 191p.

MARQUES, M. O.; MARQUES, T. A.; TASSO JÚNIOR, L. C. **Tecnologia do açúcar: produção e industrialização da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 2001. 166 p.

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**, v. 58, n. 2; p. 295-301, 2001.

MAZZOCATO, A. C.; ROCHA, P. S. G. DA; SERENO, M. J. C. M.; GRONGO, H. B. V.; BARBOSA NETO, J. F. Tolerância ao alumínio em plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.19-24, 2002.

MEGURO, N. E.; MAGALHÃES, A. C. Atividade da redutase de nitrato em cultivares de café. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, p. 156-159, 1987.

MELONI, D. A.; GULOTTA, M. R.; MARTINEZ, C. A.; OLIVA, M. A. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycine betaine accumulation in *Prosopis alba*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 1, p. 39-46, 2004.

MITRA, J. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. **Current Science**, v. 80, n. 6, p.758-763, 2001.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, 2006.

MOLINARI, H. B. C. **Expressão estresse-induzida do gene *p5cs* em plantas transgênicas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. 2006. 109f. Tese (Doutor em Ciências – Área de Concentração em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Paraná, Curitiba.

MORIKAWA, H.; TAKAHASHI, M.; SAKAMOTO, A.; MATSUBARA, T.; ARIMURA, G.; KAWAMURA, Y.; FUKUNAGA, K.; FUJITA, K.; SAKURAI, N.; HIRATA, T.; IDE, H.; NONOYAMA, N.; SUZUKI, H. Formation of unidentified nitrogen in plants: an implication for a novel nitrogen metabolism. **Planta**, v. 219, p. 14-22, 2004.

MOSSOR, P. T. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 3, p. 673-686, 2001.

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.; NÓBREGA, J. C. M. (Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. 415p.

NAIK, R. M.; KADAM, B. S.; PANDHARE, R. A.; PAWAR, S. M.; PATIL, R. C.; BHOI, P. G. Inheritance of proline accumulation and in vivo nitrate reductase activity in sugarcane leaves under water stress. **Indian Sugar**, v. 52, n. 6, p. 427-429, 2002.

NAIK, R. M.; KADAM, B. S.; PAWAR, S. V.; PANDHRE, R. A. Identification of biochemical markers for water stress tolerance in sugarcane. **Journal of Maharashtra Agricultural Universities**, v. 29, n. 2, p. 211-212, 2004.

NICHOLAS, J. C.; HARPER, J. E.; HAGEMAN, R. H. Nitrate reductase activity in soybeans (*Glycyne max*, L. Merrill). I- Effects of light and temperature. **Plant Physiology**, v. 58, p. 731-735, 1976.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V; BURITY, H. A.; BEZERRA NETO, E. Alterações na resistência à difusão de vapor das folhas e relações hídricas em aceroleiras submetidas a déficit de água. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 75-5-87, 2001.

OLIVEIRA, M. A. J. DE; BOVI, M. L. A.; MACHADO, E. C.; RODRIGUES, J. D. Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 515-522, 2005.

ORTOLAN, M. C. Perspectivas para o setor sucroalcooleiro. In: MARQUES, M. O.; MUTTON, M. A.; AZANIA, A. A. P. M.; TASSO JUNIOR, L. C.; NOGUEIRA, G. A.; VALE, D. W. (Ed.). **Tópicos em Tecnologia Sucroalcooleira**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda., 2006. p. 07-16.

PADILHA, F. M.; MIRANDA, J. D.; PUGNAIRE, F.; Early root growth plasticity in seedlings of three Mediterranean woody species. **Plant-and-Soil**, v. 296, n. 1-2, p. 103-113, 2007.

PANDEY, S.; CEBALLOS, H.; MAGNAVACA, R.; BAHIA FILHO, A. F. C.; DUQUE-VARGAS, J.; VINASCO, L. E. Genetics of tolerance to soil acidity in tropical maize. **Crop Science**, v. 34, p. 1511-1514, 1994.

PEREZ, L. E. P. **Nutrição Mineral de Plantas**. ESALQ/USP. 2003. Disponível em <http://orion.cpa.unicamp.br/sbfv/arquivos/aulas/grad01/05__nutricao_mineral/nutricao_mineral.pdf> Acesso em 24 de abril de 2007.

PURCINO, A. A. C. (Coord.). **Plano de gestão dos grupos temáticos da Embrapa**. Disponível em < <http://www.cnpms.embrapa.br/nucleos/nea/nea.html> > Acesso em 20 de março de 2004.

QUEIROZ, R. J. B. **Quantificação da trealose e da prolina livre em cana-de-açúcar sob efeito da disponibilidade hídrica do solo**. 2006. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

RAMESH, P. Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. **Journal Agronomy & Crop Science**, Berlin, v. 85, p. 83-89, 2000.

RAYMOND, M. J.; SMIRNOFF, N. Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. **Annals of Botany**, Oxford, v. 89, p. 813-823, 2002.

REVISTA ALCOOLBRAS. **Seca e recorde de exportação contrastam no início do ano agrícola**. ed. 91, 2005a. Disponível em: <http://www.revistaalcoholbras.com.br/edicoes/ed_91/especial.html>. Acesso em 25 fev. 2006.

RÍNCONES, C. Variación del contenido de prolina en ocho variedades de caña de azúcar a cuatro niveles de humedad en el suelo. **Caña de Azúcar**, Maracay, v. 15, p. 3-16, 1997.

ROSENFELD, U.; LEME, R. J. A. Produtividade da cana-de-açúcar irrigada por aspersão- estudo de épocas de irrigação. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 3, 1984, São Paulo. **Anais...** p.77-84.

ROSSETTO, R. Novas variedades IAC de cana-de-açúcar. **O Agrônomo**, Campinas, v. 52, p. 22-27, 2000. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/OAgronomico/522-3/5223_p22_cv_cana.pdf>. Acesso em: 20.06.2007.

ROSSETTO, R.; SPIRONELLO, A.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. Calagem para cana-de-açúcar e sua interação com a adubação potássica. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 1, p. 105-119, 2004.

SANDERSON, M. A.; STAIR, D. W.; HUSSEY, M. A. Physiological and morphological responses of perennial forages to stress. **Advances in Agronomy**, v. 59, p. 172-208, 1997.

SATAKOPAN, V.N.; BASKARAN, G.; SANKAR, M. Changes in the levels of RNA, proline, phenol and ascorbic acid in Al^{3+} toxicity in chickpea seedlings. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 35, n. 3, p. 272-274, 1992.

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.; NÓBREGA, J. C. M. (Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. 415p.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, n. 8, p. 854-864, 2005.

SILVEIRA, J. A. G.; ROCHA, I. M. A.; VIÉGAS, R. A. **Metabolic responses of cowpea and cashew plants exposed to salt and water stress: new aspects on proline accumulation**. 2002. Disponível em: <sbbq.iq.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumo/Palestras/016.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2007.

SIMPLÍCIO, J. B. **Tolerância comparada de cultivares de milho ao alumínio, em cultivos hidropônicos de curta e média duração**. 1999. 48 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 1999.

SOBRAL, A. F. DE; GUIMARÃES, V. O. S. Relação entre a toxicidade do alumínio e a produção de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 287-292, 1992.

SOCICANA. **Características Agronômicas das Variedades IAC**. 2006, p.2. Disponível em: < http://www.coplana.com/gxpfles/ws001/design/Download/VariedadesCana/IAC/Caracteristicas_Agronomicas_das_Variedades_IAC.pdf> Acesso em 20.06.2007.

SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G. B (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. p. 94-113.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TERAMOTO, E. R. **Avaliação e aplicação de modelos de estimativa de produção de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) baseados em parâmetros do solo e clima**, 2003. 96p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2003.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 1005-1024, 2000.

UNICA, 2004. **Cana-de-açúcar: história**. www.unica.com.br. Disponível em:< [http://www.portalunica.com.br/portalunica/?Secao=memoria & SubSecao=cana-de-açúcar&SubSubSecao=história&id=%20and%20id=1](http://www.portalunica.com.br/portalunica/?Secao=memoria&SubSecao=cana-de-acucar&SubSubSecao=historia&id=%20and%20id=1)> Acesso em 06 de abril de 2008.

Van den BERG, M.; BURROUGH, P. A.; DRIESSEN, P. M. Uncertainties in the appraisal of water availability and consequences for simulated sugarcane yield potentials in São Paulo State, Brazil. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 81, p. 43-55, 2000.

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. Instituto Agrônomo/Fundação IAC, 1997. 285 p. (Boletim técnico, 100).

VASCONCELOS, S. S.; ROSSIELLO, R. O. P.; JACOB-NETO, J. Parâmetros morfológicos para estabelecer tolerância diferencial á toxicidade de alumínio em cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 357-363, 2002.

VERSLUES, P. E., BRAY, E. A. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 1, p. 201-212, 2006.

VIEIRA JUNIOR, P. A.; VIEIRA, A. C. P. ; BUAINAIN, A. M.; LIMA, F.; SILVEIRA, J. M. J. Produção brasileira de cana-de-açúcar e deslocamento da fronteira agrícola no estado do Mato Grosso. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 38, n. 4, 2008.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, (IBP Hand book, 15), 1970. 200p.

VITORELLO, V. A.; CAPALDI, F. R.; STEFANUTO, V. A. Recents advances in aluminium toxicity and resistente in higher plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 17, n.1, p. 129-143, 2005.

WATT, D. A. Aluminum-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 385, p. 1163-1174, 2003.

XU Z.; ZHOU, G. Research advance in nitrogen metabolism of plant and its environmental regulation. **Journal Applied of Ecology**, v. 15, n. 3, p. 511-6, 2004.

ZAIFNEJAD, M. **Aluminium toxicity and water deficit effects on leaf photosynthesis and stomatal conductance, growth traits, praline, organic acids, and mineral nutrients in sorghum**. 1993. 268f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – University of Nebraska, LinconIn.

ZAIFNEJAD, M.; CLARK, R.B.; SULLIVAN, C.Y. Aluminum and water stress effects on growth and proline of sorghum. **Journal of Plant Physiology**, v.150, n.3, p.338-344, 1997.

APÊNDICE

Tabela I. Teste de Tukey da atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.

Tratamentos ¹	Teste de Tukey ²
H ₁ = 70%	0,2669A
H ₂ = 55%	0,3153A
H ₃ = 40%	0,3197A
A ₁ = 55%	0,2734B
A ₂ = 33%	0,3625A
A ₃ = 23%	0,2660B
DMS	0,0668

D.M.S.: Diferença Mínima Significativa; ¹Disponibilidade hídrica: H₁ = 70%, H₂ = 55%, H₃ = 40%. Acidez: A₁ = 55%, A₂ = 33%, A₃ = 23%. ²Médias seguidas de mesma letra na vertical (nos tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela II. Desdobramento do teste de Tukey da atividade da redutase do nitrato em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.

Disponibilidade hídrica (H) ²	Teste de Tukey da atividade da redutase do nitrato (µg N-NO ₂ g ⁻¹ de massa fresca de raízes h ⁻¹) ¹		
	Acidez do solo (A) ²		
(%)	55%	33%	23%
70	0,2574 aA	0,2814 aB	0,2619 aA
55	0,2581 bA	0,4565 aA	0,2315 bA
40	0,3048 aA	0,3498 aAB	0,3044 aA
DMS	0,1157		

D.M.S.: Diferença Mínima Significativa; ¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05). ²Disponibilidade hídrica: H₁ = 70%, H₂ = 55%, H₃ = 40%. Acidez: A₁ = 55%, A₂ = 33%, A₃ = 23%.

Tabela III. Teste de Tukey dos teores de prolina livre em raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.

Tratamentos ¹	Teste de Tukey ²
H ₁ = 70%	0,6994A
H ₂ = 55%	0,6854A
H ₃ = 40%	0,7509A
A ₁ = 55%	0,8347A
A ₂ = 33%	0,5409B
A ₃ = 23%	0,7600A
DMS	0,0774

D.M.S.: Diferença Mínima Significativa; ¹Disponibilidade hídrica: H₁ = 70%, H₂ = 55%, H₃ = 40%. Acidez: A₁ = 55%, A₂ = 33%, A₃ = 23%. ²Médias seguidas de mesma letra na vertical (nos tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Tabela IV. Desdobramento do teste de Tukey dos teores de prolina livre raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar, cv. IAC91-5155, sob efeito associado da disponibilidade hídrica e da acidez do solo, por 60 dias (90 DAP). Jaboticabal, SP. 2006-2007.

Disponibilidade hídrica (H) ²	Teste de Tukey dos teores de prolina livre		
	(μmol g ⁻¹ de massa fresca de raízes) ¹		
	Acidez do solo (A) ²		
(%)	55%	33%	23%
70	0,6150 bB	0,5216 bA	0,9615 aA
55	0,8793 aA	0,6143 bA	0,5627 bC
40	1,0098 aA	0,4869 cA	0,7559 bB
DMS	0,1341		

D.M.S.: Diferença Mínima Significativa; ¹Médias seguidas de mesma letra minúscula na horizontal e maiúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05). ²Disponibilidade hídrica: H₁ = 70%, H₂ = 55%, H₃ = 40%. Acidez: A₁ = 55%, A₂ = 33%, A₃ = 23%.

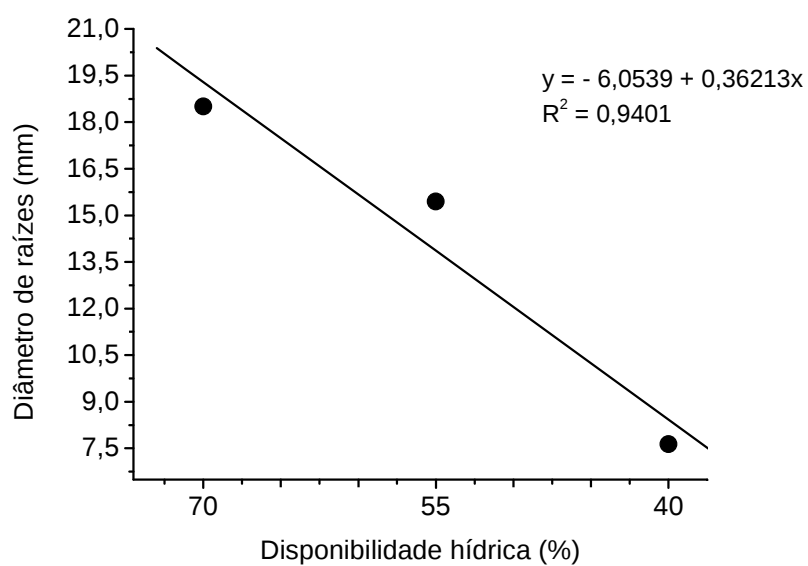


Figura I. Diâmetro de raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito da disponibilidade hídrica do solo, após 60 dias.

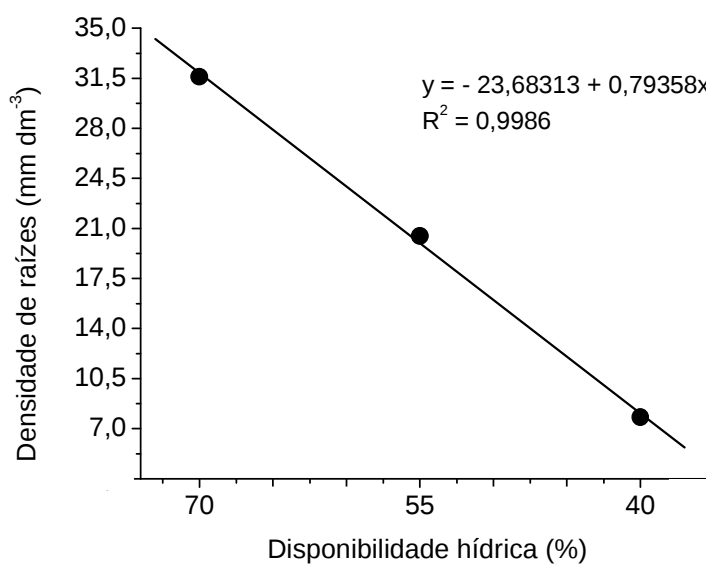


Figura II. Densidade de raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito da disponibilidade hídrica do solo, após 60 dias.

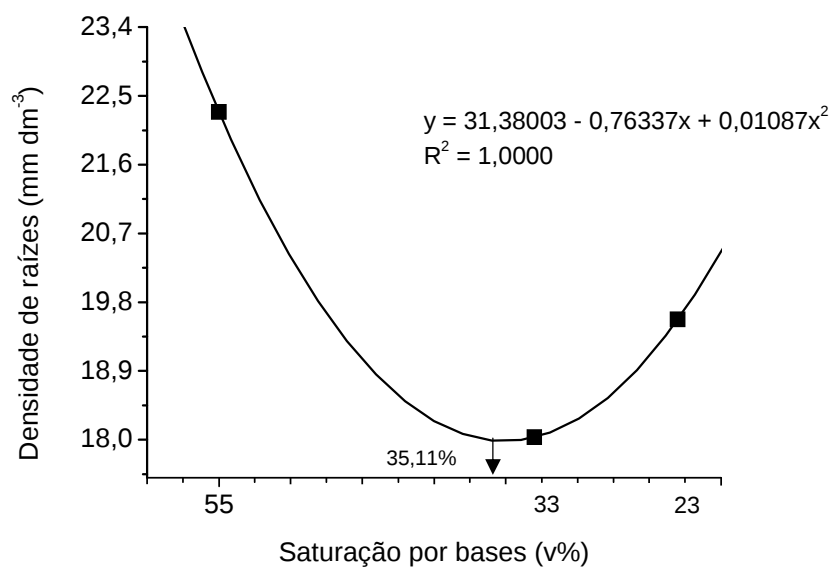


Figura III. Densidade de raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito da acidez do solo, após 60 dias.

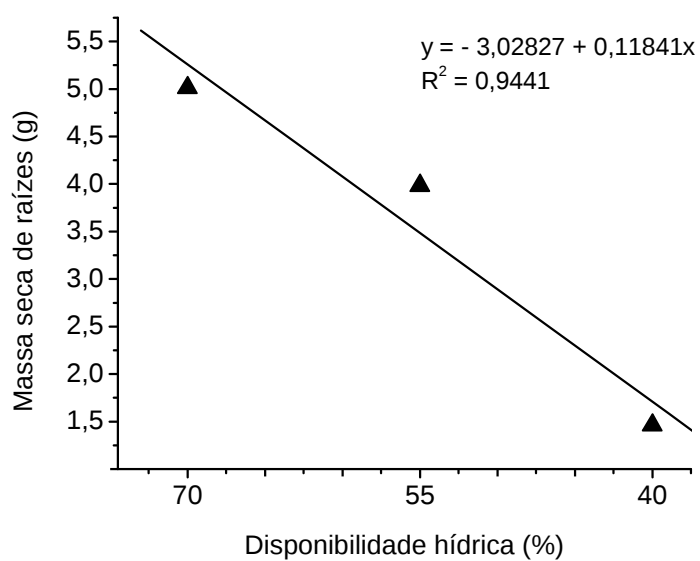


Figura IV. Massa seca de raízes de plantas jovens de cana-de-açúcar cv. IAC91-5155 sob efeito da disponibilidade hídrica do solo, após 60 dias.