



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU



ESTUDO DA FISILOGIA DE GEMAS LATERAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR DURANTE O ARMAZENAMENTO

WILIAN POLACO BRAMBILLA

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas
(Botânica).

BOTUCATU – SP

Agosto - 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU



ESTUDO DA FISILOGIA DE GEMAS LATERAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR DURANTE O ARMAZENAMENTO

WILIAN POLACO BRAMBILLA

Orientador: Prof. Dr. João Domingos Rodrigues

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da UNESP – Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas
(Botânica).

BOTUCATU – SP

Agosto – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Brambilla, Wilian Polaco.

Estudo da fisiologia de gemas laterais de cana-de-açúcar durante o armazenamento / Wilian Polaco Brambilla. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: João domingos Rodrigues

Capes: 20303009

1. Cana-de-açúcar - Fisiologia. 2. Fisiologia vegetal. 3. Stress oxidativo. 4. Melhoramento genético.

Palavras-chave: Brotação ; Estresse oxidativo ; Saccharum sp.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe e meu pai, que me apoiaram e incentivaram com amor e paciência em todos os momentos.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, que sempre me apoiou pela saúde, paz e força para alcançar todos meus objetivos.

Agradeço profundamente a todas as pessoas que entraram na minha vida e se tornaram amigos e companheiros, que incentivaram e ajudaram na superação de todos os obstáculos.

Minha enorme gratidão a todos os professores por compartilharem com generosidade, amor e dedicação suas sabedorias, sendo de fundamental importância para a elaboração deste trabalho, assim como para a futura vida profissional, em especial, ao meu orientador Prof. Dr. João Domingos Rodrigues por aceitar a orientação deste trabalho e contribuir para seu desenvolvimento, com muita sabedoria e paciência.

À minha namorada, Jordana Rinaldi, pela paciência e pelo companheirismo nesta dissertação. Os seus conselhos foram muito importantes para superar algumas dificuldades neste percurso.

E, por fim, à minha maravilhosa família, ao meu pai José Roberto Brambilla e minha mãe Rosângela Maria Polaco Brambilla, que são responsáveis por eu estar nesta jornada da vida e fizeram que meus passos sempre seguissem para o melhor caminho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de brotação de gemas de cana-de-açúcar em diferentes temperaturas de armazenamento (4, 8, 12 e 16°C) e diferentes épocas de coletas (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).....	22
Tabela 2. Porcentagem de brotação de gemas de cana-de-açúcar, após a aplicação de Benzilamina 6 Purina em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L ⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).....	25
Tabela 3. Médias de atividade da enzima superóxido dismutase em gemas de cana-de-açúcar, após a aplicação de Benzilamina 6 Purina em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L ⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).....	26
Tabela 4. Médias de atividade da enzima catalase em de gemas de cana-de-açúcar, após a aplicação de Benzilamina 6 Purina em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L ⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).....	27
Tabela 5. Médias de atividade da enzima peroxidase em de gemas de cana-de-açúcar, após a aplicação de Benzilamina 6 Purina em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L ⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).....	28
Tabela 6. Médias dos teores de peroxidação de lipídeos (nmol/g de tecido fresco) em de gemas de cana-de-açúcar, após a aplicação de Benzilamina 6 Purina em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L ⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).....	29
Tabela 7. Médias dos teores de açúcares totais solúveis, expressos em mg/g de matéria seca, em de gemas de cana-de-açúcar, após a aplicação de Benzilamina 6 Purina em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L ⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).....	29

SUMÁRIO

1. RESUMO	v
2. ABSTRACT	vi
3. INTRODUÇÃO	7
4. REVISÃO DE LITERATURA	10
4.1. Propagação	10
4.2. Dormência de gemas	10
4.3. Temperatura	11
4.4. Citocininas	14
5. MATERIAL E MÉTODO	16
5.1. Estudo I: Armazenamento de gemas com uso de baixas temperaturas e alta umidade	17
5.2. Estudo II: Superação da dormência de gemas após armazenamento a baixas temperaturas	17
5.3. Análises Bioquímicas	18
5.3.1. Processamento do material vegetal para obtenção do extrato bruto	18
5.3.2. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)	18
5.3.3. Atividade da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	19
5.3.4. Atividade da enzima Peroxidase (PODs, EC 1.11.1.7)	19
5.3.5. Determinação da peroxidação de lipídios	20
5.3.6. Determinação de açúcares totais	20
5.4. Análise estatística	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
8. CONCLUSÃO	32
9. REFERÊNCIAS	33

1. RESUMO

O presente trabalho objetivou caracterizar a dinâmica das gemas de cana-de-açúcar quando armazenadas em baixas temperaturas e o uso de regulador vegetal com o intuito de aumentar sua vida útil durante o armazenamento. Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. O trabalho constou de dois estudos: no primeiro, as gemas foram armazenadas em baixas temperaturas (4, 8, 12, e 16°C) e alta umidade relativa (80%), sendo realizadas coletas em intervalos de 3 dias (zero a 24 dias). A temperatura que apresentou maior taxa de brotação ao final do experimento foi 12°C. No segundo estudo, as gemas mantidas a temperatura de 12°C foram submetidas ao armazenamento com tratamento de soluções de benzilaminopurina (BAP). A aplicação do regulador vegetal não influenciou na brotação das gemas. Por outro lado, constatou-se influência na atividade das enzimas antioxidantes.

Palavras-chave: *Saccharum* sp.; estresse oxidativo; brotação.

2. ABSTRACT

The present study aimed to characterize the dynamics of the sugar cane buds that when stored at low temperatures and the use of plant growth regulators in order to increase their shelf life during storage. The experiments were conducted in a completely randomized design and the results submitted to variance analysis and means were compared by Tukey test at 5% probability. The work consists of two studies: the first, the buds were stored at low temperatures (4, 8, 12, and 16°C) and high humidity (80%), and harvested at intervals of 3 days (zero to 24 days). The temperature that had higher rates of sprouting at the end of the experiment was 12°C. In the second study, the buds stored at temperature of 12°C were subjected to treatment with benzylaminopurine (BAP) solutions. The application of the plant growth regulator did not affect budburst. Moreover, it was found influences in the activity of antioxidant enzymes.

Keywords: *Saccharum* sp.; oxidative stress; budding.

3. INTRODUÇÃO

A cana de açúcar pertence à família Poaceae e ao gênero *Saccharum*, que abrange várias espécies, porém, as canas atualmente cultivadas, na sua maioria, são híbridas.

É uma planta perene e própria de climas tropicais e subtropicais. Há várias espécies pertencentes ao gênero *Saccharum*: *S. officinarum* L., *S. spontaneum* L., *S. robustum* J., *S. sinnensis* R. e *S. barberi*, mas as variedades hoje, em cultivo comercial, são híbridas de várias espécies. Nesses híbridos procura-se aliar a rusticidade, resistência a moléstias e às altas quantidades de açúcares das variedades *Saccharum officinarum*.

O centro de origem dessas espécies tem sido reportado por diversos autores e as ilhas do Arquipélago da Polinésia, Nova Guiné e Índia estão entre as regiões mais citadas. Dessa forma, acredita-se que seja nativa do sul da Ásia, embora seu exato centro de origem seja incerto.

A cana de açúcar chegou ao Brasil em 1502 junto com a colonização, mas ficou estagnada, pois havia pouca mão de obra e os moradores daquela época estavam preocupados com o extrativismo de madeira e da descoberta de minas de ouro e prata. Somente depois de três décadas teve início o cultivo de cana de açúcar no Brasil, pois as novas terras estavam sendo ameaçadas por invasões dos franceses, ingleses e contrabandistas. Havia também um aumento da demanda de açúcar na Europa, fato que estimulou o movimento migratório para povoação da costa brasileira.

O cultivo expandiu rapidamente, após 17 anos já existiam 23 engenhos só em Pernambuco. Em 1580, o Brasil já havia conquistado o monopólio mundial de produção de açúcar.

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar, seguido da Índia, Cuba, México e China. O Brasil não é apenas o maior produtor, é também o primeiro em produção de açúcar e etanol.

A partir do século XXI, a expansão da cana de açúcar se deve a razão de novos cenários, tendo em vista questões ambientais, petróleo versus etanol e a co-geração de energia via queima do bagaço e palha.

O panorama atual para a agroindústria da cana de açúcar se mostra favorável, em função dos preços do petróleo e da forte demanda da sociedade com relação à proteção ao meio ambiente.

Considerando sua importância no setor agrícola, esforços combinados estão sendo realizados para o aperfeiçoamento de técnicas para sua propagação. A quantidade de estudos envolvendo a cana de açúcar não é proporcional à sua importância em termos de fonte alimentar e de energia.

A forma de propagação da cultura no sistema convencional é por estacas (talos), com cerca de 3 gemas e 30-40 cm de comprimento e uma alternativa de plantio seria a utilização de segmentos do nó (explantes) contendo uma única gema. Dessa forma, o volume poderia ser reduzido em cerca de 80% e, assim, facilitaria o armazenamento e o transporte do material para propagação das plantas “sementes”.

O armazenamento das gemas sob temperatura adequada pode ser utilizado para regular a oferta do produto e reduzir as perdas pós-colheita. O armazenamento sob temperatura adequada pode controlar a dormência e a brotação precoce, evitando o esgotamento das reservas necessárias à emergência das plântulas. Dessa forma, o armazenamento das gemas é importante para o equilíbrio da oferta de material propagativo no mercado.

A utilização de baixas temperaturas pode ser uma alternativa para a redução do metabolismo das gemas, possibilitando o armazenamento por longos períodos sem afetar sua viabilidade. No entanto, a literatura não esclarece os mecanismos de tolerância da gema à baixa temperatura e seu posterior desenvolvimento.

Um estudo mais abrangente sobre monitoramento das enzimas oxidativas como marcadores bioquímicos para a avaliação dos diferentes níveis de estresse e o conteúdo de carboidratos em condições de baixas temperaturas deve ser levado em consideração, para a compreensão e estabelecimento da sequência de eventos que levam à indução e liberação da dormência de gemas de cana-de-açúcar.

A duração da dormência pode variar de acordo com o genótipo e, em função, do balanço hormonal entre promotores e inibidores do crescimento, sendo que a brotação ocorre quando há balanço favorável dos promotores em relação aos inibidores.

As citocininas ocorrem naturalmente nas plantas, elas controlam múltiplos processos durante o ciclo de vida das plantas superiores, dos quais alguns são

essenciais para o crescimento e o desenvolvimento normal das mesmas. Segundo CID (2005), o uso das citocininas, quando aplicados no pré-armazenamento, causam um aumento da síntese de RNAs e proteínas após cerca de 70 horas da aplicação, além de retardar a degradação de clorofila, podendo mantê-las viáveis por um maior período de tempo.

O presente trabalho foi desenvolvido como contribuição ao entendimento do comportamento das gemas isoladas de cana-de-açúcar, submetidas às baixas temperaturas e sua posterior brotação, bem como, determinar o efeito da aplicação de citocininas no pré-armazenamento, objetivando prolongar sua viabilidade.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Propagação

A cana de açúcar pode ser propagada por sementes, brotos e rizomas nodal. Muitas variedades são altamente heterogênicas sendo comercialmente propagadas assexuadamente por segmentos de caule com uma ou mais gemas, com cerca de 30 a 40 cm de comprimento, portadoras de tecidos meristemáticos com elevada capacidade proliferativa. Esta grande massa de material de plantio representa um grande problema nos transportes, movimentação e armazenagem de cana “semente” e sofre rápida deterioração, reduzindo assim, a viabilidade das gemas e, posteriormente, a sua brotação. Novas tecnologias estão surgindo com o intuito de reduzir cada vez mais o tamanho dos propágulos.

Narendranath (1992) estudou a viabilidade econômica da utilização de um segmento do nó contendo uma única gema na propagação de cana de açúcar e observou que o volume pode ser reduzido em cerca de 80% com esse método, oferecendo vantagens para o transporte. O mesmo autor menciona que a técnica é economicamente viável, pois o restante do colmo ainda poderia ser utilizado na indústria, abatendo os custos de produção.

Estudando a brotação, Clements (1940) avaliou o efeito do corte de toletes em diferentes tamanhos e números de gemas (1 a 5 gemas por tolete). Encontrou melhores resultados para menores tamanhos de toletes (com menos gemas).

4.2. Dormência de gemas

A dormência de gemas é definida pela falta de crescimento visível num determinado período de tempo quando expostas a condições ambientais que normalmente permitiriam sua brotação e a mesma confere para a planta a sincronização do desenvolvimento para a sobrevivência a estresses ambientais.

Em geral, plantas lenhosas de regiões temperadas, paralisam o crescimento das gemas durante os dias frios e curtos do ano, entrando em dormência. Porém, a dormência pode também ocorrer em plantas herbáceas. Já a maioria das espécies

herbáceas perenes e das poáceas não entra em dormência controlada por fatores endógenos. O fenômeno de paralisação de crescimento anual de gemas de plantas herbáceas com o objetivo de proteger seus meristemas e resistir aos invernos frios é similar quanto à função, embora não idêntico, à dormência que ocorre em sementes, bulbos e tubérculos. Essas plantas, quando expostas novamente a condições ideais, retomam seu desenvolvimento (LARCHER, 2000).

4.3. Temperatura

No início da década de 60, Salibe e Roessing (1960) e Sing e Bakhshi (1963) dentre outros autores iniciaram estudos sobre métodos de armazenamento e conservação de borboulhas (gemas) de laranjeiras com uso de baixas temperaturas visando manter a viabilidade destas durante o armazenamento. Esta técnica ainda é pouco empregada para cana de açúcar e estudos sobre os comportamentos morfofisiológicos das mesmas, quando submetidas a baixas temperaturas são escassos.

Jain et al. (2007) relataram que as baixas temperaturas interferem no metabolismo e translocação de metabólitos essenciais para a brotação das gemas. No entanto, as atividades de enzimas antioxidantes, como catalase e peroxidase podem proteger as gemas de danos oxidativos e, talvez, possa ser responsável pela manutenção da dormência secundária sob condições de estresse a baixa temperatura.

A utilização de gemas isoladas em escala comercial ainda é pequena, devido à baixa sobrevivência das mesmas em condições de campo. Quanto ao armazenamento, os maiores problemas estão relacionados com a viabilidade das gemas. Pesquisadores do Instituto Indiano de Pesquisa da Cana concentram esforços para explorar as bases bioquímicas e fisiológicas no intuito de aumentar a viabilidade durante o período de armazenamento de gemas de cana de açúcar. Resultados expressivos foram obtidos com a utilização de sacos de polietileno e armazenamento sob condições de baixa temperatura ($10 \pm 1^\circ\text{C}$). Nessas condições, as gemas apresentaram 80% de brotação após 10 dias de armazenamento, enquanto as armazenadas à temperatura ambiente apresentaram cerca de 40% de brotação (JAIN, 2010).

O fator climático de maior importância e limitante para a cana é a temperatura, devido à mesma ser originária de clima tropical e a temperatura ideal para seu desenvolvimento estar entre 25 a 30°C. Temperaturas acima de 35°C comprometem seu metabolismo e superiores a 38°C reduz o crescimento a taxas praticamente nulas, podendo chegar aos 47°C. No que diz respeito a baixas temperaturas, esta afeta os processos fisiológicos drasticamente, em valores abaixo de 20°C seu crescimento é praticamente nulo (RODRIGUES, 1995).

As membranas vegetais são constituídas de uma bicamada lipídica entremeada com proteínas e esteróides, os lipídios possuem altas cadeias de ácidos graxos, essa propriedade física tem grande influência sobre as atividades das proteínas integrais de membrana, H^+ + ATPases, proteínas formadoras de canais que regulam o transporte de íons e solutos, assim como, o transporte de enzimas das quais depende o metabolismo. Em baixas temperaturas as membranas tendem a se solidificarem em um estado semicristalino, afetando sua permeabilidade e, conseqüentemente, comprometendo o desenvolvimento da planta (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A temperatura determina a velocidade de reações enzimáticas, na maioria das espécies e tecidos vegetais, um aumento de 10°C, na faixa entre 5°C e 25°C, dobra a taxa respiratória. Abaixo de 5°C, há redução drástica da taxa respiratória, enquanto ao redor de 30°C ocorre aumento considerável, porém não tão rápido como na faixa de 5° a 25°C. Tal resultado é interpretado como decorrência do fato do O_2 não se difundir com eficiência nesta temperatura. A atividade respiratória está acoplada ao crescimento e armazenamento, sendo o crescimento definido como a conversão de substratos respiratórios em novas estruturas (MARENCO; LOPES, 2005).

Segundo Withers e Williams (1990), o crescimento lento que envolve a depressão do metabolismo das plantas tem sido utilizado com sucesso para conservar a cultura de gemas de muitas espécies sem afetar sua viabilidade. Na redução do metabolismo das plantas têm-se utilizado como estratégia, modificações nas condições físicas (temperatura) ou químicas do meio de cultivo (nutrientes orgânicos e inorgânicos, reguladores osmóticos ou inibidores de crescimento).

Jain et al. (2007) mantiveram plantas adultas de cana de açúcar nas temperaturas de 6, 15 e 25°C por 30 dias e observaram que, após o plantio, mais de

80% das gemas oriundas das plantas que foram mantidas a 25°C brotaram, no entanto, quando foram mantidas a 15°C houve redução significativa na brotação (56%) e apenas 23% das gemas brotaram após armazenamento à temperatura de 6°C, mostrando que a temperatura pode ser responsável pela indução da dormência das gemas. No entanto, as atividades de enzimas antioxidantes, como catalase e peroxidase podem proteger as gemas de danos oxidativos, mantendo-as viáveis.

As baixas temperaturas podem ocasionar estresse à gema e, independentemente do tipo de estresse, a planta pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Este fato pode estar relacionado à redução de oxigênio dentro das células, favorecendo a produção ou o aumento das EROs, em particular os radicais superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que reagem com vários componentes celulares e podem provocar reações prejudiciais, tais como alterações de DNA, degradação de proteínas e peroxidação de lipídios, que resulta em estresse oxidativo.

Sob condições normais, o equilíbrio redox da célula é mantido por mecanismos antioxidantes capazes de prevenir a oxidação pela remoção das EROs. Tais mecanismos envolvem sistemas enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os mecanismos enzimáticos encontram-se a ação da superóxido dismutase (SOD), que catalisa o O_2^- a H_2O_2 , em seguida, H_2O_2 pode ser desintoxicado a H_2O pela catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona peroxidase (GPX), entre outras peroxidases (LEE; LEE, 2000).

A influência da temperatura sobre a cinética da reação enzimática deve ser entendida em duas fases distintas: no princípio, aumentos de temperatura levam a aumentos da velocidade de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas componentes do sistema. Esse efeito é observado em um intervalo de temperatura compatível com a manutenção da estrutura espacial da enzima. Temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura tridimensional. Rompidas as pontes de hidrogênio, que são ligações bastantes termolábeis, desencadeia-se uma cascata de alterações estruturais, levando a enzima a uma nova conformação ou a um estado sem estrutura definida. A temperatura que provoca desnaturação está, geralmente, pouco acima de sua temperatura ótima (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Estudos realizados por Jain et al. (2007) demonstraram que gemas expostas a baixas temperaturas apresentam menor disponibilidade de açúcares e redução na atividade das invertases ácidas, corroborando com os dados encontrados por Rai et al. (2007).

Os açúcares desempenham papel crucial no processo de brotação e capacidade de dreno (gemas) em mobilizar fotoassimilados em sua direção depende do tamanho do dreno e sua atividade. O acúmulo de sacarose é vital em todas as fases do ciclo de vida do vegetal e sua utilização como fonte de energia e de carbono requer sua hidrólise, realizada pelas enzimas invertases, transformando a sacarose em hexoses: glicose e frutose. O resfriamento de um tecido dreno (gemas) inibe as atividades que necessitam de energia metabólica e resulta na redução da velocidade do transporte em direção ao dreno (TAIZ; ZEIGER, 2009).

4.4. Citocininas

Nos últimos anos pesquisas têm sido voltadas para a obtenção de maiores incrementos na produção da cultura da cana, incentivando a utilização de técnicas mais avançadas, como a aplicação de reguladores vegetais alterando a morfologia e a fisiologia da planta (CASTRO, 1999).

As citocininas (CKs) são hormônios vegetais cuja principal função é regular a divisão celular. As mesmas estão relacionadas a outros processos fisiológicos, como a mobilização de nutrientes, a dominância apical, a formação e a atividade dos meristemas apicais e laterais, assim como, a superação da dormência de gemas. Estudos indicam que aplicações diretas de citocininas em gemas axilares de muitas espécies estimulam a divisão celular e o crescimento das mesmas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Para que as gemas sejam formadas é necessário que haja um aporte de nutrientes, pois os novos brotos funcionam como drenos. As citocininas também estão envolvidas no estabelecimento de drenos, atuando de modo direto em, pelo menos, duas proteínas, invertases e transportador de hexoses, as quais são necessárias para o descarregamento apoplástico do floema. A enzima invertase diminui o potencial químico da sacarose na região de descarregamento, favorecendo uma chegada contínua desse nutriente. Essa observação implica reconhecer que

um dos principais eventos desencadeadores da superação de dormência das gemas seria a hidrólise de citocininas glicosídicas armazenadas (forma principal de transporte pelo floema, conjugada com moléculas de açúcar), com a consequente liberação das bases livres ativas, retomando o crescimento (KERBAUY, 2008).

Além dos reguladores vegetais, a utilização de baixas temperaturas pode ser uma alternativa para a redução do metabolismo das gemas, possibilitando o armazenamento por longos períodos sem afetar sua viabilidade. No entanto, a literatura não esclarece os mecanismos de tolerância da gema à baixa temperatura e seu posterior desenvolvimento.

Um estudo mais abrangente sobre monitoramento das enzimas antioxidativas como marcadores bioquímicos para a avaliação dos diferentes níveis de estresse e o conteúdo de carboidratos em condições de baixas temperaturas deve ser levado em consideração, para a compreensão e estabelecimento da sequência de eventos que levam à indução e liberação da dormência de gemas de cana de açúcar.

5. MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica, pertencente ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu – SP e no Laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial pertencente à Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu-SP.

Foram utilizados colmos (gemas laterais) de cana de açúcar com 11 meses de idade, da variedade SP81-3250 provenientes da área experimental da Syngenta®, localizada no município de Itápolis-SP (21° 35' 45" latitude S, 48° 48' 46" de longitude Oeste e 481m de altitude).

Os colmos de cana de açúcar utilizados foram oriundos apenas da região apical, desfolhados manualmente, segmentados (5 cm de comprimento) transversalmente com auxílio de máquina de corte pneumático, selecionadas quanto à aparência, estágio de maturação, ausência de danos físicos, livre de doenças ou pragas e sanitizadas em solução de 50 mg L⁻¹ de cloro livre e lavadas em água deionizada. Após a higienização e classificação, as mesmas foram imersas em água destilada e em solução contendo 250 mg L⁻¹ de azoxistrobina + 125 mg L⁻¹ metalaxil-m + 41,7 mg L⁻¹ fludioxonil, durante 5 minutos. O intervalo de tempo entre o final do corte da cana de açúcar até a instalação dos experimentos foi de um dia.

O trabalho constou de dois estudos: no primeiro as gemas foram armazenadas em baixas temperaturas (4, 8, 12 e 16°C) e alta umidade relativa (80%), determinando-se a temperatura adequada para o armazenamento. No segundo, após determinada a melhor temperatura de armazenamento, as gemas foram tratadas com regulador vegetal, submetida a baixa temperatura e, posteriormente, transferidas à temperatura de 30°C e alta umidade relativa (80%) para o estudo do brotamento das mesmas (superação da dormência).

5.1. Estudo I: Armazenamento de gemas com uso de baixas temperaturas e alta umidade

Com os colmos já tratados e secos, os mesmos foram acondicionados em sacos plásticos com papel Germitest umedecido com água destilada na proporção de duas vezes e meia o peso do papel seco (BRASIL, 2009). Foram utilizadas as temperaturas de 4, 8, 12 e 16°C, mantidas em câmara incubadora do tipo B.O.D. (demanda bioquímica do oxigênio) e as coletas realizadas em intervalos de 3 dias (zero, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 dias).

Em cada coleta, os toletes foram plantados em bandejas de polietileno e coberto com uma camada de 2 cm de vermiculita expandida de granulometria média. A avaliação da dormência foi determinada por meio de teste biológico em sala de crescimento com temperatura controlada de $30 \pm 5^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz. Foram consideradas brotadas as gemas que emergiram seu afilho primário até um período máximo de 60 dias.

5.2. Estudo II: Superação da dormência de gemas após armazenamento a baixas temperaturas

Com base no estudo I (temperaturas de 4, 8, 12 e 16°C), a temperatura que apresentou maior porcentagem de brotação foi utilizada para execução do estudo II. Posteriormente, as gemas foram submetidas ao tratamento com soluções de benzilamina-6-purina (BAP: 0, 100 e 200 mg L⁻¹) por imersão durante uma hora. Após os tratamentos, as gemas foram acondicionadas em sacos plásticos com papel Germitest umedecido com água destilada na proporção de duas vezes e meia o peso do papel seco (BRASIL, 2009) e levado para acondicionamento em câmara fria.

A partir do armazenamento foram realizadas coletas em intervalos de 3 dias (zero, 3, 6, 9, 12 e 15 dias). Em cada coleta, amostras de gemas foram selecionadas para a realização das seguintes análises: atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e peroxidação lipídica),

níveis de açúcares totais, fenóis totais, atividade específica das invertases e teste de brotação.

Para a brotação, em cada coleta os toletes foram plantados em bandejas de polietileno e coberto com uma camada de 2 cm de vermiculita expandida de granulometria média. A avaliação da brotação foi realizada por teste biológico em sala de crescimento com temperatura controlada de $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas de luz. Foram consideradas brotadas as gemas que emergiram seu perfilho primário até um período máximo de 60 dias.

5.3. Análises Bioquímicas

Para as análises bioquímicas as amostras de gemas foram enroladas em papel alumínio, colocadas em sacos plásticos identificados e armazenados em ultrafreezer a -80°C . Posteriormente, o material foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (PODs), ascorbato peroxidase (APX), peroxidação de lipídios, teor de compostos fenólicos totais, teor de açúcares totais e atividade específica da enzima invertase ácida.

5.3.1. Processamento do material vegetal para obtenção do extrato bruto

As amostras foram processadas para obtenção do extrato bruto que foi obtido através da ressuspensão do material vegetal (300 mg) em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, suplementado com 200 mg de PVPP. Após centrifugação por 10 min. a $5.000 \times g$, o sobrenadante foi coletado e armazenado em ultrafreezer a -80°C .

5.3.2. Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)

A determinação da atividade da SOD considera a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do NBT (Azul de cloreto de nitrotetrazólio). A atividade foi

determinada pela adição de 50 μL de extrato bruto a uma solução contendo 13 mM de metionina, 75 μM de NBT, 100 nM de EDTA e 2 μM de riboflavina em 3,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8. A reação será iniciada pela iluminação dos tubos, em câmara composta por tubos fluorescentes (15 W), a 25°C. Após 5 minutos de incubação, o final da catálise foi determinado pela interrupção da luz (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). O composto azul formado (formazana) pela fotorredução do NBT foi determinado pela leitura em espectrofotômetro a 560 nm. Os tubos considerados “brancos” para a análise receberam os mesmos reagentes, porém, foram mantidos cobertos com papel alumínio, portanto, protegidos da luz. Uma unidade de SOD é definida como a atividade da enzima necessária para a inibição de 50% da fotorredução do NBT. Para o cálculo da atividade específica da enzima, considera-se a porcentagem de inibição obtida, o volume da amostra e a concentração de proteína na amostra ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$).

5.3.3. Atividade da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da enzima catalase foi determinada por medição em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 240 nm pelo monitoramento da variação da absorção do peróxido de hidrogênio, conforme Peixoto et al. (1999). Para o teste, 50 μL de extrato bruto foram adicionados a 950 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 suplementado com peróxido de hidrogênio a uma concentração final de 12,5 mM. A variação da absorção (ΔE) foi calculada em um intervalo de 80 segundos, sendo a atividade da enzima calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar $\varepsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade específica ($\mu\text{Kat } \mu\text{g Prot}^{-1}$) da catalase leva em consideração a concentração de proteína solúvel no teste.

5.3.4. Atividade da enzima Peroxidase (PODs, EC 1.11.1.7)

A atividade da enzima peroxidase foi determinada através da diluição (1:25) de 100 μL de extrato bruto e adicionados a 4,9 mL de solução tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8 contendo 20 mM de Pyrogallol e 20 mM H_2O_2 . Após

incubação por 1 min., a reação foi paralisada com 0,5 mL de H_2SO_4 e a leitura da absorbância realizada a 420 nm. A atividade específica ($\mu\text{Kat } \mu\text{g Prot}^{-1}$) da enzima foi calculada usando-se coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (PEIXOTO et al., 1999).

5.3.5. Determinação da peroxidação de lipídios

A peroxidação de lipídios será determinada de acordo com a metodologia proposta por Cakmak e Horst (1991). Amostras de matéria fresca de folhas com peso de 0,2 g foram homogeneizadas em 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% (p/v). O homogenato foi filtrado através de quatro camadas de gaze e, em seguida, centrifugado a 6.000 g por 15 min. Depois, em 0,5 mL de sobrenadante foi acrescentado 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). Os tubos foram fechados e incubados sob agitação em banho-maria, a 95°C por 2 horas. A reação foi paralisada pela transferência dos tubos de reação para um banho de gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 6.000 g por 10 min. A absorbância do sobrenadante foi lida a 532 e 660 nm. A concentração do complexo aldeído malônico-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) produzido foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HEATH; PACKER, 1968).

5.3.6. Determinação de açúcares totais

Os extratos foram submetidos a quantificação de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico, conforme Dubois et al. (1956). Uma alíquota de 10 - 100 μL do extrato bruto a ser analisada foi transferida para tubos de ensaio de vidro nos quais foram adicionados 900 – 990 μL de água deionizada, 500 μL de solução de fenol 5% e agitado levemente. Em seguida, foi adicionado 2,5 mL de H_2SO_4 concentrado diretamente sobre a amostra e homogeneizado levemente. Após esse processo, as amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente para o resfriamento da solução.

Uma curva de calibração foi obtida utilizando glicose como padrão para posterior estimativa da quantidade de açúcares totais em cada amostra. Soluções padrão de glicose através de diluições seriadas (a partir de uma solução de 10 mg mL⁻¹ nas seguintes concentrações: 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 200 mg mL⁻¹). Após o preparo de todos os padrões e amostras serão realizadas leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm, em cubetas de vidro, para gerar a curva de calibração e quantificar os teores de açúcares de cada tratamento.

5.4. Análise estatística

O experimento I foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições. Os dados obtidos foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. No total foram realizadas 10 coletas em intervalos de 3 dias, os resultados obtidos a partir da sexta coleta não foram apresentados devido os índices de brotação serem próximos de zero.

O experimento II foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos e quatro repetições. Os dados obtidos foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de brotação pode ser influenciado por fatores ambientais, genéticos e de tecnologia de plantio. Entretanto, esses fatores podem estar inter-relacionados e atuar complementarmente.

Em condições ideais, considera-se satisfatória uma brotação superior a 60% (CARGNIN et al., 2008). Analisando os dados na Tabela 1 constata-se que a testemunha (dia 0) apresentou 43,8% de brotação em média. Essa observação permite formular duas hipóteses a respeito desse índice de brotação reduzido: a primeira hipótese é devido ao estado fisiológico da planta, uma vez que, próximo do período da colheita as plantas passaram por um curto período de frio, podendo ter sido induzidos ao estado de dormência secundária. Outra hipótese é devido aos danos físicos, mesmo diante de todas as precauções no manuseio dos colmos, pelas gemas estarem expostas (retirada das folhas) há maior sensibilidade e suscetibilidade aos danos, decorrente do grande volume de material e atrito entre os mesmos, em razão disso, os danos são imperceptíveis visualmente, podendo ter superado o sistema de seleção.

Tabela 1. Porcentagem de brotação de gemas de cana-de-açúcar em diferentes temperaturas de armazenamento (4, 8, 12 e 16°C) e diferentes épocas de coletas (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).

Temperatura	0	3	6	9	12	15
4°C	42,5a	40,0a	15,0a	12,5b	11,3b	6,3ab
8°C	43,8a	42,5a	21,3a	16,3b	17,5bc	8,8b
12°C	43,8a	43,8a	25,0a	20b	21,3c	17,5c
16°C	45,0a	45,0a	7,5a	0a	0a	0a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Analisando o desempenho das gemas laterais na temperatura de 16°C (Tabela1) verificou-se que a partir dos 6 dias de armazenamento houve drástica redução na brotação, diferenciando dos demais tratamentos aos 9 dias, chegando a 0% de brotação. Contudo, esse fato pode estar relacionado com o aumento da contaminação microbológica, pois após a primeira coleta as gemas já apresentavam

forte odor alcoólico, característicos de fermentação. Alli e Baker (1982) estudando a fermentação de cana de açúcar salientaram que a produção de álcool deve ter correspondido ao consumo de aproximadamente 50% da sacarose presente na cana fresca, sendo as leveduras as responsáveis por este tipo de fermentação e que o restante das perdas seria devido, principalmente, ao consumo de açúcares durante a fase aeróbica, pela respiração da planta e em menor quantidade pela produção de ácidos pelas bactérias anaeróbicas, ocasionando morte precoce das gemas.

Com relação ao comportamento da brotação ao longo dos dias de armazenamento, as temperaturas de 4, 8, 12 e 16°C apresentaram resultados semelhantes até aos 6 dias, já aos 9 dias, as gemas armazenadas nas temperaturas de 4, 8 e 12°C apresentaram maior porcentagem de brotação em comparação à 16°C. Para todas as temperaturas de armazenamento houve redução abrupta da brotação após 6 dias de armazenamento, chegando a níveis próximos de zero a partir no 18º dia. A temperatura que proporcionou maior número de gemas viáveis por maior período de tempo quando armazenadas foi a de 12°C, seguida de 8 e 4°C, corroborando com os dados encontrados por Jain et al. (2007) que constataram melhor brotação na temperatura de armazenamento de $10 \pm 1^\circ\text{C}$ e redução proporcional com temperaturas mais baixas.

Os resultados da drástica queda na brotação nas temperaturas de 16, 12, 8 e 4°C após a segunda coleta pode estar relacionada às injúrias pelo frio, fato comum em produtos olerícolas armazenados. Elas ocorrem quando os produtos são expostos a temperaturas inferiores à temperatura mínima de segurança, mas acima do ponto de congelamento. A temperatura mínima de segurança é variável para os diferentes produtos, oscilando de 0 a 15°C e define a temperatura abaixo da qual os danos podem ocorrer, dependendo do tempo de exposição (CHITARRA; CHITARRA, 1990). Após a terceira coleta houve estabilização da brotação, mas com nova queda no 15º dia. Esse comportamento pode ser explicado pelo diferente estágio de maturação dos colmos, embora colhidos em uma única região (terço superior do colmo).

Enfatizando que a cana de açúcar é uma planta que perfilha, após a brotação das gemas, começam a se formar os perfilhos primários. Considerando que esses rebentos também possuem gemas e sistema radicular, essas gemas desenvolvem-se em novos rebentos, formando os rebentos secundários. Os rebentos secundários

originarão os terciários e, assim, sucessivamente. Tal característica pode ter influenciado na maturidade das gemas.

No decorrer da década de 60, muitos estudos comprovaram que plantas submetidas ao estresse abiótico mostravam decréscimo na atividade das citocininas presentes nas soluções de xilema e que essa diminuição repercutia no metabolismo e crescimento das mesmas. No entanto, o que se tem observado ultimamente é que as pesquisas têm se concentrado apenas nos efeitos do ácido abscísico, como se este fosse o único hormônio vegetal envolvido nos estresses abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os dados contidos na Tabela 2 mostram que não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre as doses de aplicação de benzilaminopurina (BAP) nas gemas de cana de açúcar em pré-armazenamento. Ainda assim, pode-se observar que nas duas primeiras coletas, 0 e 3 dias, o tratamento com BAP tendeu reduzir a brotação, comportamento que pode ser explicado pela liberação de óxido nítrico, molécula sinalizadora que atua como mensageiro secundário de diversas vias metabólicas, tais como indução do fechamento estomático em período de seca, ativação da transcrição de genes de defesa, indução a morte programada em células de calo, neutralização de metais pesados e salinidade (NARITA, 2010). Entretanto, essa molécula apresenta um lado altamente nocivo às plantas, devido à presença de um radical livre (elétron extra) que o torna um agente químico altamente reativo, promovendo lesão oxidativa das membranas celulares (reação de peroxidação lipídica), danos moleculares no DNA, proteínas e lipídios, porém, os dados são em razão ao estresse oxidativo, não inerentes as citocininas (CID, 2005).

As plantas apresentam três mecanismos de controle endógeno dos níveis de citocininas, que são redução da cadeia lateral, conjugação, hidrólise e oxidação. Em vista disso, pressupõe-se que a aplicação exógena de BAP visando o aumento dos níveis de citocininas tenha sido balanceada. Segundo Kerbauy (2008), BAP adicionadas aos tecidos vegetais são resistentes à oxidase. Portanto, conclui-se que a citocinina aplicada pode ter sido conjugada com açúcares (forma mais comum de conjugação). Essas moléculas conjugadas de citocininas são tidas como fisiologicamente inativas, elucidando o fato de não incremento na brotação de gemas com a aplicação de citocinina sintética.

Tabela 2. Porcentagem de brotação de gemas de cana de açúcar, após a aplicação de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).

Dose	0	3	6	9	12	15
0 mg L ⁻¹	70,0a	71,3a	57,5a	57,5a	52,5a	58,8a
100 mg L ⁻¹	57,5a	51,3a	51,3a	51,2a	46,3a	43,6a
200 mg L ⁻¹	66,3a	53,8a	52,5a	57,5a	63,8a	50,0a

Médias seguidas pela mesma letra, não diferente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Durante a brotação foi observada uma relação parte aérea/sistema radicular desproporcional se comparado com plantas sob condições ideais de desenvolvimento.

Essa observação, segundo Veselova et al. (2003) está relacionado ao aumento da quantidade de IAA em plantas submetidas a baixas temperaturas. Além disso, o IAA é conhecido por induzir a atividade de oxidase de citocinina (HARE; VAN STADEN, 1994), afetando adversamente a divisão celular durante a brotação. Todavia, apesar da auxina atuar em sinergismo com a citocinina para estimular a divisão celular, essas classes hormonais atuam antagonisticamente no controle da iniciação de ramos e raízes. Em suma, a auxina controla o desenvolvimento radicular e a citocinina o crescimento aéreo.

A superóxido dismutase (SOD) tem sido extensivamente investigada por sua atividade sob condições de estresse oxidativo, como uma resposta para metabolizar os radicais superóxido produzidos. Em baixas concentrações, as espécies reativas ao oxigênio (EROs) induzem genes de defesa e resposta adaptativa. Contudo, níveis subletais podem levar plantas a condições de estresses bióticos e abióticos e reduzir seu crescimento, provavelmente como parte da resposta adaptativa. Porém, respostas genômicas substanciais e atividades enzimáticas são afetadas pelas EROs e os mecanismos moleculares de adaptação ainda são pouco conhecidos. Em altas concentrações, as EROs levam a um programa de morte celular controlado

geneticamente. Também se comunicam com outras moléculas sinalizadoras e vias formando uma grande rede de resposta vegetal (MITTLER, 2002).

Encontra-se na Tabela 3 os valores das médias da atividade da enzima superóxido dismutase em gemas de cana de açúcar tratadas com diferentes doses de BAP. A análise de variância não mostrou efeito significativo dos tratamentos, entretanto, nota-se redução drástica na atividade da enzima no momento em que as gemas foram armazenadas à baixa temperatura. Em frutos, o aumento da atividade da enzima SOD tem sido associada à maior tolerância ao frio, devido a sua capacidade de combater a superprodução de radicais superóxido gerados em resposta ao estresse (EDAGI et al., 2010)

Tabela 3. Médias de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em gemas de cana de açúcar, após a aplicação de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).

Dose	0	3	6	9	12	15
0 mg L ⁻¹	0,175a	0,058a	0,051a	0,058a	0,053a	0,043a
100 mg L ⁻¹	0,173a	0,053a	0,050a	0,053a	0,033a	0,022a
200 mg L ⁻¹	0,168a	0,048a	0,031a	0,052a	0,025a	0,021a

Médias seguidas pela mesma letra, não diferente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Os resultados da atividade da enzima catalase estão apresentados na Tabela 4. Após três dias de armazenamento das gemas em baixas temperaturas, resultou em uma rápida redução da atividade da enzima catalase corroborando com os dados encontrados por Nir et al. (1986), em que observaram que gemas expostas a baixas temperaturas apresentam baixa atividade da enzima catalase. A catalase é uma enzima que está presente em células aeróbias e decompõe o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em oxigênio molecular e H₂O. A sua função fisiológica é remover o excesso de H₂O₂ produzido durante o metabolismo celular, impedindo assim, a sua acumulação e consequente dano celular. No entanto, múltiplas evidências indicam que o H₂O₂ é uma molécula que atua como um sinal químico que é gerado pelas plantas em resposta aos estresses bióticos e abióticos.

Tabela 4. Médias de atividade da enzima catalase em de gemas de cana de açúcar, após a aplicação de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).

Dose	0	3	6	9	12	15
0 mg L ⁻¹	0,71a	0,41a	0,17a	0,26a	0,38a	0,51b
100 mg L ⁻¹	0,70a	0,42a	0,26a	0,34a	0,29a	0,39ab
200 mg L ⁻¹	0,71a	0,29a	0,17a	0,31a	0,27a	0,27a

Médias seguidas pela mesma letra, não diferente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Considerando-se a atividade da enzima catalase em gemas de cana de açúcar observa-se que nas primeiras 5 coletas não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Na última coleta (15º dia) houve diferença estatística entre os tratamentos, sendo o tratamento com 200 mg L⁻¹ aquele que apresentou a menor atividade da enzima. Considerando a mesma como sinalizadora de estresse, presumisse que o aumento da concentração de BAP reduziu o nível de estresse imposto pelo frio.

As peroxidases são enzimas oxidativas envolvidas em vários processos fisiológicos vegetais, como nas reações de oxidação do ácido indol-3-acético (IAA), lignificação da parede celular, oxidação de compostos fenólicos, ligações de polissacarídeos, cicatrização de ferimentos, resposta a injúrias mecânicas, biossíntese de etileno, desenvolvimento celular, integridade das membranas celulares e na defesa contra patógenos (GASPAR et al., 1982). A atividade da peroxidase é frequentemente aumentada em resposta aos estresses, pois uma das suas principais funções é a proteção celular contra reações oxidativas em diversos tecidos vegetais (SIEGEL, 1993).

Em relação à comparação das médias de atividade da enzima peroxidase em gemas de cana de açúcar pode-se observar na Tabela 5 que a maior atividade da enzima foi no tratamento com 200 mg L⁻¹ de BAP. Segundo Solomon e Kumar (1987), baixos níveis de peroxidase indicam início de brotação em socas de cana de açúcar submetidas à baixa temperatura. Vários estudos apontam que a atividade da

peroxidase, geralmente, é alta durante a fase de máxima divisão celular, diminuindo durante o alongamento (PIZA, 2000).

A maior atividade da peroxidase no 15º dia na maior concentração de BAP (Tabela 5) parece estar relacionada a fatores estressantes, como o surgimento do óxido nítrico devido à aplicação exógena de citocininas (CID, 2005), causando aumento na atividade da enzima, provavelmente com a finalidade de promover a adaptação das gemas a estas condições, de modo a permitir seu desenvolvimento. Assim, considerando as peroxidases como indicador de estresse, pode-se concluir que as menores concentrações de citocinina promoveram menor estresse as gemas de cana de açúcar. Em contrapartida, Souza (2002) observou que durante a iniciação de órgãos e em regiões de intensa divisão celular, a atividade da peroxidase aumenta, por ser provavelmente, essencial no metabolismo do ácido indolilacético (IAA), modificando o balanço hormonal na planta, modulando a morfogênese.

Tabela 5. Médias de atividade da enzima peroxidase em de gemas de cana de açúcar, após a aplicação de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).

Dose	0	3	6	9	12	15
0 mg L ⁻¹	0,80a	0,91a	0,80a	0,78a	0,80a	0,95a
100 mg L ⁻¹	0,91a	1,02a	0,95a	0,92ab	0,82a	0,97a
200 mg L ⁻¹	0,78a	0,80a	0,82a	1,06b	1,18b	1,39b

Médias seguidas pela mesma letra, não diferente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Verificou-se que a aplicação de BAP não interferiu na peroxidação de lipídios nas duas primeiras coletas (Tabela 6), mas, houve redução na peroxidação de lipídios aos 3 e 6 dias na maior concentração de BAP, diferenciando estatisticamente da testemunha (0 mg L⁻¹) e de BAP a 100 mg L⁻¹. Tal efeito não foi observado nas duas últimas coletas.

Diferente das demais enzimas, que demonstram maior atividade com a aplicação de BAP, a peroxidação de lipídios respondeu de maneira distinta. Tal

efeito pode ser explicado pela capacidade das citocininas em proteger as membranas celulares da peroxidação e impedir o aparecimento de proteases e ribonucleases no citosol.

Tabela 6. Médias dos teores de peroxidação de lipídios (nmol/g de tecido fresco) em de gemas de cana de açúcar, após a aplicação de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).

Dose	0	3	6	9	12	15
0 mg L ⁻¹	13,4a	14,8a	16,2b	14,4ab	14,6a	15,1a
100 mg L ⁻¹	13,7a	13,7a	16,1b	16,3b	12,9a	15,0a
200 mg L ⁻¹	13,2a	14,1a	12,0a	12,5a	12,9a	14,6a

Médias seguidas pela mesma letra, não diferente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos na Tabela 7 mostram os valores dos teores de açúcares solúveis totais das amostras, que contabiliza a soma dos teores de glicose, frutose e sacarose. Evidencia-se queda nos teores de açúcares totais no 12º e 15º dia com aplicação de 200 mg L⁻¹ de BAP, diferenciando estatisticamente dos demais tratamentos. Foi comprovado anteriormente, que a aplicação de BAP causa um leve estresse às gemas, possivelmente, o decréscimo nos valores de açúcares totais seja pela utilização no processo respiratório.

Tabela 7. Médias dos teores de açúcares totais, expressos em mg/g de matéria seca, em de gemas de cana de açúcar, após a aplicação de benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0, 100 e 200mg L⁻¹) e armazenamento sob baixa temperatura (12°C) ao longo do tempo (0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias).

Dose	0	3	6	9	12	15
0 mg L ⁻¹	10,9a	12,3a	10,6a	11,0a	12,7b	11,5b
100 mg L ⁻¹	11,0a	10,5a	10,6a	11,0a	12,8b	11,3b
200 mg L ⁻¹	11,0a	10,7a	9,8a	11,725a	9,8a	9,9a

Médias seguidas pela mesma letra, não diferente entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância do setor sucroalcooleiro é indiscutível. Dentre as cadeias agroindustriais brasileiras, a cana de açúcar se apresenta como o principal vetor de crescimento do agronegócio brasileiro nos próximos anos, tanto pela vertente alimentícia quanto energética.

Para a maximização do potencial da cadeia de produção da cana de açúcar é necessário desenvolver um conjunto de conhecimentos fisiológicos, bioquímicos e fitotécnicos, a começar pela disponibilidade de materiais propagativos. O fácil acesso a materiais vegetativos que apresentam maior adaptabilidade às condições agrônomicas geram redução no custo de produção.

No Brasil, são escassos os trabalhos com uso de microtoletes, mas novas pesquisas estão surgindo. Estudos iniciais têm mostrado que a tecnologia destes pode ser uma das alternativas mais viáveis e econômicas na redução de custo de produção da cana. Contudo, para um subsequente plantio, é necessário tomar algumas precauções no manuseio e armazenamento, devido às mesmas serem mais suscetíveis a danos. Por outro lado, em razão do baixo volume, o material pode ser tratado quimicamente como semente, reduzindo consideravelmente as chances de transmissão de doença.

O presente estudo ratificou a existência de uma melhor temperatura para o armazenamento dos microtoletes, bem como, o uso da citocinina com o intuito de manter as gemas viáveis por um maior período de tempo, que não resultou em diferenças significativas na brotação.

Apesar de sésseis, as plantas desenvolveram, no decorrer da evolução, inúmeros mecanismos de respostas específicas a variados estresses. Estes organismos conseguem alterar o seu plano de desenvolvimento para contornar situações desfavoráveis, como fatores abióticos. Além disso, podem contar com um arsenal de defesas constitutivas que já fazem parte do seu metabolismo. Espécies reativas de oxigênio agem isoladamente ou em conjunto desencadeando diversas reações dentro das células e seus tipos e níveis são fatores determinantes para o tipo de resposta. Diversos tipos de respostas a estresses já foram documentados e correlacionados. No entanto, a literatura não esclarece os mecanismos de tolerância das gemas à baixa temperatura e seu posterior desenvolvimento.

A principal contribuição científica e tecnológica do presente trabalho foi elucidar questões fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento das gemas de cana de açúcar, visando diminuir o tamanho do material de propagação a ser armazenado. Além disso, estudou a possibilidade de armazenamento de maiores quantidades e a possibilidade de aumentar o período de oferta das gemas de cana de açúcar para novos plantios.

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e nas condições deste trabalho pode-se concluir que a temperatura influencia no armazenamento de gemas de cana de açúcar, sendo a temperatura 12°C a mais adequada para o armazenamento e o uso de citocinina não influenciou na brotação de gemas submetidas à baixa temperatura.

9. REFERÊNCIAS

- ALLI, I.; BAKER. B.E. Studies on the fermentation of chopped sugarcane. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 7, p. 411-417, 1982.
- CARGNIN, A.; MÜLLER, J.A.; MELLO, F.D.A.; FOGAÇA, C.M. Brotação de variedades de cana-de-açúcar nas condições de cerrado do Brasil-central. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL, SAVANAS TROPICAIS, 2., 2008, Distrito Federal. **Anais...** Distrito Federal: Ed. Embrapa Cerrados, 2008.
- CASTRO, P.R.C. Maturadores químicos em cana-de-açúcar. **Saccharum**, v. 1, p. 12-16, 1999.
- CHITARRA, M.I.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 320 p.
- CID, L.P.B. **Hormônios vegetais em plantas superiores**. Brasília, DF: EMBRAPA, Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 188 p.
- CLEMENTS, H.F. Factors affecting the germination of sugar cane. **Hawaii. Plant. Rec.**, v. 44, p. 117-146, 1940.
- DUBOIS, M; GILLEWS, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBER, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, Washington, v.28, n.3, p. 350-6, 1956.
- EDAGI, F.K.; JOMORI, M.L.L.; KLUGE, R.A.; LIMA, G.P.P.; AZEVEDO, R.A.; SESTARI, I. Inibição da ação do etileno retarda o desenvolvimento de injúrias de frio em tangor 'Murcott'. **Ciênc. Rural**, v. 40, p. 1530-1536, 2010.
- GASPAR, TH.; PENEL,CL.; THORPE, T.; GREPPIN, H. Peroxidases, A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève, Genève, 1982, 324p.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiol.**, v. 59, p. 309-314, 1977.
- HARE, P.D. VAN STADEN. J. Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. *Physiol Plant*. 1994. v.91 p.128–136

HEATH, R.L.; PUCKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 125, p. 180-198, 1968.

JAIN, R.; SHRIVASTAVA, A.K.; SOLOMON, S.; YADAV, R.L. Low temperature stress-induced biochemical changes affect stubble bud sprouting in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). **Plant Growth Regul.**, v. 53, p. 17-23, 2007.

JAIN, R.; SOLOMON, S.; SHRIVASTAVA, A.K.; CHANDRA, A. Sugarcane bud chips: a promising seed material. **Sugar Tech.**, v. 12, n. 1, p. 67-69, 2010.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 431 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa Artes e Textos, 2000. 531 p.

LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. **Plant Sci.**, v. 159, p. 75-85, 2000.

MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. **Fisiologia vegetal**: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Viçosa: UFV, 2005.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.**, v. 7, p. 405-410, 2002. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)>. Acesso em: 15 jun. 2013. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9.

NARENDRANATH, M. Cost-effectiveness of transplanting nursery raised sugarcane bud chip plants on commercial sugar plantations. In: INTERNATIONAL SOCIETY SUGAR CANE TECHNOLOGY, 11., 1992, New Delhi, India. **Proceedings...** New Delhi: ISSCT, 1992. p. 332. Poster paper.

NARITA, I.Y. **Análise do óxido nítrico produzido durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro**. 2010. 42f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

NIR, G.; SHULMAN, Y.; FANBERSTEIN, L.; LAVEE, S. Changes in the activity of catalase in relation to the dormancy of grapevine (*Vitis vinifera* L) buds. **Plant Physiol.**, v. 81, p. 1140, 1986.

PEIXOTO, P.H.P.; CAMBRAIN, J.; ANNA, R.S.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminium effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Br. J. Plant Physiol.**, v. 11, p. 137-145, 1999.

PIZA, I.M.T. **Bromelina e peroxidase em plantas de Ananas comosus L. Merrill, sob condições de salinidade in vitro**. 2000. 123f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

RAI, R.K.; SINGH, P.; SHRIVASTAVA, A.K.; SRIVASTAVA, M.K.; KHARE, A.K.; TEWARI, P.; DARASH, R.; ARYA, N.; SHUKLA, S.P.; SAWNANI, A.; SINGH, R.; KISHORE, R. Biochemical alterations in bud and root band zone of sugarcane sets due to chilling temperature. **Indian J. Plant. Physiol.**, v. 12, n. 4, p. 342-350, 2007.

ROCA, W.M.; ARIAS, D.I.; CHAVÉZ, R. Métodos de conservación in vitro del germoplasma. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Eds.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 697-712.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1995. 99 p. (Apostila).

SALIBE, A.A.; ROESSING, C. Conservação de hastes de citros destinadas à enxertia. **Bragantia**, v. 19, p. 53-56, 1960.

SIEGEL, D. P. The energetics of intermediates in membrane fusion: comparison of stalk and d inverted micellar intermediate mechanisms. *Biophys. J.* 1993. 65:2124-2140.

SING, K.K.; BAKHSHI, J.C. A note on the storage of citrus budwood. **Hortic. Abs.**, v. 33, n. 3, p. 601, 1963.

SOLOMON, S.; KUMAR, A. Status of *b*-fructofuranosidase during germination of sugarcane setts. **Indian J. Sugarcane Technol.**, v. 4, p. 11-16, 1987.

SOUZA, C.C. **Influência de poliaminas no desenvolvimento de plantas de inhame (*Dioscorea sp*) cultivadas in vitro**. 2002. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

VESELOVA, S. FARHUTDINO, V. MITRICHENKO, A. SYMONYAN, M. HARTUNG, W. Effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.). Bulg J Plant Physiol Special issue. 2003, p.360–366

WITHERS, L.A.; WILLIAMS, J.T. Germplasm conservation in vitro and cryopreservation. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, Embrapa-CNPQ, 1990. p. 267-286.