

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTAS ANTIOXIDANTES DE CULTIVARES DE CANA-
DE-AÇÚCAR TOLERANTES À SECA E A HERBICIDAS AO
DÉFICIT HÍDRICO**

Ricardo Jardim de Paula
Engenheiro Agrônomo

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTAS ANTIOXIDANTES DE CULTIVARES DE CANA-
DE-AÇÚCAR TOLERANTES À SECA E A HERBICIDAS AO
DÉFICIT HÍDRICO**

Ricardo Jardim de Paula

Orientadora: Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão

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

2019

P324r	Paula, Ricardo Jardim de Respostas antioxidantes de cultivares de cana-de-açúcar tolerantes à seca e a herbicidas ao déficit hídrico / Ricardo Jardim de Paula. -- Jaboticabal, 2019 79 p. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Priscila Lupino Gratão 1. Cana-de-açúcar. 2. Herbicidas. 3. Antioxidantes. 4. Estresse abiótico. 5. Cultivares. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: RESPOSTAS ANTIOXIDANTES DE CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR
TOLERANTES À SECA E A HERBICIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO

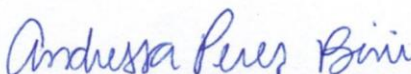
AUTOR: RICARDO JARDIM DE PAULA

ORIENTADORA: PRISCILA LUPINO GRATÃO

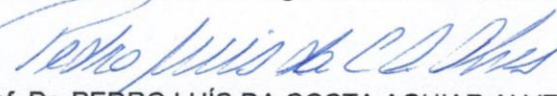
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. ANDRESSA PERES BINI
Centro de Cana-Instituto Agrônômico-IAC / Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES
Diretoria / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pós-doutoranda MARILUCE PASCOINA NEPOMUCENO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisador Dr. TIAGO PEREIRA SALGADO
Herbae Consultoria e Projetos Agrícolas Ltda. / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 21 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RICARDO JARDIM DE PAULA – nascido em 28 de abril de 1987 na cidade de Barretos, Estado de São Paulo. Entre fevereiro de 2006 e dezembro de 2010 cursou Agronomia na Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP – Campus de Bandeirantes). De julho de 2008 a junho de 2009 residiu na Austrália para aperfeiçoamento da língua inglesa. Entre março de 2011 e março de 2012 atuou como Engenheiro Agrônomo na empresa CANAOESTE, filial em Barretos/SP, fornecendo assistência técnica para fornecedores de cana-de-açúcar dos municípios de Barretos, Colina, Colômbia, Jaborandi, Olímpia e Guaíra. Entre os anos de 2011 e 2013 cursou MBA em Gestão do Agronegócio na Fundação Getúlio Vargas. Desde junho de 2012 até o momento atua na área de pesquisa e desenvolvimento de produtos fitossanitários na Herbae Consultoria e Projetos Agrícolas Ltda. Em 2015 obteve o título de Mestre em Agronomia na área de Produção Vegetal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP). No mesmo ano, ingressou no curso de Doutorado em Produção Vegetal pela mesma instituição de ensino.

EPÍGRAFE

“O que sabemos é uma gota; o
que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Amauri e Martinha Júlia, ao meu irmão Amauri, e a minha esposa Camila que sempre estiveram ao meu lado nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me presentear com a vida repleta de saúde corpórea, pela família que me concedeu fazer parte e por estar presente em todos os momentos.

Aos meus pais Amauri Stockmann de Paula e Martinha Júlia Fernandes Jardim de Paula pela educação recebida, pelos princípios ensinados e por não medirem esforços para nos dar sempre o melhor.

Ao meu irmão Amauri Jardim de Paula, por ser fonte de inspiração como ser humano de bem e profissional.

À minha esposa Camila Pereira Pimenta pelo amor, companheirismo, pelos conselhos e pelo incentivo em me tornar uma pessoa melhor, sempre.

Aos meus familiares por sempre se fazerem presentes em todos os momentos da vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão, pela oportunidade concedida, pela orientação dada, pelas conversas sábias, pelos ensinamentos, paciência e pela confiança.

À amiga Letícia Rodrigues Alves, por me ajudar de forma efetiva na execução deste trabalho com todo seu comprometimento, disponibilidade, conhecimento, compreensão e paciência.

À Sônia Carregari, por toda ajuda prestada e conhecimento compartilhado dentro do laboratório.

À UNESP/FCAV, campus de Jaboticabal/SP, por ter me proporcionado a oportunidade de aprimoramento pessoal/profissional.

Ao amigo Leandro Boncompagni (Syngenta) pelo fornecimento das mudas de cana-de-açúcar.

Aos colegas Ricardo Borjas, Mariana Rodrigues, Clara Degli Esposti, Jeferson Silva e Devair Gonçalves, por contribuírem de alguma forma na condução do estudo.

Aos amigos Tiago Salgado e Marcos Kuva, pela amizade, aprendizado contínuo e inspiração na busca pelo conhecimento.

Aos membros da banca de qualificação Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves e Prof. Dr. Leonardo Bianco de Carvalho pelas relevantes correções/sugestões do trabalho.

Aos membros da banca de defesa Dra. Andressa Bini, Dra. Mariluce Nepomuceno de Melo, Prof. Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves e Dr. Tiago Pereira Salgado pela participação e correções da tese.

Ao Daniel de Bortoli Teixeira pela ajuda e sugestões nas análises estatísticas.

Ao amigo Bruno Henrique Polis (Centro de Tecnologia Canavieira – CTC) pela contribuição através de informações que enriqueceram o trabalho.

Aos amigos de longa data Gustavo, Leonardo, Pedro Henrique, Rafael, Vinicius e Vitor, que compartilham tanto dos momentos de aflições como dos momentos de conquistas.

Aos amigos e companheiros de profissão da Universidade Estadual do Norte do Paraná.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente com este estudo.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cana-de-açúcar	3
2.2. Déficit hídrico	4
2.3. Controle químico	6
2.4. Estresse oxidativo	10
2.5. Sistema de defesa	12
2.6. Mecanismos de tolerância ao déficit hídrico	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Material vegetal e condições do experimento	16
3.2. Peroxidação lipídica	18
3.3. Concentração de H ₂ O ₂	19
3.4. Concentração de prolina	19
3.5. Extração proteica e quantificação de proteínas	20
3.6. Atividade da CAT	20
3.7. Atividade da APX	21
3.8. Atividade da glutathione redutase	21
3.9. Análise da SOD em gel	21
3.10. Caracterização das isoformas da SOD	22
3.11. Análise de crescimento	23
3.12. Delineamento experimental e análise estatística	23
4. RESULTADOS	24

4.1. Respostas bioquímicas para as plantas de cana-de-açúcar após 7 dias de exposição ao déficit hídrico e aos herbicidas.	24
4.2. Respostas bioquímicas para as plantas de cana-de-açúcar após 28 dias de exposição ao déficit hídrico e aos herbicidas.	31
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	46
7. REFERÊNCIAS	47

RESPOSTAS ANTIOXIDANTES DE CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR TOLERANTES À SECA E A HERBICIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO— A seca é um problema substancial que afeta negativamente parte das áreas de cultivo de cana-de-açúcar, o que limita a produção das lavouras. O déficit hídrico provoca uma redução no crescimento e desenvolvimento das plantas devido à superprodução descontrolada de espécies reativas de oxigênio (ERO). Por outro lado, a aplicação de herbicidas para controle de plantas daninhas é uma estratégia muito usual de manejo nas culturas para manter altos índices de produtividade, mesmo quando as culturas são afetadas por condições adversas, como a seca. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar as diferentes respostas bioquímicas e no crescimento de duas cultivares de cana-de-açúcar, um tolerante à seca (CTC 9002) e outra tolerante a herbicidas (CTC 2), que caracterizem maior tolerância a condição de déficit hídrico associada à aplicação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial triplo 2 x 2 x 3, sendo o fator cultivares CTC2 e CTC9002, fator condição hídrica de 70% ou 35% da capacidade de campo e fator herbicida, ametrina (1750 g i.a. ha⁻¹), sulfentrazone (700 g i.a. ha⁻¹) ou sem aplicação. A peroxidação lipídica, as concentrações de H₂O₂ e prolina; as atividades antioxidantes das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutational redutase (GR, EC 1.6.4.2); e o acúmulo de massa seca da parte aérea e da raiz foram analisados. A aplicação do herbicida ametrina foi prejudicial às plantas de cana-de-açúcar em decorrência da maior peroxidação lipídica e redução na massa seca das raízes. O aumento da atividade da GR em resposta à aplicação do herbicida sulfentrazone indica que esta enzima pode estar relacionada a um dos mecanismos de tolerância deste grupo de herbicidas. A cultivar CTC2 apresentou aumento da atividade das enzimas APX e SOD quando submetida à aplicação dos herbicidas em relação ao cultivar CTC9002. A CTC2 é tolerante aos herbicidas ametrina e sulfentrazone em relação a CTC9002, principalmente após 7 dias da aplicação. Após 28 dias de déficit hídrico, houve aumento na atividade da enzima APX, o que indica que essa enzima está relacionada ao mecanismo de defesa a essa condição de estresse, contudo, nenhuma das cultivares apresentou diferenças na produção de ERO e no crescimento. A combinação de estresses abióticos envolve uma rede complexa de respostas bioquímicas. Os parâmetros avaliados em ambas cultivares submetidas a aplicação de herbicida sob déficit hídrico não indicam características bioquímicas que pudessem caracterizá-las como tolerantes aos estresses combinados.

Palavras chave: *Saccharum* spp.; estresse oxidativo; enzimas antioxidante; ametrina; sulfentrazone

ANTIOXIDANT RESPONSES OF DROUGHT OR HERBICIDE-TOLERANT SUGARCANE CULTIVARS TO DROUGHT STRESS

ABSTRACT – Drought is currently a substantial problem worldwide, affecting part of sugarcane grown areas, and it is the main yield-limiting factor of crops. Drought stress provokes a reduction in growth and development due to uncontrolled overproduction of reactive oxygen species (ROS). By the other way, herbicide application to control weeds is a common crop management strategy to maintain high sugarcane yields, even when crops are affected by adverse conditions, such as drought. Thus, the aim of this study was to investigate differences in biochemical and growth responses of two sugarcane genotypes, drought-and herbicide-tolerant, which characterize a greater tolerance to drought stress condition combined to herbicides application with different modes of action. The treatments were arranged in a 2 x 2 x 3 triple factorial scheme, with the cultivar factor CTC2 and CTC9002, a water condition factor of 70% or 35% of field capacity and herbicide factor, ametryn (1750 g a.i ha⁻¹), sulfentrazone (700 g a.i ha⁻¹) or without application. Lipid peroxidation, H₂O₂ and proline content; the activities of superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2); and shoot and root dry mass accumulation were analyzed. The ametryn herbicide application was harmful to sugarcane plants due to the higher lipid peroxidation and root dry mass reduction. Increased GR activity in response to sulfentrazone application may indicate that GR enzyme is related to tolerance mechanisms of this herbicide group. The cultivar CTC2 showed an increase in the activity of the APX and SOD enzymes when submitted to herbicide application when compared to CTC9002. Based on these responses, cultivar CTC2 is tolerant to the herbicides ametryn and sulfentrazone in relation of CTC9002, mainly after 7 days of application. Plants which exhibited an increase in APX activity after 28 days of drought stress could indicate that APX enzyme is related to mechanism of tolerance to this stress condition. However, none of the cultivars presented differences in ROS production and growth parameters. The combination of abiotic stresses involves a complex network of biochemical responses. The parameters evaluated in both cultivars submitted to herbicide application under drought stress conditions do not indicate biochemical characteristics that could characterize them as tolerant to the combined stresses.

Key words: *Saccharum* spp.; oxidative stress; antioxidant enzymes; ametryn; sulfentrazone

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial na produção de açúcar e etanol derivados da cana-de-açúcar e, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), a produção estimada para a safra 2018/2019 no Brasil será de aproximadamente 615,84 milhões de toneladas distribuídos em 8,63 milhões de hectares. Um desafio global para aumentar a produção de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar é a limitação da expansão das lavouras em regiões marginais, como o oeste do Estado de São Paulo, sudoeste de Minas Gerais, além dos Estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, conhecidos por apresentarem déficit hídrico por longos períodos no ano.

Entre os estresses abióticos, o déficit hídrico é o principal fator limitante de produtividade em diversas culturas, assim como na cana-de-açúcar. Como organismos sésseis, as plantas precisam lidar com o déficit hídrico pelo menos em algum momento do seu ciclo. Dentre os efeitos da restrição de água para a cana-de-açúcar, destaca-se o fechamento estomático, inibição do crescimento das folhas e colmos, senescência e menor área foliar (MACHADO et al., 2009; INMAN-BAMBER et al., 2012).

Com o ajuste da condutância estomática, as plantas são capazes de controlar a perda de água reduzindo o fluxo de transpiração o que, entretanto, limita a entrada de CO₂ com consequente efeito direto na redução de fotossíntese líquida e na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas plantas sob déficit hídrico (MITTLER, 2002). A limitação da fotossíntese leva ao excesso de energia livre, que se não dissipada com segurança, pode causar superexcitação dos centros de reações dos fotossistemas II (FSII) e I (FSI), e aumentar a produção de ERO (CRUZ de CARVALHO, 2008).

A produção excessiva de ERO provoca um desequilíbrio redox, interrompendo a cadeia de transporte de elétrons e desencadeando um estresse oxidativo devido à ação tóxica das ERO (GRATÃO et al., 2005). Devido aos possíveis danos causados pelas ERO, ocorre a indução ou o estímulo de sistemas capazes de prevenir a oxidação descontrolada, aos quais incluem os sistemas antioxidantes não enzimáticos como os compostos prolina, ascorbato, glutatona,

alcalóides, fenóis, tocoferóis e carotenoides, ou o sistema antioxidante enzimático, como a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) e glutatona redutase (GR, EC 1.6.4.2).

A aplicação de herbicidas para controle de plantas daninhas é uma estratégia de manejo muito consolidada para manter altos patamares de produtividade da cana-de-açúcar, mesmo nas épocas secas do ano. As aplicações de herbicidas podem causar efeitos fitotóxicos nas culturas, principalmente se não forem usados de acordo com as doses recomendadas. Mesmo que o herbicida seja seletivo para a cultura e não cause danos substanciais às plantas, alterações bioquímicas e fisiológicas podem ocorrer, como o aumento na produção de ERO.

Pesquisas sobre estresse oxidativo e respostas antioxidantes causadas por déficit hídrico e aplicação de herbicida em plantas de cana-de-açúcar são escassas e, portanto, necessárias. Essa condição é comumente encontrada em áreas comerciais com menor disponibilidade hídrica, e as aplicações de herbicidas são uma atividade essencial. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar as diferentes respostas bioquímicas e de crescimento de duas cultivares de cana-de-açúcar, um tolerante à seca e outro tolerante a herbicidas, que caracterizem maior tolerância a condição de déficit hídrico associada à aplicação de herbicidas com diferentes mecanismos de ação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-açúcar

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) destaca-se entre as mais importantes do Brasil. Estima-se que a área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2018/19 está em 8,63 milhões de hectares, distribuídas principalmente nos estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Alagoas e Pernambuco (CONAB, 2018). O Estado de São Paulo é responsável por 5,164 milhões de hectares do total nacional. Se confirmada, será a segunda queda consecutiva na área a ser colhida. Nas Regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, deverá ocorrer redução de 1% e nas Regiões Norte e Nordeste, a previsão é de uma área colhida 1,6% menor que na safra passada. A produtividade média estimada para a safra 2018/19 é de 71,3 t/ha, valor 1,7% menor do que os 72,5 t/ha obtidos na safra 2017/18. O envelhecimento das lavouras, a baixa taxa de renovação, a falta de investimento em algumas regiões, prejuízos ocasionados por fatores bióticos e abióticos e a redução do pacote tecnológico têm mantido as médias brasileiras inferiores a 80 t/ha. Além disso, nessa safra, houve uma longa estiagem no meio do ano, bem como altas temperaturas, sobretudo nos estados do Centro-Sul, acelerando a maturação e acarretando em baixo crescimento e falta de peso dos colmos (CONAB, 2018).

De acordo com UNICA (2018), o Produto Interno Bruto (PIB) do setor sucroenergético em 2017 foi de cerca de US\$ 43 bilhões, montante equivalente a 2% do PIB nacional. São 367 unidades industriais em atividade no País, com mais de 794 mil empregos formais gerados apenas pelo setor produtivo. Somando os empregos indiretos gerados pelo setor, emprega-se cerca de 2,4 milhões de pessoas na cadeia da cana-de-açúcar. Além disso, cerca de 70 mil é o total de produtores rurais independentes de cana-de-açúcar.

Recentemente, há uma grande demanda por fontes de energia renováveis para substituir os combustíveis fósseis. Neste cenário, a produção de etanol proveniente da cana-de-açúcar tem sido destacado como um substituto potencial (GOLDEMBERG, 2007). Entretanto, para atender a essa crescente demanda de

etanol, houve uma expansão do cultivo da cana-de-açúcar para regiões marginais, onde a disponibilidade de água é limitada ou altamente variável de acordo com a época do ano (LACLAU & LACLAU, 2009; AZEVEDO et al., 2011; CARR & KNOX, 2011). A expansão das áreas plantadas deu-se principalmente no noroeste paulista e em grande parte, em regiões do centro-oeste, com crescimento expressivo no estado de Goiás. Em algumas destas regiões, o período de seca se estende por meses, no qual se faz necessário o uso de variedades que possuem características adaptativas para tolerarem estes períodos de estresse por déficit hídrico.

2.2. Déficit hídrico

Entre as características da cultura, sabe-se que a cana-de-açúcar possui metabolismo C₄, apresenta boa adaptação em regiões tropicais e tem alta eficiência na conversão de energia luminosa em biomassa (ENDRES et al., 2010). Mesmo assim, para demonstrar o seu máximo potencial de produção, a cana exige condições ambientais favoráveis, dentre os quais, a disponibilidade de água entre 1200 a 2500 mm durante a fase de crescimento (DOORENBOS & KASSAM, 1979; SINGH et al., 2007). A garantia desta quantidade de água em condições de campo tem sido um problema, pois a maioria das áreas de produção sofrem com períodos sazonais de déficit hídrico (CHAVES et al., 2002).

As necessidades hídricas na cultura da cana têm sido supridas pelo regime de chuvas das regiões produtoras e complementadas pela aplicação da vinhaça, subproduto da produção do etanol, rica em água e nutrientes orgânicos. Contudo, nos últimos anos, tem-se observado alteração no regime de chuvas durante a fase de produção da cultura. Diferentes trabalhos relacionam esta alteração com o aquecimento global e prevêem aumento na irregularidade de distribuição das chuvas, caso a concentração de CO₂ na atmosfera continue a aumentar (PALL et al., 2007; SOLOMON et al., 2009).

O déficit hídrico é considerado um dos principais estresses abióticos em plantas cultivadas (SILVA et al., 2014) e o fator que mais limita a produtividade nos mais diversos cultivos (AZEVEDO & LEA, 2011; DAVIES et al., 2011; TAVARINI et

al., 2011; AZEVEDO, 2012). De maneira negativa, é o estresse que mais influencia a produtividade da cana-de-açúcar no Brasil (SILVA et al., 2014).

Os efeitos do déficit hídrico sobre as plantas incluem a redução na assimilação de CO₂, taxa de transpiração, de crescimento, na abertura estomática (TAIZ & ZEIGER, 2013), crescimento dos perfilhos e altura final dos colmos (SUGIHARTO, 2004). As necessidades hídricas da cana-de-açúcar variam de acordo com a variedade e o estágio vegetativo da planta (AUDE, 1993). Os estádios fenológicos da cana-de-açúcar são divididos em quatro fases: brotação e estabelecimento, perfilhamento, crescimento dos colmos e maturação. A suscetibilidade da cana-de-açúcar ao déficit hídrico é maior nas fases de perfilhamento e crescimento dos colmos (INMAN-BAMBER & SMITH, 2005; MACHADO et al., 2009), sendo o crescimento dos colmos e das folhas mais afetado que outras partes da planta (RAMESH, 2000; MACHADO et al., 2009). O desenvolvimento das raízes também é influenciado negativamente pelo déficit hídrico, mas relativamente menos afetado do que a parte aérea da cana-de-açúcar (INMAN-BAMBER & SMITH, 2005).

O déficit hídrico desencadeia o fechamento estomático e a planta adota uma estratégia de economia de água. Com o ajuste da condutância estomática, as plantas são capazes de controlar a perda de água reduzindo o fluxo de transpiração, mas ao mesmo tempo ocorre a limitação da entrada de CO₂. Isso terá efeitos diretos e indiretos na redução de fotossíntese líquida e na produção de ERO nas plantas sob déficit hídrico (MITTLER, 2002). A limitação da fixação de CO₂ reduzir a regeneração de NADP⁺ através do ciclo de Calvin, o que provoca uma redução na cadeia de transporte de elétron fotossintético. Durante a fotossíntese e sob condições de déficit hídrico há um maior extravasamento de elétrons para O₂ pela reação de Mehler (SMIRNOFF, 1993).

A consequência do déficit hídrico é a limitação da fotossíntese que leva à exposição das plantas ao excesso da energia livre, que caso não seja dissipada pode causar hiperexcitabilidade dos centros de reação do fotossistema II (FSII) e I (FSI), elevando a produção de ERO nos cloroplastos e causando efeito fitotóxico nas plantas (CRUZ de CARVALHO, 2008).

2.3. Controle químico

A aplicação dos herbicidas para controlar plantas daninhas é uma necessidade indispensável em áreas de cana-de-açúcar, e é de extrema importância durante o estabelecimento da cana-planta e das soqueiras subsequentes (CAMPBELL, 2008). Dentre os fatores bióticos, a incidência de plantas daninhas contribui para o declínio acentuado da produção e quando não controladas de modo adequado, podem limitar o desenvolvimento da cultura, dificultar a colheita e reduzir a longevidade do canavial (PROCÓPIO et al., 2004). Os herbicidas têm sido amplamente utilizados para prevenir a interferência das plantas daninhas na cana-de-açúcar, o que é justificado pela maior eficácia, viabilidade econômica e rendimento do método químico quando comparado aos métodos mecânicos ou físicos (MONQUERO et al., 2008).

O sistema de plantio através de mudas pré-brotadas (MPB) vem ganhando espaço por aumentar a eficiência econômica e minimizar os problemas fitossanitários na implantação de viveiros, replantio, renovação e expansão de áreas comerciais de cana-de-açúcar (LANDELL et al., 2012; XAVIER et al., 2014). As mudas pré-brotadas também estão sendo amplamente utilizadas em áreas de MEIOSI - Método Interrotacional Ocorrendo Simultaneamente (AZANIA et al., 2014), que consiste em intercalar lavouras de interesse econômico e agrônomo com o canavial para reduzir custos de implantação e melhorar o sistema de logística na distribuição dos colmos para o plantio (SNA, 2016). Nesse caso, com objetivo de atingir alto rendimento, é necessário um planejamento adequado do tempo entre o plantio das mudas pré-brotadas e a utilização destas para o plantio do novo canavial. Na maioria dos plantios de MEIOSI, o estabelecimento das mudas pré-brotadas ocorre na época seca do ano (entre julho a setembro) e, mesmo nessas condições, não é descartado a necessidade de aplicação de herbicidas.

O emprego dos herbicidas de forma incorreta tem impactos negativos consideráveis sobre o meio ambiente e a saúde humana (BENNETT et al., 2004). Além disso, os herbicidas devem ser criteriosamente selecionados e aplicados de acordo com suas funções de interromper processos essenciais nas plantas (por exemplo, a fotossíntese e biossíntese de aminoácidos) que pode ser compartilhado

tanto pela cultura em questão quanto pelas plantas daninhas (SANDHU et al., 2002; MULWA & MWANZA., 2006). Mesmo que um determinado ingrediente ativo seja seletivo para determinada cultura e não cause danos substanciais às plantas, alterações bioquímicas e fisiológicas podem ocorrer, como um aumento na produção de H_2O_2 e O^{2-} (SONG et al., 2007).

A ametrina, pertencente ao grupo de inibidores do Fotossistema II (FSII), é um herbicida eficaz para controle de plantas daninhas de folhas largas e estreitas com amplo uso ao longo de décadas em muitas culturas, como milho, abacaxi e cana-de-açúcar (NAVARATNA et al., 2012). O grupo de inibidores do FSII são considerados inibidores do transporte de elétrons (BALKE, 1985), uma vez que resultam na remoção ou inativação de um ou mais carregadores intermediários do transporte de elétrons. A inibição da fotossíntese ocorre pela ligação do herbicida deste grupo ao sítio de ligação da Q_B , na proteína D1 do fotossistema II, o qual se localiza nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, ocasionando o bloqueio do transporte de elétrons de Q_A para Q_B (Figura 1). A interrupção do fluxo de elétrons no FSII gera um estado energético muito elevado da clorofila (estado triplet), que sobrecarrega o efeito de atenuação de energia promovido pelos pigmentos carotenoides (OLIVEIRA JR et al., 2011). O excesso de clorofila triplet pode iniciar o processo de peroxidação lipídica por meio de dois mecanismos (DAN HESS, 1994): o primeiro é a formação direta de radicais lipídicos nos ácidos graxos insaturados constituintes das membranas; o segundo é que a clorofila triplet pode reagir com o oxigênio para produzir oxigênio singlet. O oxigênio pode reagir com estes radicais para iniciar o processo de peroxidação lipídica, resultando em danos às membranas. A peroxidação de lipídios é autocatalítica e se espalha para outros lipídeos constituintes de membranas, como as do cloroplasto e de outras estruturas celulares. Estas reações promovem a destruição das membranas e a perda de clorofila, resultando em aumento de tamanho e da desorganização dos tilacóides e de outras membranas celulares (BARTELS, 1985).

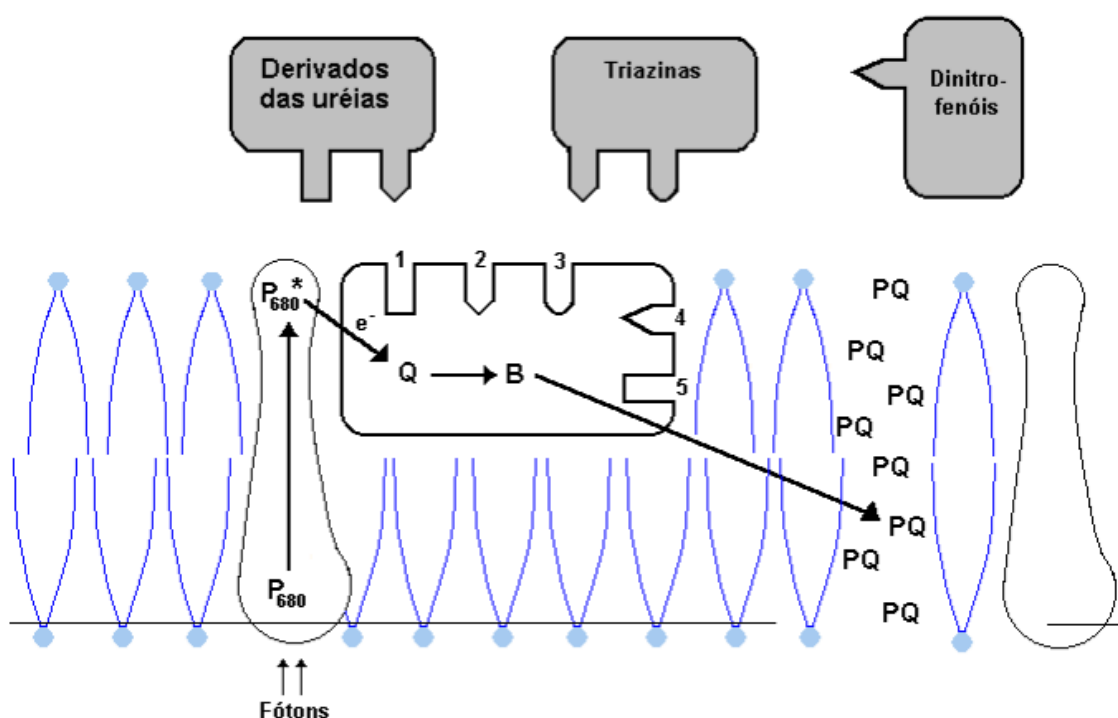


Figura 1. Visualização dos sítios de ligação dos herbicidas inibidores do fotossistema II ao complexo protéico QB na membrana dos cloroplastos. Herbicidas do grupo das triazinas (ametrina) ligam-se aos sítios 2 e 3 (GRESSEL, 1985).

Entre as outras diversas opções de herbicidas registrados para uso na cultura da cana-de-açúcar, o sulfentrazone, pertencente ao grupo de inibidores da PROTOX, é uma das opções mais utilizadas no setor produtivo (CARVALHO et al., 2012). O mecanismo de ação deste grupo parece estar relacionado com a inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (PPO ou PROTOX), que atua na oxidação de protoporfirinogênio à protoporfirina (precursores da clorofila) (OLIVEIRA JR et al., 2011). A inibição da PROTOX induz um acúmulo descontrolado de protoporfirinogênio IX, que extravasa da membrana externa do cloroplasto para o citoplasma, onde é convertido em um composto altamente fotodinâmico denominado Proto. Na presença de luz, o Proto gera o oxigênio singlete altamente reativo que induz a peroxidação lipídica (DEVINE et al., 1993; LEE et al., 1993) (Figura 2). As consequências catastróficas do acúmulo desregulado de protoporfirina no citosol e subsequente formação de espécies reativas de oxigênio também tem efeito secundário em outros processos fisiológicos da planta, como a estabilidade dos centros de reações do PSI e PSII (TRIPATHY et al., 2007).

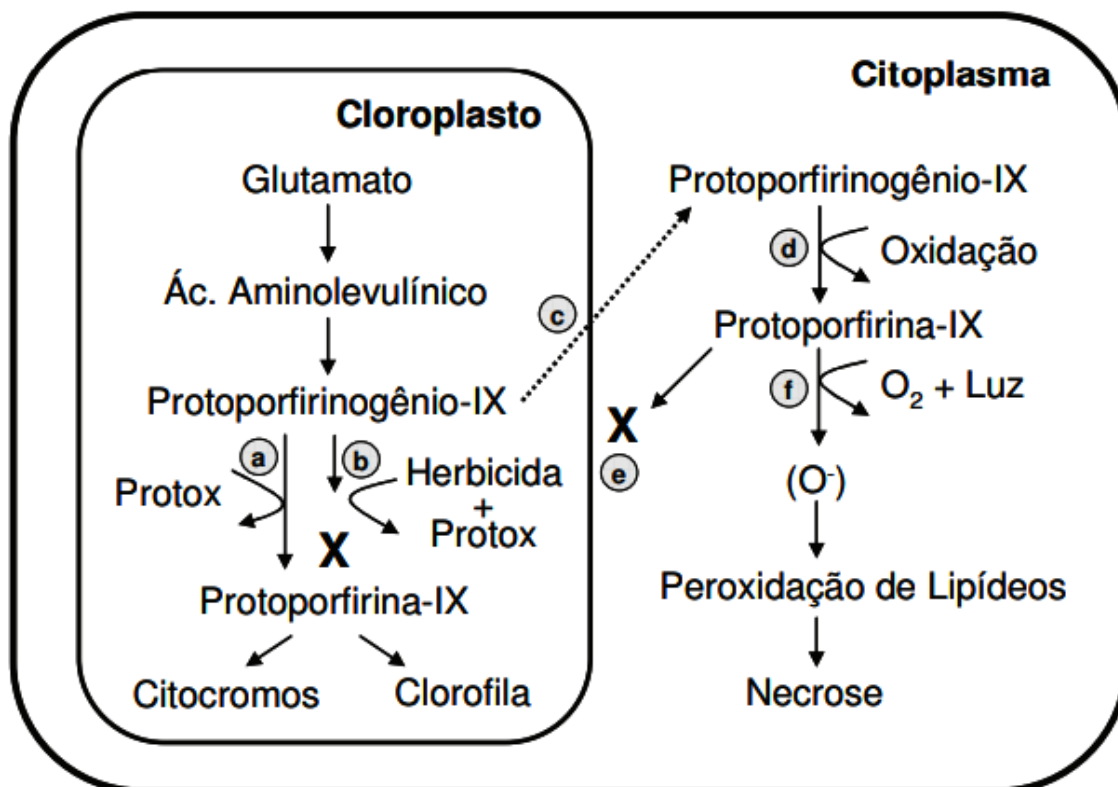


Figura 2. Esquema simplificado do mecanismo de ação dos herbicidas inibidores da PROTOX. (a) Reação de conversão do protoporfirinogênio-IX em protoporfirina-IX; (b) Presença do herbicida e inibição competitiva da PROTOX; (c) Difusão do protoporfirinogênio-IX acumulado para fora do citoplasma; (d) Oxidação do protoporfirinogênio-IX a protoporfirina-IX; (e) Protoporfirina-IX não pode retornar ao cloroplasto; (f) Formação de oxigênio 'singlet', peroxidação lipídica e necrose da célula (CARVALHO & LÓPEZ-OVEJERO, 2008).

Acredita-se que alguns herbicidas possam influenciar a eficiência do uso da água pelo efeito negativo direto sobre a fotossíntese, ou indiretamente, pela redução da taxa metabólica da planta. Além disso, acredita-se que as diferenças marcantes entre genótipos de uma mesma espécie podem ser avaliadas quanto a diferenças na condutância estomática, taxa transpiratória, temperatura da folha e acúmulo de massa seca quando são tratados com herbicidas. Dessa forma, a associação genótipo/herbicida pode determinar aqueles que possam sobressair sob déficit hídrico quando submetidos à aplicação de herbicidas e, assim, garantir melhores produções na lavoura (GALON et al., 2010).

2.4. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um fator central nos fenômenos de estresse abióticos e bióticos que ocorrem quando existe um desequilíbrio em qualquer compartimento da célula entre a produção de ERO e atuação dos sistemas de defesa antioxidante (Figura 3) (FOYER & SHIGEOKA, 2010).

O oxigênio molecular (O_2) possui baixa reatividade devido à configuração paralela de seus elétrons nos dois últimos orbitais incompletos. Esta organização impõe que a redução do O_2 deve ser efetuada por transferências consecutivas de um único elétron, sendo que os produtos resultantes da redução do O_2 formam as ERO. Estas incluem os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e oxigênio singleto (1O_2). Sob condições normais, estes são gerados pelo metabolismo dos organismos aeróbicos, principalmente através da fotossíntese e respiração, porém mantidos em níveis basais através de sistemas antioxidantes de defesa (GRATÃO et al., 2005).

A produção das ERO pode ser intensificada devido a exposição das plantas à estresses abióticos como temperaturas extremas (GAVELIENE et al., 2013), metais pesados (GRATÃO et al., 2012), déficit hídrico (JEYARAMRAJA & THUSHARA, 2013), altas concentrações salinas (ELLOUZI et al., 2011), aplicação de herbicidas (ZABALZA et al., 2007; ZOBIOLE et al., 2010), entre outros.

A planta sob condições estressantes pode elevar a produção de ERO em concentrações superiores à capacidade antioxidante da célula, o que provoca um desequilíbrio redox, interrompendo a cadeia de transporte de elétrons e desencadeando um estresse oxidativo devido à ação tóxica das ERO (GRATÃO et al., 2015).

O estresse oxidativo pode ativar a morte celular programada devido à peroxidação lipídica de membranas, oxidação de proteínas, inibição enzimática e danos ao DNA e RNA. A peroxidação lipídica é um processo fisiológico que ocorre em todas as células aeróbicas sendo iniciada pela extração ou adição de um radical hidrogênio. A peroxidação é um dos principais mecanismos moleculares envolvidos no dano oxidativo a estruturas celulares. Os ácidos graxos insaturados, que são

parte estrutural das membranas celulares são submetidos à peroxidação lipídica por reações em cadeia não enzimáticas e de ERO (REPETTO et al., 2012).

Além disso, as ERO também podem agir como sinalizadores em vários processos de crescimento e desenvolvimento (PITZSCHKE et al., 2006), atuando como mensageiros secundários envolvidos na ativação de genes de resposta aos estresses e possíveis rotas de defesa (DESIKAN et al., 2001; KNIGHT & KNIGHT, 2001).

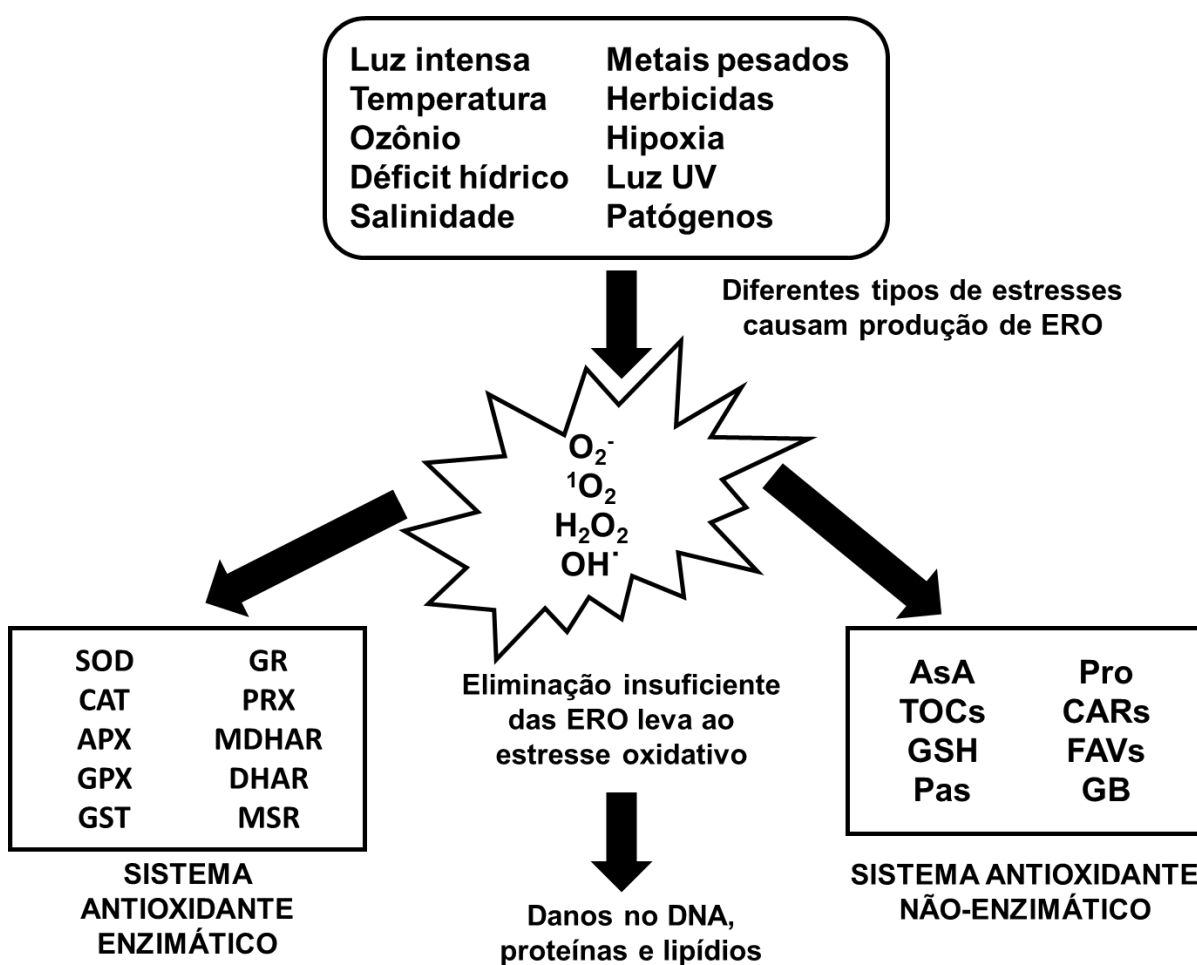


Figura 3. Representação diagramática de vários agentes geradores de ERO em plantas e os respectivos sistemas de defesa antioxidante (adaptado de TEOTIA & SINGH, 2014).

2.5. Sistema de defesa

Vários mecanismos são utilizados para eliminar e/ou desintoxicar as ERO nas plantas, como os sistemas antioxidantes de defesa enzimáticos e não enzimáticos. (MARQUEZ-GARCIA et al., 2011;.AZEVEDO et al., 2012;. GALLEGO et al., 2012). O sistema de defesa antioxidante não-enzimático compreende os compostos como a glutathiona (GSH), o ascorbato (AsA), alcalóides, fenóis, tocoferóis, carotenóides e prolina (GRATÃO et al., 2005).

Em condições de estresse, o metabolismo de aminoácidos é amplamente alterado, sendo a síntese de proteínas diminuída e a proteólise aumentada (SODEK, 2004). O acúmulo do aminoácido prolina sob condições de estresse dá-se através do aumento de sua síntese e redução da oxidação (HARE & CRESS, 1998). Várias funções são propostas para este acúmulo, como ajuste osmótico, reserva de carbono e nitrogênio utilizada para o restabelecimento após estresse, desintoxicação do excesso de amônia, estabilizador de proteínas e membranas e eliminadores de ERO (KAVI-KISHOR et al., 2005). Por possuir um anel pirrolina, que apresenta baixa capacidade em ceder elétrons, acredita-se que a prolina possa sequestrar o O_2 livre (REDDY et al., 2004). Ainda, existem evidências de que a biossíntese desse aminoácido poderia estar associada à regulação do pH citosólico ou à manutenção da razão $NADP^+/NADPH$, controlando o fluxo de carbono devido à via oxidativa da pentose fosfato (HARE & CRESS, 1998), além de atuar como fonte de energia, onde uma única molécula oxidada é capaz de produzir 30 ATP (KAVI-KISHOR et al., 2005). O acúmulo do aminoácido prolina tem sido amplamente utilizado como um indicador fisiológico-bioquímico do estresse hídrico (Shao et al., 2006) e o aumento de sua concentração pode ser correlacionada com uma elevada tolerância à seca (MOLINARI et al., 2007).

Entre as enzimas que compõem o sistema de defesa antioxidante enzimático, inclui a superóxido dismutase (SOD - EC 1.15.1.1). Esta enzima faz parte de um grupo de metaloproteínas que catalisam a formação de H_2O_2 a partir do radical superóxido (O_2^-), sendo a única enzima cuja atividade controla a concentração de O_2^- e H_2O_2 , substratos da reação de Haber-Weiss, desempenhando, papel central no mecanismo de defesa ao prevenir a formação do radical OH^* (BOWLER et al.,

1992). Esta enzima é considerada a primeira linha de defesa contra as ERO nas células (SCANDALIOS, 2005). Três classes de SODs foram encontradas em plantas e classificadas de acordo com seu co-fator metálico: manganês (Mn), cobre/zinco (Cu/Zn) ou ferro (Fe) (ALSCHER et al., 2002). As Mn-SODs estão localizadas nas mitocôndrias e peroxissomos (DEL RIO et al., 2002), mas também foram encontradas nos cloroplastos de algumas plantas (HAYAKAWA et al., 1984). As Fe-SODs são encontradas em um número limitado de espécies vegetais e estão localizadas nos cloroplastos (ALSCHER et al., 2002). As Cu/Zn-SODs são as mais abundantes em folhas verdes e são encontradas no citosol, nos cloroplastos e peroxissomos (DEL RIO et al., 2002).

A catalase (CAT – EC 1.11.1.6) é uma enzima tetramétrica Ferro porfirina que catalisa a conversão de H_2O_2 em água e O_2 liberado durante a transformação do glicolato a glioxalato durante a fotorrespiração (IGAMBERDIEV & Lea, 2002) ou durante a β -oxidação de ácidos graxos (HOLTMAN et al., 1994). A CAT possui baixa afinidade pelo H_2O_2 requerendo a ligação de duas dessas moléculas para que a reação ocorra. Sendo assim, a CAT provavelmente apresenta função na remoção do excesso de ERO durante a condição de estresse (GRATÃO et al., 2005), além de proteger a SOD da inativação por altos níveis de H_2O_2 (FRIDOVICH, 1995). Em baixas concentrações de H_2O_2 ($< 1 \mu\text{M}$) a CAT apresenta função peroxidativa, onde o Fe interage com o H_2O_2 formando peróxido de Fe, este pode ser reduzido por doadores de hidrogênio (H), como o ácido ascórbico. Em elevadas concentrações a CAT possui função catalítica formando H_2O e O_2 (SCANDALIOS, 2005).

A ascorbato peroxidase (APX – EC 1.11.1.11) é uma heme peroxidase encontrada nos cloroplastos, citosol, mitocôndrias e peroxissomos (ASADA, 1999). Assim como a CAT, a APX converte o H_2O_2 em água e O_2 , contudo, apresentam afinidades diferentes por essa ERO. A APX demonstra afinidade pelo H_2O_2 na ordem de micromolar, enquanto a CAT milimolar. Assim, a APX parece ser responsável pela fina regulação da resposta as ERO (MITTLER, 2002), todavia tem elevada importância na proteção contra o dano oxidativo em compartimentos subcelulares onde a CAT não está presente, como os cloroplastos, onde são encontradas duas isoformas, sendo uma ligada ao tilacóide e a outra dispersa no estroma (ASADA, 1999). A APX reduz o H_2O_2 à água utilizando o ascorbato como

doador de elétrons. Neste processo, um intermediário de dois elétrons oxidados da APX é formado, este oxida o ascorbato produzindo duas moléculas de monodehidroascorbato sendo, então, reduzido novamente (ASADA, 1999).

A glutathione redutase (GR – EC 1.6.4.2) é uma flavoproteína que catalisa a redução da GSSG em GSH, em um processo dependente de NADPH. Apesar de ser sintetizada no citoplasma, esta enzima pode ser direcionada para cloroplastos e mitocôndrias (CREISSEN, 1997), na qual pode atuar no combate das ERO, mais especificamente o $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Em plantas superiores, enquanto a GR está envolvida na defesa contra o estresse oxidativo, a GSH desempenha vários papéis como a participação no ciclo ascorbato glutathione, manutenção dos grupos sulfidrilas de cisteínas na forma reduzida, estocagem de enxofre reduzido e substrato para a glutathione-S-transferase (GST) (GRATÃO et al., 2005), outra enzima antioxidante que catalisa a ligação da glutathione a uma ampla gama de substratos hidrofóbicos, eletrofílicos e citotóxicos (MARRS, 1996).

2.6. Mecanismos de tolerância ao déficit hídrico

A tolerância à seca é um mecanismo que permite que as plantas mantenham seu metabolismo seguido de uma redução do potencial hídrico nos tecidos (MITRA, 2001). Neste processo, ocorre uma série de interações fisiológicas, bioquímicas e de regulação de genes (BERNSTEIN et al., 2010;. MONDINI et al., 2010;. SARLIKIOTI et al., 2010;. SONG et al., 2010, ROGIERS et al., 2011; DEL POZO et al., 2012), bem como interações entre as plantas e microrganismos (Khan et al., 2011). Ao longo do tempo, as plantas desenvolveram diferentes estratégias de tolerância ao déficit hídrico, como alterações no ciclo de vida, modulação no crescimento/desenvolvimento para combinar com o suprimento de água, regulação de funções de toda a planta para a realocação de recursos para o crescimento e adaptação ao déficit hídrico, e evolução na percepção de sinalização do estresse para expressão de tolerância ao déficit hídrico no curto e longo prazo (HU & XIONG, 2014; YOU & CHAN, 2015).

Dentre as mudanças que ocorrem nas plantas, o acúmulo de solutos compatíveis e maior capacidade antioxidante foram relatados como mecanismos

que permitem que as plantas tolerem a redução do potencial hídrico do solo (SAIRAM et al., 2002; MOUSSA & ABDEL-AZIZ, 2008).

Alguns trabalhos relacionados com o estresse oxidativo desencadeado pelo déficit hídrico em cana-de-açúcar já são encontrados na literatura (MOLINARI et al., 2007;. AZEVEDO et al., 2011;. KIDO et al., 2012;. LEMBKE et al., 2012). Além disso, tem-se dado uma atenção à seleção de variedades de cana tolerantes a estresses bióticos e abióticos, com base no desempenho da planta na atividade antioxidante contra o estresse oxidativo, como encontrado em estudos sobre déficit hídrico (CIA et al., 2012).

Por outro lado, trabalhos relacionados ao estresse oxidativo e mecanismos antioxidantes relacionados por aplicação de herbicidas em cana-de-açúcar são escassos. Estudos com respostas fisiológicas e bioquímicas na cana-de-açúcar ao estresse oxidativo induzido por deficiência hídrica e ao herbicida paraquat foram realizados por dos Santos & de Almeida Silva (2015). No entanto, o herbicida paraquat é um herbicida dessecante de ação de contato sem apresentar seletividade à cultura, sendo pouco utilizado comercialmente na cultura em questão, o qual é empregado nos estudos de estresse oxidativo como uma ferramenta de indução ao estresse.

Portanto, faz-se necessária a investigação do estresse oxidativo e das respostas antioxidantes sobre os estresses em conjunto ocasionados pelo déficit hídrico e pela aplicação de herbicidas sobre as plantas de cana-de-açúcar, uma vez que esse tipo de situação é comumente encontrada em áreas com menor disponibilidade de água no solo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições do experimento

O experimento foi instalado e conduzido sob condições de casa de vegetação entre os meses de junho a setembro de 2018 na Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal, Estado de São Paulo. A casa de vegetação foi georreferenciada com coordenadas geográficas 21°14'46,68"S, 48°18'6,39"O e 600 m de altitude. Os vasos plásticos com dimensões de 27,5 cm de diâmetro e 24,0 cm de profundidade (11 L de capacidade volumétrica) foram preenchidos com um substrato proveniente de mistura de um latossolo e areia (2:1). Uma análise composta com as características químicas e físicas deste substrato apresentaram o seguinte resultado: pH (CaCl₂) = 5,0; P (mg dm⁻³) = 32; K (mmol_c dm⁻³) = 0,8; Ca (mmol_c dm⁻³) = 19; H + Al (mmol_c dm⁻³) = 22; M.O (g dm⁻³) = 22; SB (mmol_c dm⁻³) = 25,8; CTC (mmol_c dm⁻³) = 47,5; V (%) = 54; argila = 19,4%; silte = 5,2% e areia total = 75,4%.

As mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar foram transplantadas para os vasos plásticos em 20/06/2017. Antes do transplante, 5,0 g vaso⁻¹ do adubo formulado 08-28-16 (NPK) foram adicionadas nas covas para suplementação nutricional. As plantas foram expostas ao fotoperíodo natural e a umidade relativa média da casa de vegetação foi de 51,5%. A temperatura máxima, média e a mínima obtidas ao longo do estudo foram de 35,9°C, 24,9°C e 13,9°C, respectivamente. A Figura 4 apresenta as leituras diárias de temperatura máxima, mínima, umidade relativa do ar máxima e mínima.

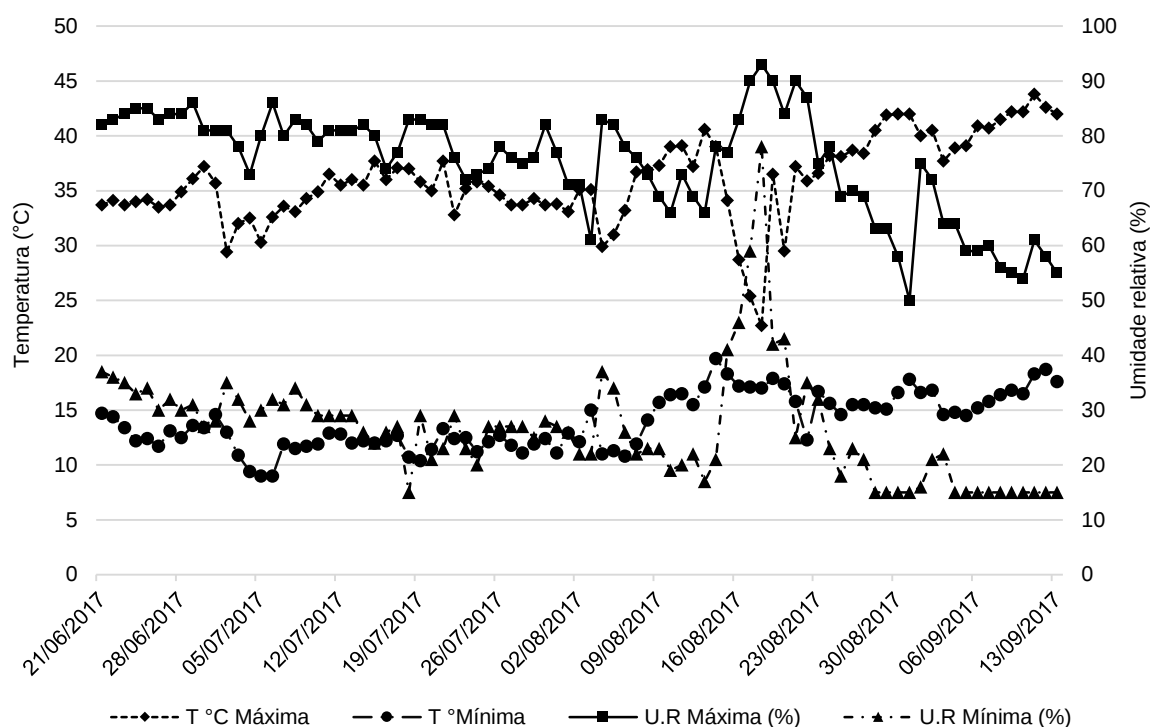


Figura 4. Leituras diárias de temperatura máxima, mínima, umidade relativa do ar máxima e mínima ao longo do estudo dentro da casa de vegetação.

As cultivares do Centro de Tecnologia Canavieira CTC2, que de acordo com Ferreira et al. (2010) apresenta tolerância diferencial a herbicidas, incluindo ametrina e sulfentrazone, e CTC9002, descrita pela empresa de melhoramento como tolerante à seca, foram submetidas ao déficit hídrico e à aplicação de cada um dos dois herbicidas, ametrina (inibidor do FSII) ou sulfentrazone (inibidor da PPO). Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial triplo $2 \times 2 \times 3$, sendo o fator (Cv) as cultivares CTC2 e CTC9002, fator condição hídrica (CH) de 70% ou 35% da capacidade de campo, e o fator herbicida (Hb), o qual foram utilizados a ametrina ($1750 \text{ g i.a. ha}^{-1}$), sulfentrazone ($700 \text{ g i.a. ha}^{-1}$) e um tratamento sem aplicação de herbicidas, completando o esquema fatorial $2 \times 2 \times 3$ (Cv x CH x Hb).

Os níveis de água no solo foram definidos como controle (70% da capacidade de campo do vaso – cc) e condição de déficit hídrico (35% cc). Para esta definição, foi utilizado o método direto em vasos, no qual foi considerado como capacidade de campo (cc) o conteúdo de água retido pelo solo do vaso, após sofrer saturação e consequentemente ação da gravidade, sendo calculada por diferença de pesagem, com auxílio de uma balança de precisão. Para o cálculo do valor de referência

(100% cc), os vasos foram saturados e cobertos com plástico na parte superior para evitar perda de água por evaporação e, depois de decorrido o tempo de drenagem natural, foi determinada a massa a partir de dois vasos, para cada tratamento estudado. Como valor de referência de 0% cc foi utilizada a massa do solo seco em volume correspondente a capacidade de um vaso. O solo foi seco em estufa de circulação forçada por 72 horas a 80 °C (ECCO et al., 2014).

Os vasos foram pesados a cada dois dias para determinar o volume de água necessário a ser adicionado para manter as plantas com 70% cc até o dia da aplicação dos herbicidas, a qual foi realizada em 16/08/2017 (57 dias após o plantio das mudas). Para a aplicação dos herbicidas utilizou-se um costal pressurizado (CO₂) equipado com barra de aplicação contendo duas pontas de pulverização do tipo AI 11002. O conjunto foi regulado para manter a pressão constante de 3,2 bar a fim de distribuir o volume de calda equivalente a 200 L ha⁻¹ a uma velocidade constante de 1 m s⁻¹. No momento da aplicação dos herbicidas a umidade relativa do ar e a temperatura eram de 64% e 23,3 °C, respectivamente. Após a aplicação, os tratamentos com déficit hídrico foram mantidos com 35% da capacidade de campo.

Com 7 e 28 dias após a aplicação dos herbicidas e início do déficit hídrico, o que correspondia a 64 e 85 dias após o plantio das mudas, respectivamente, as folhas +1 e +2 com a lígula totalmente visível foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, logo condicionadas em ultra freezer (-80°C) para as posteriores análises bioquímicas. A definição do intervalo entre o início do déficit hídrico e as coletas das folhas foi devido a essa condição de limitação de água no solo ser muito comum em áreas com cultivo da cana-de-açúcar, perdurando mais que 90 dias em algumas regiões.

3.2. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela estimativa do conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com descrito por Heath e Packer (1968). Assim, 300 mg de material vegetal foram macerados em 3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), contendo aproximadamente 20% de

polivinilpirrolidona (PVPP). Após a perfeita homogeneização o extrato foi centrifugado a 11200 g, 15 °C por 5 minutos. A um volume de 250 µL do sobrenadante adicionou-se 1 mL de solução contendo TCA 20% (p/v) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v). As amostras foram mantidas por 30 minutos a 95 °C e, em seguida, transferidas para banho de gelo. Após o completo resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 11200 g, 15 °C por 10 minutos, com o intuito de separar qualquer resíduo sólido formado durante o aquecimento e também clarear as amostras. As leituras foram realizadas, em triplicata, em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A determinação do equivalente da concentração de malondialdeído (MDA) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 mM.cm¹ (GRATÃO et al., 2012). Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de massa fresca (MF).

3.3. Concentração de H₂O₂

A concentração dos níveis de H₂O₂ foi estimada seguindo metodologia proposta por Alexieva et al. (2001). Para tanto, 300 mg de material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e homogeneizados em ácido tiobarbitúrico (0,1%) e, centrifugados a 11200 g, a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi adicionado a 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,50) e 1 M de solução de iodeto de potássio. As amostras foram incubadas em gelo durante uma hora, a absorvância foi lida a 390 nm em triplicatas e o teor de H₂O₂ foi determinado utilizando uma curva de concentração de H₂O₂ conhecida como padrão. Os resultados foram expressos em µmol de H₂O₂/g de massa fresca (MF).

3.4. Concentração de prolina

A determinação da concentração de prolina nas folhas foi realizada de acordo com Bates et al. (1973). Assim, 50 mg de tecido vegetal foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, ao qual adicionou-se 3 mL de ácido sulfosalicílico 3% (p/v). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 6720 g, 15 °C por 30 minutos. Foram coletados 2 mL do sobrenadante, aos quais acrescentaram-se 2 mL de ninidrina ácida (1,25 g de ninidrina; 30 ml de ácido

acético glacial; 20 ml de ácido fosfórico 6M) e 2 mL de ácido acético glacial. As amostras foram incubadas a 100 °C por 1 hora e, em seguida, transferidas para o banho de gelo. Após o completo resfriamento das amostras, foram realizadas as leituras, em triplicata, em espectrofotômetro a 520 nm. Os resultados foram expressos em μmol de prolina/g de massa fresca (MF).

3.5. Extração proteica e quantificação de proteínas

Para a extração enzimática e quantificação de proteína, aproximadamente 1 g de material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido usando um tampão de extração contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), ácido etilenodiamino tetra-acético 1 mM (EDTA), DL-ditioneitol 3 mM e 5% (p / v) de polivinilpolipirrolidona insolúvel (BOARETTO et al., 2014) numa relação volume / peso fresco 3: 1. O homogeneizado foi centrifugado a 11200 g, 4 °C por 30 min, e o sobrenadante foi estocado em alíquotas separadas e armazenadas a -80 °C para posterior quantificação de proteínas e análise das atividades da CAT (EC 1.11.1.6), GR (EC 1.8.1.7) e APX (EC 1.11.1.11). A concentração de proteína foi determinada seguindo o método de Bradford (1976) utilizando BSA (Bovine Serum Albumin) como padrão. Foi utilizado o espectrofotômetro para as leituras e os resultados das quantificações se deram em mg/mL.

3.6. Atividade da CAT

A atividade da CAT foi determinada em espectrofotômetro a 25°C em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 e 25 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 14 μL de extrato protéico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H_2O_2 por 60 segundos, através das alterações na absorbância a 240 nm, em espectrofotômetro como descritor por Nogueirol et al. (2015). Os resultados de atividade da CAT foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.7. Atividade da APX

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi medida espectrofotometricamente em uma reação consistindo de extrato vegetal, tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0) contendo ascorbato 5 mM, EDTA 1 mM e 1 mM (GRATÃO et al., 2012). A atividade da APX foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a 30 °C, durante 60 segundos. Os resultados da atividade da APX foram expressos em nmol ascorbato $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.8. Atividade da glutathiona redutase

A atividade da glutathiona redutase (GR) foi medida espectrofotometricamente a 30 °C, conforme descrito em Carvalho et al. (2013). O meio de reação consistiu de uma solução composta de 1 mL de tampão de fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de 2-ácido nitrobenzóico (DTNB), 1 mM de glutathiona oxidada (GSSG) e 0,1 mM NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 50 μL de extrato protéico. A atividade da GR foi estimada pela redução de GSSG, acompanhada por monitoramento na alteração da absorbância a 412 nm, por 60 segundos, em espectrofotômetro. Os valores da atividade da GR foram expressos em mmol $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

3.9. Análise da SOD em gel

A atividade da SOD foi determinada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) conforme descrito por Beauchamp e Fridovich (1971) e modificado por Azevedo et al. (1998), utilizando o sistema Mini Protean II (Bio-Rad). O gel apresentou espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura 7,3 cm. Para confecção do gel de resolução foram utilizados 3 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão Tris-HCl 3M, pH 8,9, 19 μL de TEMED, 25 μL de persulfato de amônio 1% e 4,5 mL de água destilada. O gel de empacotamento foi preparado utilizando-se 500 μL de acrilamida, 1,25 mL tampão Tris-HCl 500 mM,

pH 6,7, 10 µL de TEMED, 50 µL de persulfato de amônio 1% e 2,75 mL de água destilada. A eletroforese foi realizada a 4 °C, em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de eletrodo era composto por Tris 25 mM, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina - 5X concentrado, sendo diluído para 1X e reutilizado até 3 vezes. Em cada gel foi aplicado 10 µL do padrão de SOD (Sigma) e 50 µg de proteína dos extratos de cana-de-açúcar.

Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de SOD foi determinada de acordo com Gomes-Junior et al. (2006). Os géis foram lavados em água deionizada e incubados no escuro, a temperatura ambiente, em uma solução contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NBT) e 0,3% de TEMED. Ao final de 30 minutos, os géis foram colocados em água deionizada e expostos a luz até o aparecimento das bandas. Nestas condições ocorre a fotoxidação do gel, promovendo a formação de uma coloração púrpura, enquanto as bandas correspondentes à atividade de SOD não sofrem reação, proporcionando uma revelação negativa. A fotoxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em solução de ácido acético (7%) por 15 minutos.

3.10. Caracterização das isoformas da SOD

As isoformas da SOD foram caracterizadas em PAGE. Os géis foram confeccionados da mesma forma descrita no item anterior. Foram utilizados 50 µg do extrato de proteína e 10 µL do padrão da SOD. Ao final da eletroforese, o gel foi dividido verticalmente em três partes, as quais foram distribuídas em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8; tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 contendo 2mM de KCN e 1,27 mM de EDTA; tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 contendo 5 mM de H₂O₂ e 1,27 mM de EDTA. Todos os passos descritos foram realizados no escuro. Após 20 minutos, os géis foram submetidos a revelação com NBT e riboflavina, como descrito anteriormente. Ao final da revelação, foi analisada a presença ou ausência de bandas no controle, e nos tratamentos com KCN e H₂O₂. As isoformas foram então classificadas como Mn-SOD, Fe-SOD ou Cu/Zn-SOD. Mn-SOD é resistente a ambos os inibidores (KCN e H₂O₂), Fe-SOD é resistente ao KCN

e inibida por H_2O_2 e Cu/Zn-SOD é inibida por ambas as substâncias (AZEVEDO et al., 1998).

3.11. Análise de crescimento

Ao final do experimento (28 dias após a aplicação dos herbicidas), foram determinadas as massas seca da parte aérea e raízes. Para tanto, as plantas foram cortadas rente ao solo para separação das partes. As raízes lavadas e a parte aérea foram condicionadas em sacos de papel devidamente identificadas e postas para secagem e estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 70 °C por 72 horas até atingirem massa constante. Com balança de precisão, obteve-se a massa seca da parte aérea e raízes dos tratamentos.

3.12. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC), utilizando nove plantas/vasos por tratamento, sendo três repetições para cada período de coleta e três repetições para as análises de crescimento. Os resultados para cada tratamento foram expressos como a média de três repetições para crescimento de plantas, peroxidação lipídica, concentração de H_2O_2 e de prolina, extrato proteico para análise da atividade da CAT, APX e GR. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelos testes de múltiplas faixas de Duncan (DMRT) em $P < 0,10$. As pressuposições da análise de variância foram avaliadas por meio do teste de Shapiro-Wilk e Bartlett, ambos a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Respostas bioquímicas para as plantas de cana-de-açúcar após 7 dias de exposição ao déficit hídrico e aos herbicidas.

Com base nos resultados da análise de variância dos diferentes parâmetros avaliados (Tabela 1), houve interação tripla significativa ($p < 0,10$) para o MDA entre os fatores cultivar, condição hídrica e herbicidas. Para o parâmetro peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na primeira coleta realizada não foi observado interações significativas entre os fatores, nem tampouco houve diferença nos fatores isolados. O mesmo comportamento foi evidenciado para conteúdo de prolina, na qual os fatores isolados não diferiram estatisticamente e não houve interações significativas entre os fatores. Com relação à enzima catalase (CAT), não se observa interações significativas entre os fatores, contudo, houve diferença significativa para os fatores isolados cultivar ($p < 0,05$) e condição hídrica ($p < 0,10$). Os resultados da atividade da enzima glutatona redutase (GR) também não apresentou interações significativas entre os fatores, mas diferiu significativamente quando analisado o fator herbicida isoladamente ($p < 0,05$). A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) apresentou diferença significativa quando analisado o fator cultivar isolado ($p < 0,05$), entretanto, não houve diferenças nos demais fatores isolados e nem interações significativas entre os fatores.

Com base na interação tripla dos fatores para o parâmetro MDA (Figura 5 e 6) e isolando a cultivar CTC2, nota-se que a condição de déficit hídrico (35% cc) apresentou maior média de MDA quando o herbicida sulfentrazone foi aplicado. Nos tratamentos com o herbicida ametrina e sem a aplicação de herbicida não houve diferenças significativas entre as condições hídricas. Ainda, nos tratamentos sem déficit hídrico (70% cc) não houve diferença nas médias de MDA em relação aos herbicidas, ao passo que, nos tratamentos com déficit hídrico (35% cc) a aplicação de sulfentrazone apresentou maior MDA em relação à ametrina e ao tratamento sem herbicida. Ao isolar a cultivar CTC9002, o tratamento a 70% cc apresentou conteúdo de MDA superior ao tratamento com déficit hídrico, ambos com aplicação da ametrina. Não houve diferenças significativas entre os herbicidas para as duas

condições hídricas. Ao isolar a condição hídrica de 70% cc, a cultivar CTC9002 apresentou maior conteúdo de MDA nos tratamentos com aplicação dos herbicidas (sulfentrazone e ametrina), ao passo que, não houve diferença entre as cultivares nos tratamentos sem uso de herbicidas. Na condição de déficit hídrico, a cultivar CTC9002 apontou maior conteúdo de MDA em comparação à CTC2 nos tratamentos com uso da ametrina e sem herbicidas.

Tratando-se dos resultados do conteúdo de peróxido de hidrogênio obtidos na primeira coleta (Figura 7), não houve diferenças significativas entre as cultivares, entre as condições hídricas, nem tampouco para o fator herbicidas.

Para o conteúdo de prolina na primeira coleta (Figura 8), novamente é observado que os fatores cultivar (Cv), condição hídrica (CH) e herbicidas (HB) não apresentaram diferenças significativas.

A atividade da enzima glutathione redutase (GR) no primeiro período de coleta não apresentou diferenças estatísticas para os fatores cultivares (Cv) e condição hídrica (CH) (Figura 9). No entanto, considerando os herbicidas, os tratamentos submetidos à aplicação de sulfentrazone promoveram um aumento significativo na atividade da GR em comparação aos tratamentos sem herbicida e com aplicação de ametrina.

Com relação à atividade da catalase (CAT) no primeiro período de coleta (Figura 10), observa-se que os tratamentos com a cultivar CTC9002 promoveram maior atividade enzimática em relação à cultivar CTC2. Além disso, os tratamentos sob déficit hídrico (35% cc) apresentaram atividade da CAT inferior aos tratamentos com 70% cc. Para o fator herbicidas, nenhuma diferença significativa entre sulfentrazone, ametrina e os tratamentos sem aplicação foi demonstrada.

Com base nos resultados apontados na Figura 11, a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) nos tratamentos com a cultivar CTC2 apresentou média significativamente superior aos tratamentos com a cultivar CTC9002. Considerando os fatores condição hídrica (CH) e herbicidas (HB), não houve diferenças significativas entre os tratamentos estudados.

A atividade da SOD das plantas de cana-de-açúcar após a eletroforese evidenciou a existência de três bandas para a cultivar CTC2 e cinco bandas para a cultivar CTC9002 (Figura 12). As cinco bandas de SOD foram caracterizadas como

Mn-SOD (SOD I) e Cu / Zn-SOD (SOD II a V). As isoformas II e V foram as predominantes para a maioria da atividade da SOD. As bandas I, II e V de SOD foram as únicas presentes nas duas cultivares. Os perfis de isoformas das cultivares CTC2 e CTC9002 foram distintos. Aos 7 dias após o início do déficit hídrico (Figura 9), não foram observadas grandes alterações na atividade da SOD. Neste período, ambas as cultivares apresentaram atividade da SOD levemente mais pronunciadas nas plantas sob 70% cc com aplicações de herbicida sulfentrazone.

Tabela 1. Resultados da análise de variância (ANOVA) para os parâmetros MDA, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Prolina, atividade da CAT, GR e APX para o primeiro período de coleta.

MDA			H_2O_2		Prolina	
	F	p	F	p	F	p
Cultivar (Cv)	27,23	<0.01	0,02	0,90	2,06	0,16
Condição Hídrica (CH)	0,31	0,58	1,34	0,26	0,46	0,50
Herbicida (Hb)	0,09	0,92	0,94	0,40	0,04	0,96
Cv x CH	3,23	0,09	2,65	0,12	0,26	0,61
Cv x Hb	1,18	0,32	1,34	0,28	0,47	0,63
CH x Hb	2,32	0,12	0,35	0,71	0,92	0,41
Cv x CH x Hb	3,32	0,05	0,82	0,45	0,38	0,69
CV (%)	17,69		62,76		25,75	
Shapiro-Wilk (p)	0,29		0,48		0,68	
Bartlett (p)	0,20		0,07		0,29	
CAT			GR		APX	
	F	p	F	p	F	p
Cultivar (Cv)	6,57	0,02	0,00	0,99	11,33	$2,6 \times 10^{-3}$
Condição Hídrica (CH)	3,23	0,09	0,31	0,58	0,14	0,71
Herbicida (Hb)	1,77	0,19	9,36	$1,0 \times 10^{-3}$	0,03	0,97
Cv x CH	2,50	0,13	0,32	0,58	1,62	0,21
Cv x Hb	2,11	0,14	1,42	0,26	1,37	0,27
CH x Hb	0,21	0,82	1,10	0,35	0,58	0,57
Cv x CH x Hb	1,70	0,20	0,43	0,66	1,06	0,36
CV (%)	8,99		23,86		0,20	
Shapiro-Wilk (p)	0,56		0,47		0,99	
Bartlett (p)	0,18		0,83		0,34	

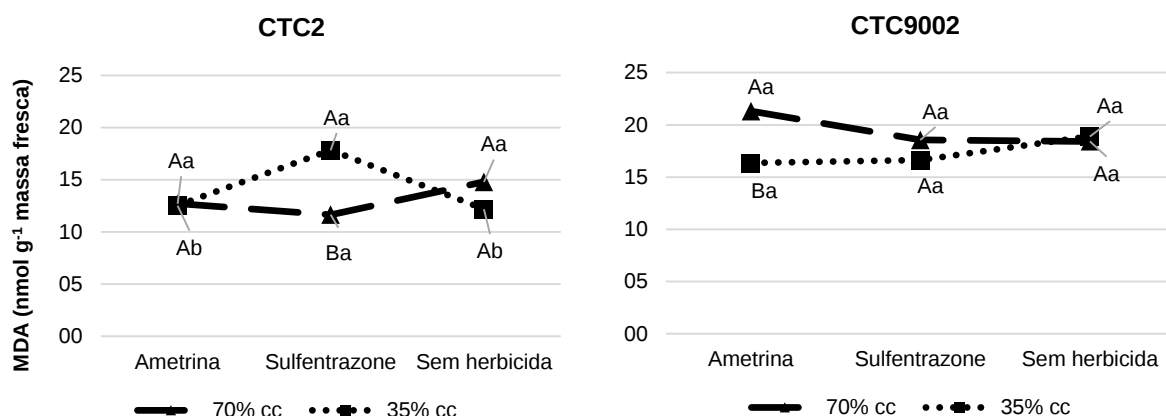


Figura 5. Peroxidação lipídica nas folhas de cana-de-açúcar, mensurada como conteúdo de malondialdeído (MDA) (nmol g^{-1} massa fresca) obtidas no primeiro período de coleta para as diferentes cultivares, sob condição de 70% ou 35% cc, submetidas ou não à aplicação de herbicidas. Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas para condição hídrica e minúsculas para herbicidas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

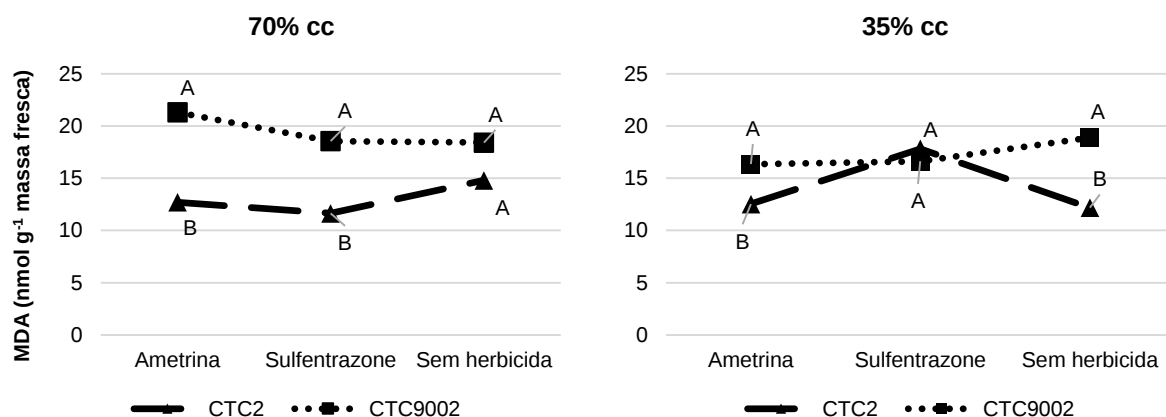


Figura 6. Peroxidação lipídica nas folhas de cana-de-açúcar, mensurada como conteúdo de malondialdeído (MDA) (nmol g^{-1} massa fresca) obtidas no primeiro período de coleta para as diferentes cultivares, sob condição de 70% ou 35% cc, submetidas ou não à aplicação de herbicidas. Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas para cultivares não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

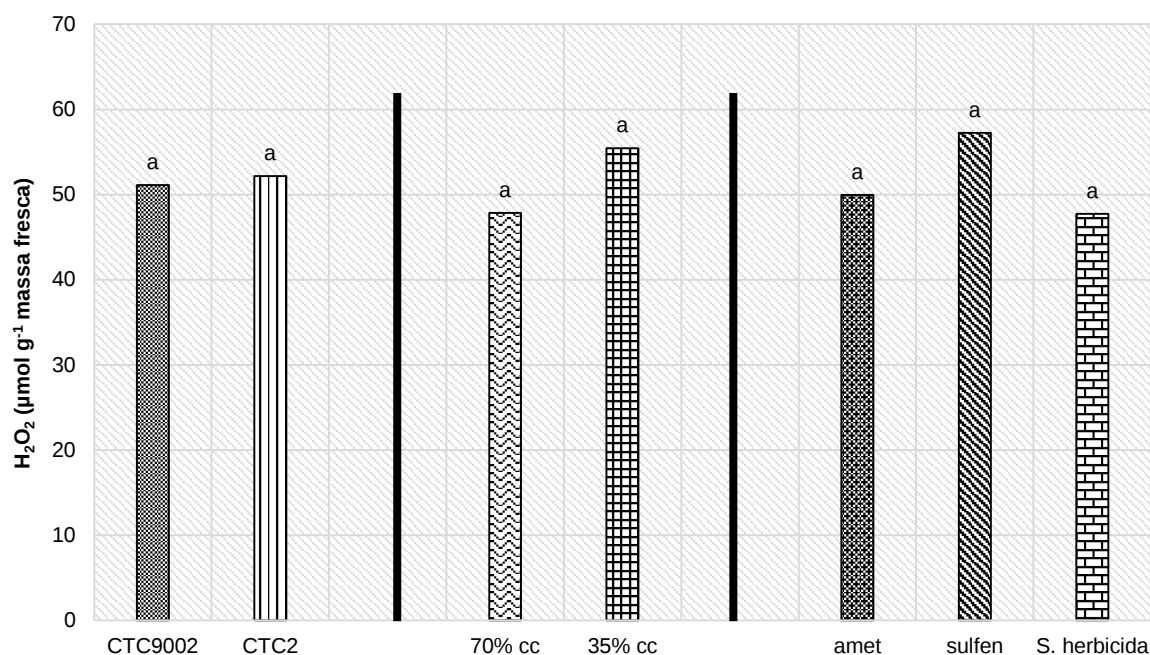


Figura 7. Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas folhas de cana-de-açúcar (μmol g⁻¹ massa fresca) obtidas no primeiro período de coleta para os fatores cultivares (CTC2 ou CTC9002), condição hídrica (70% ou 35% cc) e herbicidas (amet: ametrina; sulfen: sulfentrazone e sem herbicidas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

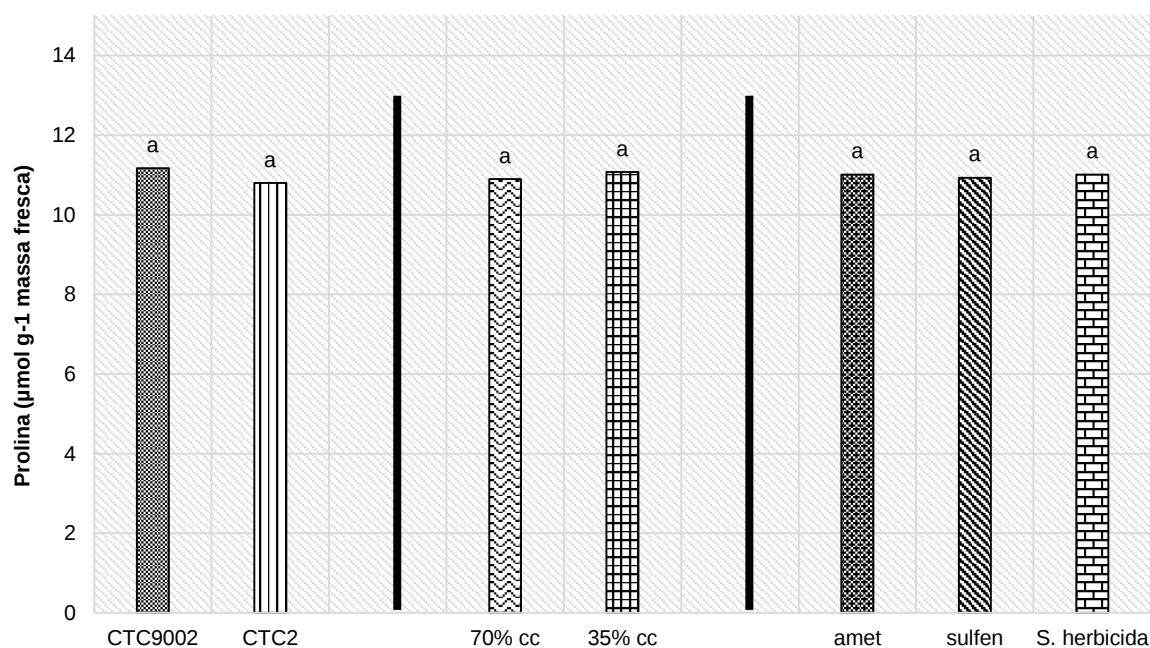


Figura 8. Conteúdo de prolina nas folhas de cana-de-açúcar (μmol g⁻¹ massa fresca) obtidas no primeiro período de coleta para os fatores cultivares (CTC2 ou CTC9002), condição hídrica (70% ou 35% cc) e herbicidas (amet: ametrina; sulfen: sulfentrazone e sem herbicidas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

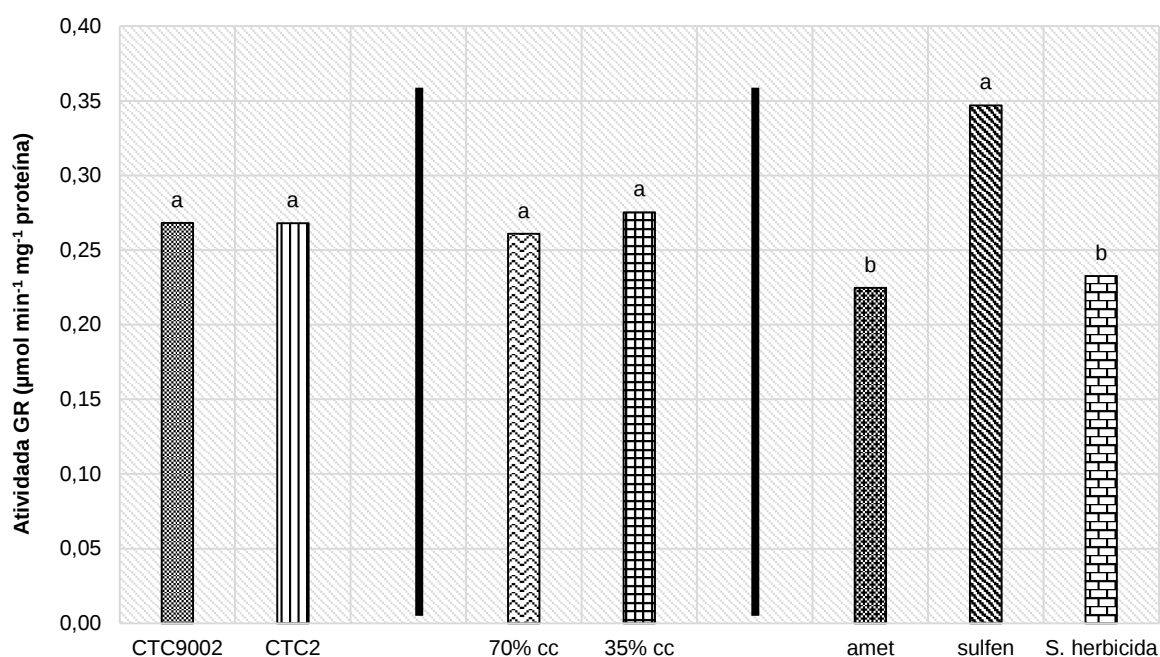


Figura 9. Atividade específica da glutatona redutase (GR) nas folhas de cana-de-açúcar ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) obtidas no primeiro período de coleta para os fatores cultivares (CTC2 ou CTC9002), condição hídrica (70% ou 35% cc) e herbicidas (amet: ametrina; sulfen: sulfentrazone e sem herbicidas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

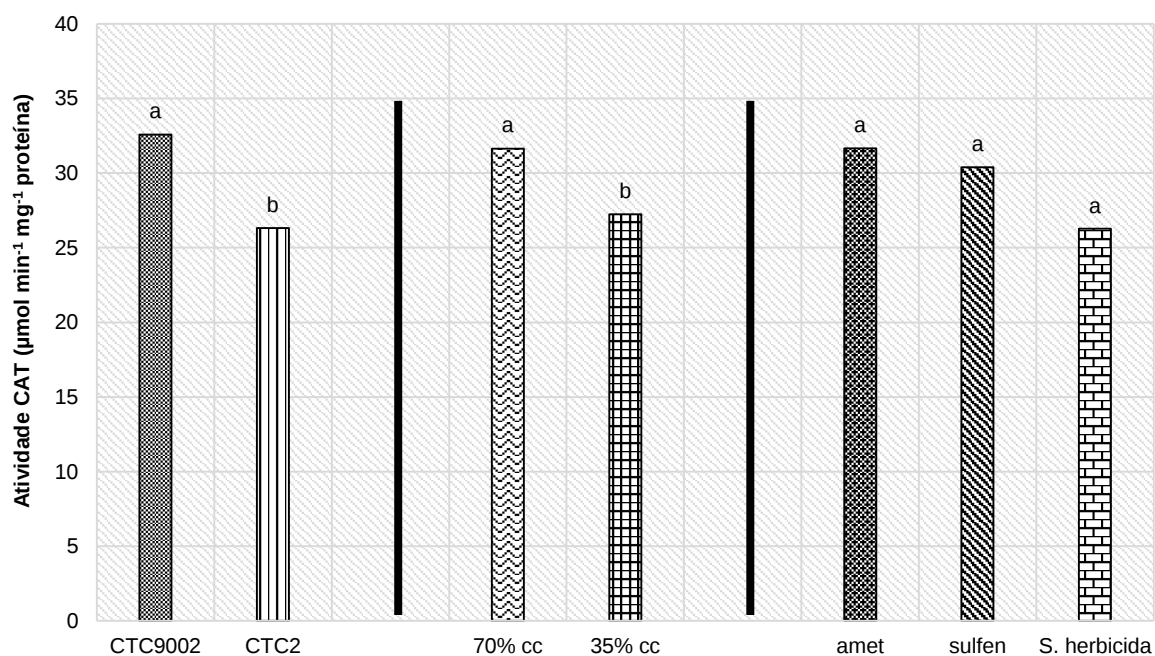


Figura 10. Atividade específica da catalase (CAT) nas folhas de cana-de-açúcar ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) obtidas no primeiro período de coleta para os fatores cultivares (CTC2 ou CTC9002), condição hídrica (70% ou 35% cc) e herbicidas (amet: ametrina; sulfen: sulfentrazone e sem herbicidas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

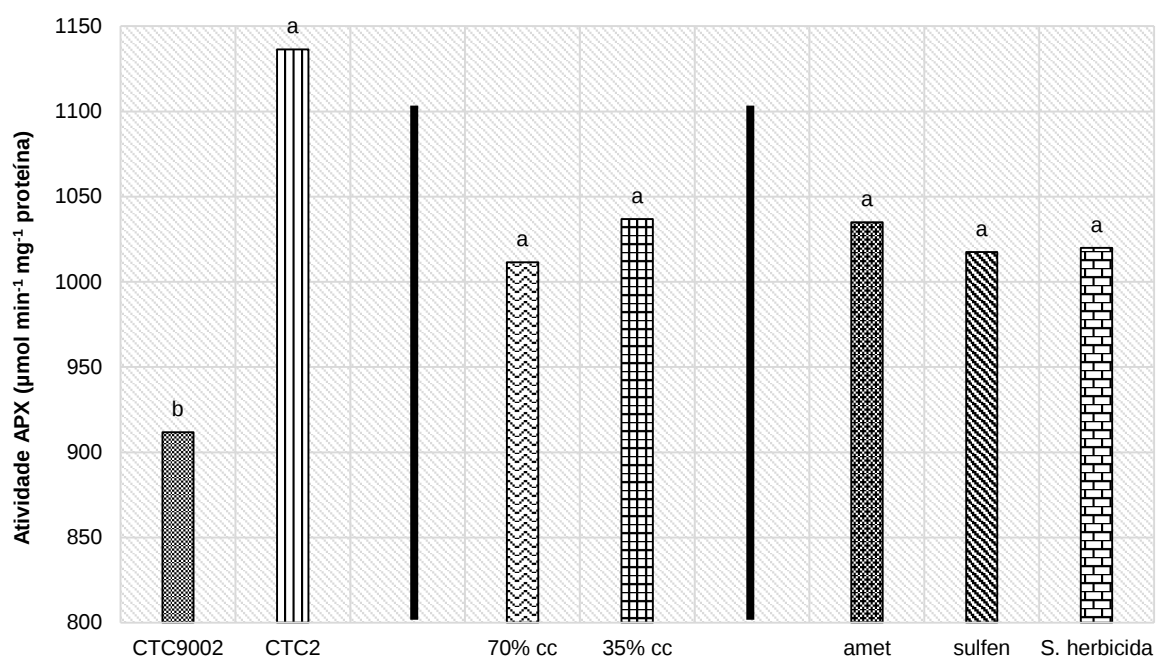


Figura 11. Atividade específica da ascorbato peroxidase (APX) nas folhas de cana-de-açúcar ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) obtidas no primeiro período de coleta para os fatores cultivares (CTC2 ou CTC9002), condição hídrica (70% ou 35% cc) e herbicidas (amet: ametrina; sulfen: sulfentrazone e sem herbicidas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

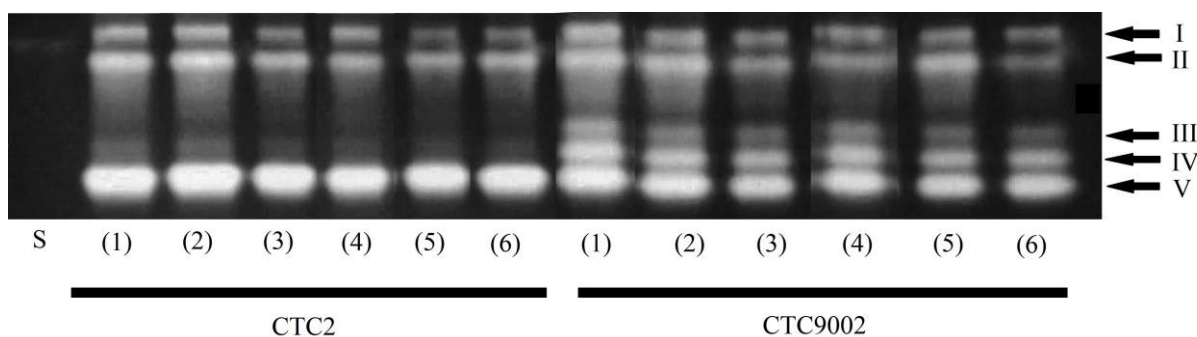


Figura 12. Revelação da atividade da superóxido dismutase (SOD) após eletroforese em gel de poliácridamida do extrato das folhas de cana-de-açúcar no primeiro período de coleta. (S) Padrão SOD bovino. (1) 70% cc. (2) 70% cc + herbicida sulfentrazone. (3) 70% cc + herbicida ametrina. (4) 35% cc. (5) 35% cc + herbicida sulfentrazone. (6) 35% cc + herbicida ametrina. As isoenzimas SOD foram caracterizadas como: (I) MnSOD; (II-V) Cu / ZnSOD.

4.2. Respostas bioquímicas para as plantas de cana-de-açúcar após 28 dias de exposição ao déficit hídrico e aos herbicidas.

Os resultados da análise de variância dos diferentes parâmetros avaliados na segunda coleta estão expressos na Tabela 2. Com relação ao conteúdo de MDA, é observado diferenças significativas para os fatores cultivares ($p < 0,01$) e herbicidas ($p < 0,10$). O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também apresentou interação tripla significativa ($p < 0,05$) entre os fatores cultivar x condição hídrica x herbicidas. Em relação ao conteúdo de prolina, observa-se que os três fatores estudados apresentaram interação significativa ($p < 0,10$) neste período de coleta. Referindo-se à atividade da enzima CAT, não se observou interações significativas entre os fatores, no entanto, houve diferença significativa para os fatores isolados cultivar ($p < 0,10$) e condição hídrica ($p < 0,01$). A atividade da enzima GR não apresentou interações triplas ou duplas entre os fatores, entretanto, houve diferença significativa para o fator herbicida ($p < 0,10$). Para a atividade da enzima APX, esta apresentou interação significativa entre os fatores cultivar x herbicidas ($p < 0,01$), bem como diferenças significativas nos três fatores isolados. A massa seca da parte aérea (MSPA) diferiu significativamente no fator condição hídrica ($p < 0,01$), ao passo que a massa seca das raízes (MSR) mostrou diferenças significativas para o fator herbicida e condição hídrica ($p < 0,05$).

Com base nos resultados apresentados na Figura 13, a cultivar CTC9002 apresentou maior conteúdo de MDA em relação a cultivar CTC2 nesse segundo período de coleta. Entre as condições hídricas, não se verificou diferenças significativas. No entanto, no fator herbicidas houve aumento significativo no conteúdo de MDA sob aplicação de ametrina em comparação a ausência de herbicidas.

Tratando-se dos resultados de conteúdo de H_2O_2 (Figuras 14 e 15), ao isolar a cultivar CTC2 na ausência de aplicação de herbicida, a condição de déficit hídrico apresentou menor conteúdo de H_2O_2 em relação à condição de 70% cc. Nos demais tratamentos herbicidas não houve diferença significativa entre as condições hídricas. Nota-se também que não houve diferenças entre os herbicidas tanto para a condição de 70% quanto para a 35% de cc. Ao analisar a cultivar CTC9002,

constata-se que nos tratamentos com os herbicidas ametrina e sulfentrazone a condição de 35% cc apresentou médias inferiores às da condição de 70% cc. No tratamento sem herbicidas, diferenças significativas entre as condições hídricas não foram observadas. Entre os herbicidas, não foram evidenciadas diferenças significativas para as condições de 70% e 35% cc. Quando a condição hídrica de 70% cc foi isolada, o tratamento com aplicação de ametrina, a cultivar CTC2 apresentou média de H_2O_2 significativamente inferior à obtida na CTC9002. No tratamento sem herbicidas e com aplicação de sulfentrazone as cultivares não apresentaram diferenças significativas. Na condição de déficit hídrico (35% cc) isolada não houve diferenças nas médias de conteúdo de H_2O_2 entre as cultivares combinada com a aplicação ou não dos herbicidas.

Os resultados de conteúdo de prolina obtidos na interação tripla dos fatores estão apresentados nas Figuras 16 e 17. Ao analisar somente a cultivar CTC2, nota-se que o tratamento com aplicação de sulfentrazone sob condição de 35% cc proporcionou maior conteúdo de prolina em relação à condição de 70% cc. Nos tratamentos com ametrina e sem herbicidas as condições hídricas não diferiram significativamente. Entre os herbicidas, não se observou diferenças estatísticas nas duas condições hídricas testadas. Para a cultivar CTC9002, evidencia-se que os tratamentos com ametrina e sem herbicidas na condição de 35% cc apresentaram maior conteúdo de prolina em comparação à condição de 70% cc. Na condição de déficit hídrico, o tratamento com ametrina apresentou média superior aos tratamentos com sulfentrazone e sem aplicação de herbicidas. Já na condição de 70% cc não houve diferenças significativas entre os herbicidas. Com a condição hídrica de 70% cc isolada, nota-se que não houve diferenças significativas entre as cultivares, enquanto que, ao isolar a condição de 35% cc, a CTC2 com aplicação de ametrina apresentou menor conteúdo de prolina em relação à CTC9002.

A atividade da GR não apresentou diferenças estatísticas para os fatores cultivares (Cv) e condição hídrica (CH) (Figura 18). Em relação ao fator herbicidas, é verificado que os tratamentos submetidos à aplicação de sulfentrazone apresentaram maior atividade da GR em relação ao tratamento sem exposição aos herbicidas.

Referindo-se à atividade da CAT (Figura 19), nota-se novamente que os tratamentos com a cultivar CTC9002 apresentaram maior atividade enzimática em comparação a cultivar CTC2. Ademais, os tratamentos na condição de 35% cc apresentaram menor atividade enzimática em relação aos tratamentos com 70% cc. Com relação aos herbicidas, não se observou diferenças significativas entre a ametrina, sulfentrazone e o tratamento sem aplicação.

Em relação aos resultados da atividade da APX na segunda coleta (Figura 20), nota-se que a aplicação de ametrina sob as plantas da cultivar CTC2 demonstraram maior atividade enzimática em relação à cultivar CTC9002. A ausência de herbicidas e a aplicação de sulfentrazone apresentaram atividade enzimática semelhante entre as duas cultivares. Na cultivar CTC2 houve diferenças significativas entre os dois herbicidas e o tratamento sem aplicação. Sem o uso de herbicidas foi constatado a menor atividade da APX, seguido pelo tratamento com sulfentrazone, ao passo que, a aplicação de ametrina resultou em maior atividade da APX. Para o fator condição hídrica, observa-se que o déficit hídrico promoveu um aumento significativo da atividade da APX em relação à condição de 70% cc.

Como já mencionado acima, foram identificadas três isoformas para a cultivar CTC2 e cinco isoformas para a cultivar CTC9002. As isoformas foram caracterizadas como Mn-SOD (SOD I) e Cu / Zn-SOD (SOD II a V). A atividade da SOD na cultivar CTC2 (Figura 21) nas isoformas SOD I, II e V foi maior na condição hídrica de 70% cc e aplicação do herbicida sulfentrazone. Quando as plantas foram submetidas a 28 dias de déficit hídrico (35% cc), a aplicação dos herbicidas promoveu um intenso aumento na atividade das isoformas I, II e V (Figura 21, linhas 5-6 - CTC2). Na cultivar CTC9002, não foram constatadas alterações expressivas entre as isoformas da SOD, exceto nos tratamentos com aplicação de ametrina. Tanto as plantas sob condição de 70% cc (linha 3 - CTC9002) como as plantas com déficit hídrico (linha 6 - CTC9002) submetidas à aplicação de ametrina mostraram ligeiro aumento na atividade da SOD, sendo o aumento mais pronunciado na condição de 70% cc do que nas plantas sob déficit hídrico.

A massa seca da parte aérea (Figura 22) na condição de déficit hídrico foi substancialmente reduzida em relação à condição de 70% cc. Em relação aos fatores cultivares e herbicidas, não se verificou diferenças significativas. Já em

relação à massa seca das raízes (Figura 23), não se constatou diferenças entre as cultivares, no entanto, a condição de déficit hídrico promoveu redução significativa na massa seca em relação à 70% cc. Para o fator herbicidas, observa-se que a aplicação de ametrina resultou em média de massa seca significativamente inferior em comparação à ausência de herbicidas e aplicação de sulfentrazone.

Tabela 2. Resultados da análise de variância (ANOVA) para os parâmetros MDA, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Prolina, atividade da CAT, GR, APX, massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR) para o segundo período de coleta.

	MDA		H_2O_2		Prolina		CAT	
	F	p	F	p	F	p	F	p
Cultivar (Cv)	19,50	$2,0 \times 10^{-4}$	1,55	0,23	0,66	0,42	4,07	0,06
Condição Hídrica (CH)	1,97	0,17	7,69	0,01	14,44	$9,0 \times 10^{-4}$	8,36	$8,0 \times 10^{-3}$
Herbicida (Hb)	2,80	0,08	0,56	0,58	0,99	0,39	0,32	0,73
Cv x CH	0,79	0,38	1,28	0,27	0,51	0,48	0,50	0,49
Cv x Hb	0,63	0,54	0,79	0,47	1,60	0,22	0,64	0,53
CH x Hb	0,40	0,67	0,46	0,64	0,40	0,67	0,94	0,41
Cv x CH x Hb	1,34	0,28	4,19	0,03	2,57	0,09	1,83	0,18
CV (%)	9,12		3,35		17,95		11,66	
Shapiro-Wilk (p)	0,84		0,17		0,16		0,19	
Bartlett (p)	0,56		0,91		0,13		0,51	
	GR		APX		MSPA		MSR	
	F	p	F	p	F	p	F	p
Cultivar (Cv)	0,08	0,78	14,81	$8,0 \times 10^{-4}$	1,27	0,27	0,24	0,63
Condição Hídrica (CH)	0,02	0,89	13,78	$1,1 \times 10^{-3}$	104,37	<0,01	6,02	0,02
Herbicida (Hb)	2,69	0,09	6,88	$4,3 \times 10^{-3}$	1,29	0,29	3,29	0,05
Cv x CH	0,20	0,66	0,17	0,68	0,01	0,92	0,45	0,51
Cv x Hb	0,66	0,53	6,29	$6,3 \times 10^{-3}$	0,01	0,99	0,20	0,82
CH x Hb	2,16	0,14	0,00	1,00	0,53	0,59	0,11	0,89
Cv x CH x Hb	0,67	0,52	2,15	0,14	2,20	0,13	0,68	0,52
CV (%)	25,80		0,19		15,52		54,27	
Shapiro-Wilk (p)	0,31		1,00		0,86		0,20	
Bartlett (p)	0,94		0,32		0,08		0,40	

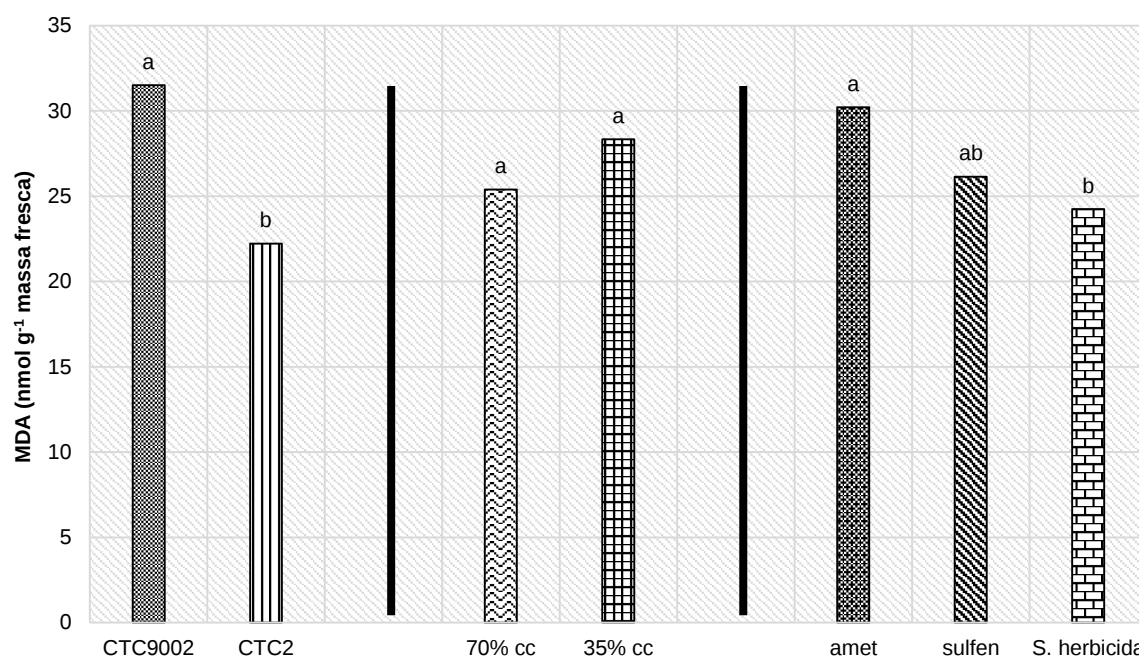


Figura 13. Peroxidação lipídica nas folhas de cana-de-açúcar, mensurada como conteúdo de malondialdeído (MDA) (nmol g^{-1} massa fresca) obtidas no segundo período de coleta para os fatores cultivares (CTC2 ou CTC9002), condição hídrica (70% ou 35% cc) e herbicidas (amet: ametrina; sulfen: sulfentrazone e sem herbicidas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

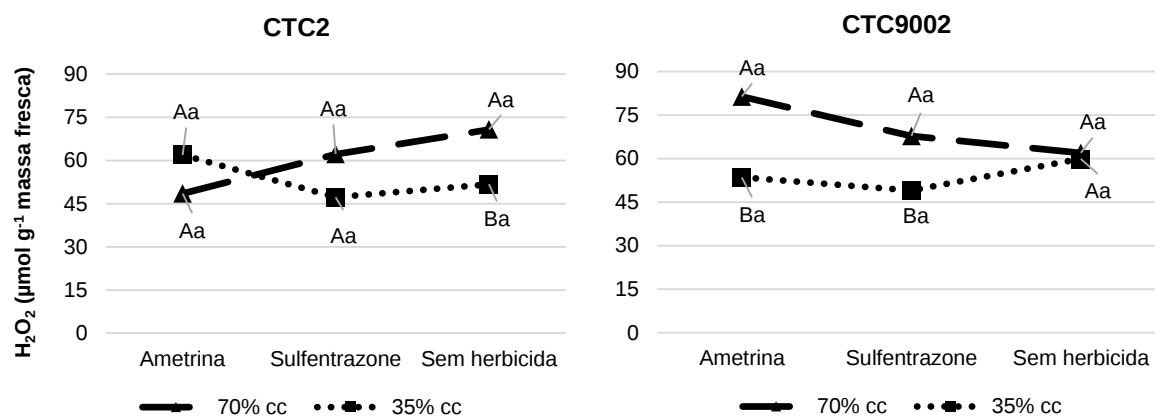


Figura 14. Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas de cana-de-açúcar ($\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca) obtidas no segundo período de coleta para as diferentes cultivares, sob condição de 70% ou 35% cc, submetidas ou não à aplicação de herbicidas. Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas para condição hídrica e minúsculas para herbicidas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

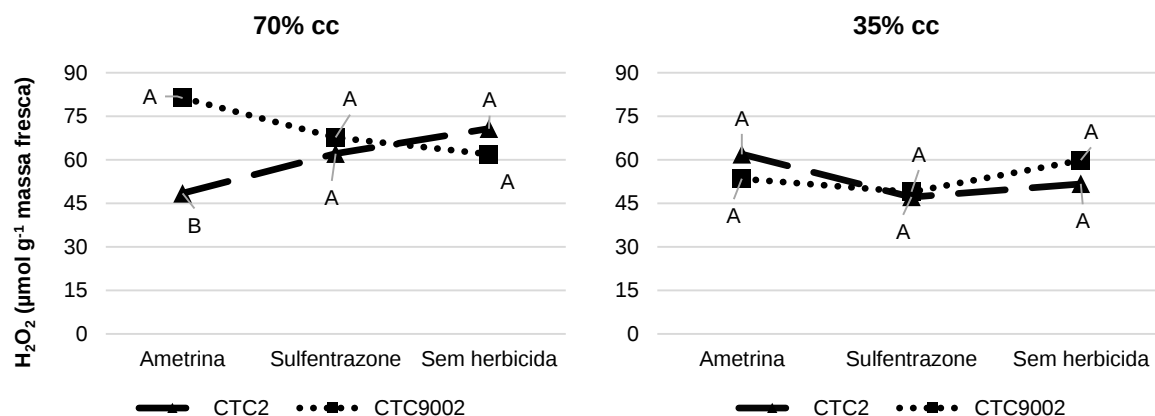


Figura 15. Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas folhas de cana-de-açúcar (μmol g⁻¹ massa fresca) obtidas no segundo período de coleta para as diferentes cultivares, sob condição de 70% ou 35% cc, submetidas ou não à aplicação de herbicidas. Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas para cultivares não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

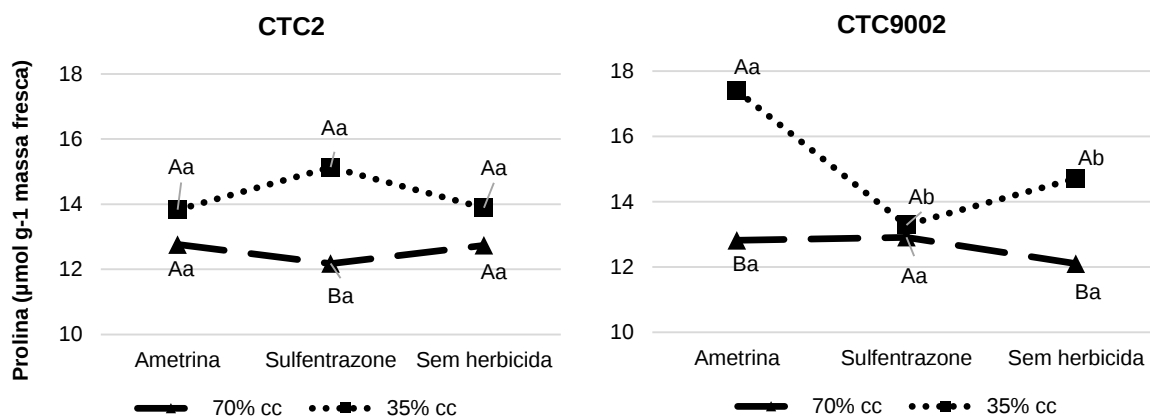


Figura 16. Conteúdo de prolina nas folhas de cana-de-açúcar (μmol g⁻¹ massa fresca) obtidas no segundo período de coleta para as diferentes cultivares, sob condição de 70% ou 35% cc, submetidas ou não à aplicação de herbicidas. Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas para condição hídrica e minúsculas para herbicidas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

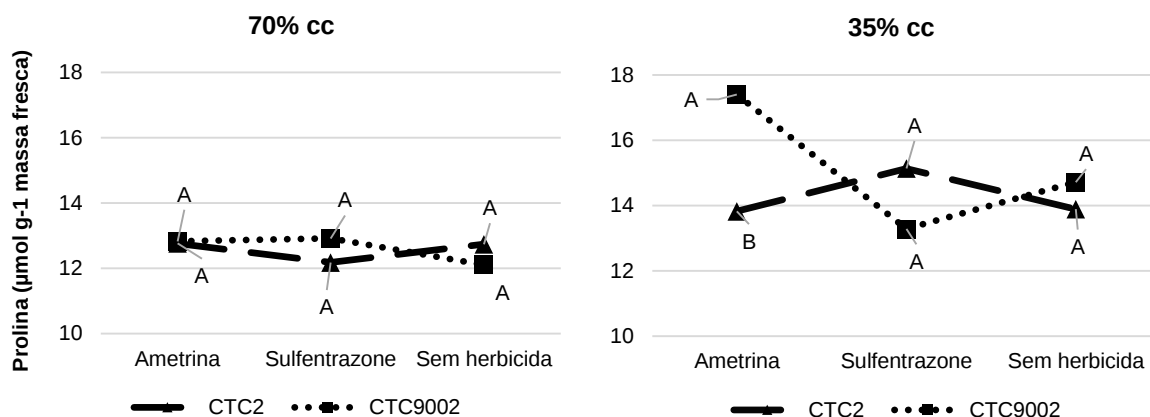


Figura 17. Conteúdo de prolina nas folhas de cana-de-açúcar (μmol g⁻¹ massa fresca) obtidas no segundo período de coleta para as diferentes cultivares, sob condição de 70% ou 35% cc, submetidas ou não à aplicação de herbicidas. Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas para cultivares não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

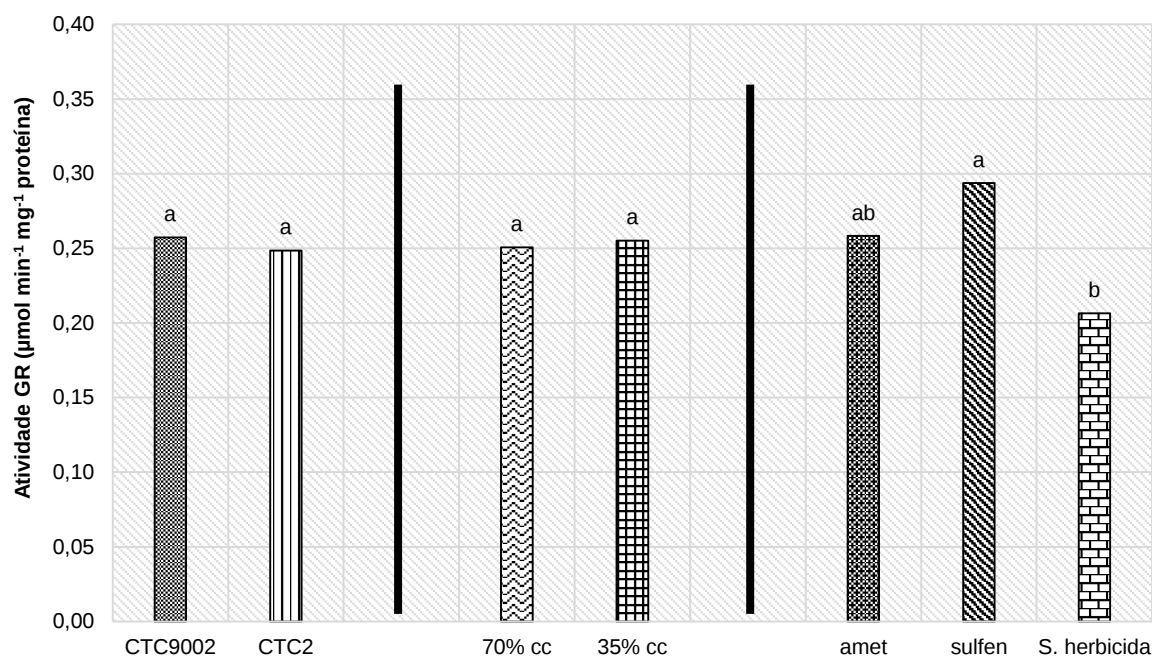


Figura 18. Atividade específica da glutathione redutase (GR) nas folhas de cana-de-açúcar ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) obtidas no segundo período de coleta para os fatores cultivares (CTC2 ou CTC9002), condição hídrica (70% ou 35% cc) e herbicidas (amet: ametrina; sulfen: sulfentrazone e sem herbicidas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

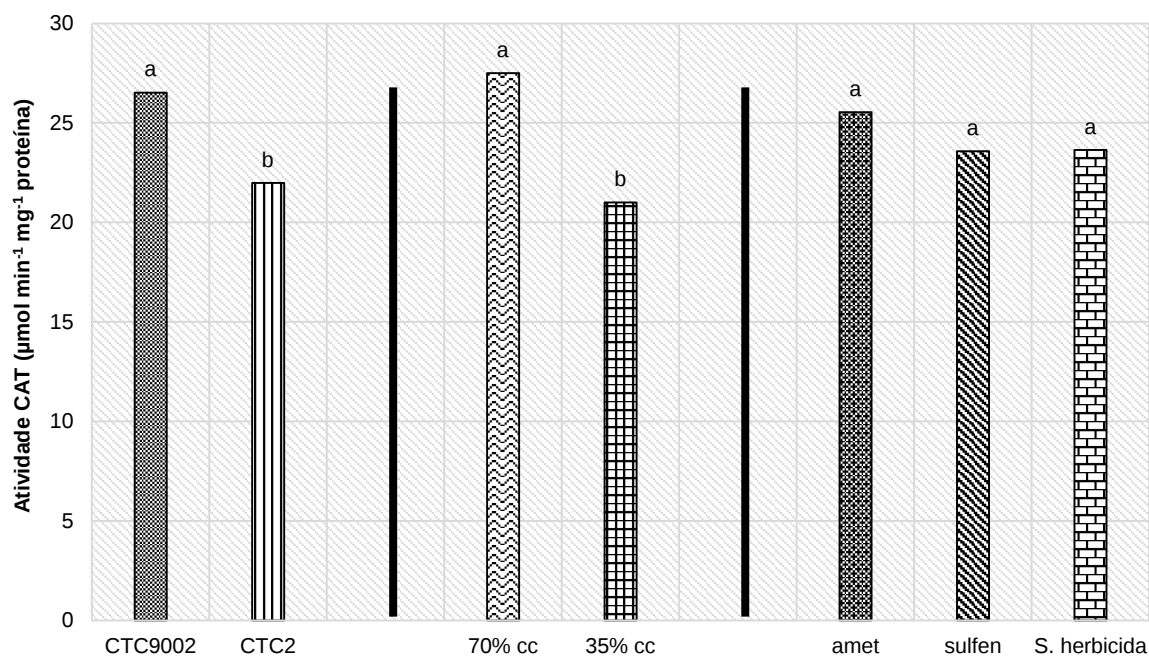


Figura 19. Atividade específica da catalase (CAT) nas folhas de cana-de-açúcar ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) obtidas no segundo período de coleta para os fatores cultivares (CTC2 ou CTC9002), condição hídrica (70% ou 35% cc) e herbicidas (amet: ametrina; sulfen: sulfentrazone e sem herbicidas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

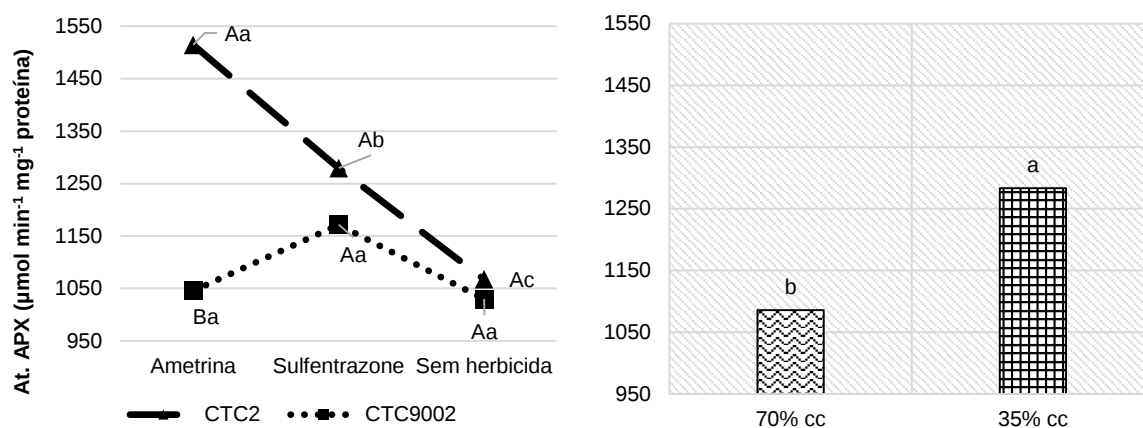


Figura 20. Atividade específica da ascorbato peroxidase (APX) nas folhas de cana-de-açúcar ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) obtidas no segundo período de coleta para a interação cultivares x herbicidas (a) e para o fator isolado condição hídrica (b). Médias seguidas pela mesma letra maiúsculas para cultivares e minúsculas para herbicidas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade (a). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade (b).

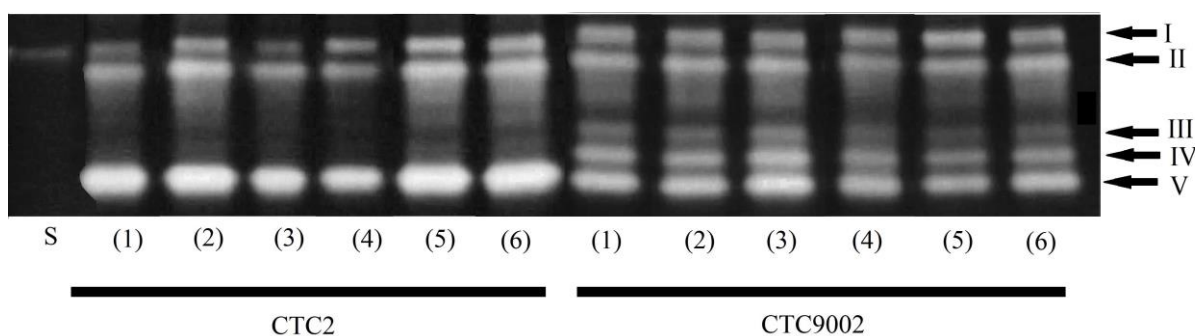


Figura 21. Revelação da atividade da superóxido dismutase (SOD) após eletroforese em gel de poliácridamida do extrato das folhas de cana-de-açúcar no segundo período de coleta. (S) Padrão SOD bovino. (1) 70% cc. (2) 70% cc + herbicida sulfentrazone. (3) 70% cc + herbicida ametrina. (4) 35% cc. (5) 35% cc + herbicida sulfentrazone. (6) 35% cc + herbicida ametrina. As isoenzimas SOD foram caracterizadas como: (I) MnSOD; (II-V) Cu / ZnSOD.

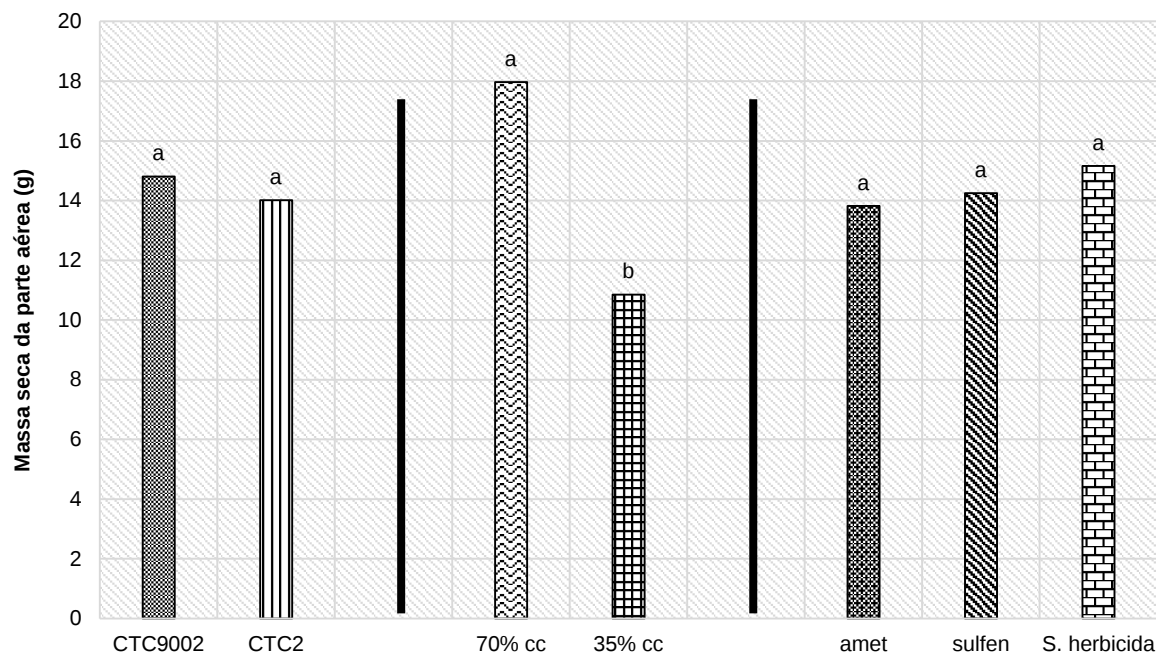


Figura 22. Acúmulo de massa seca na parte aérea nas plantas de cana-de-açúcar (g) obtido ao final das avaliações para os fatores cultivares (CTC2 ou CTC9002), condição hídrica (70% ou 35% cc) e herbicidas (amet: ametrina; sulfen: sulfentrazone e sem herbicidas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

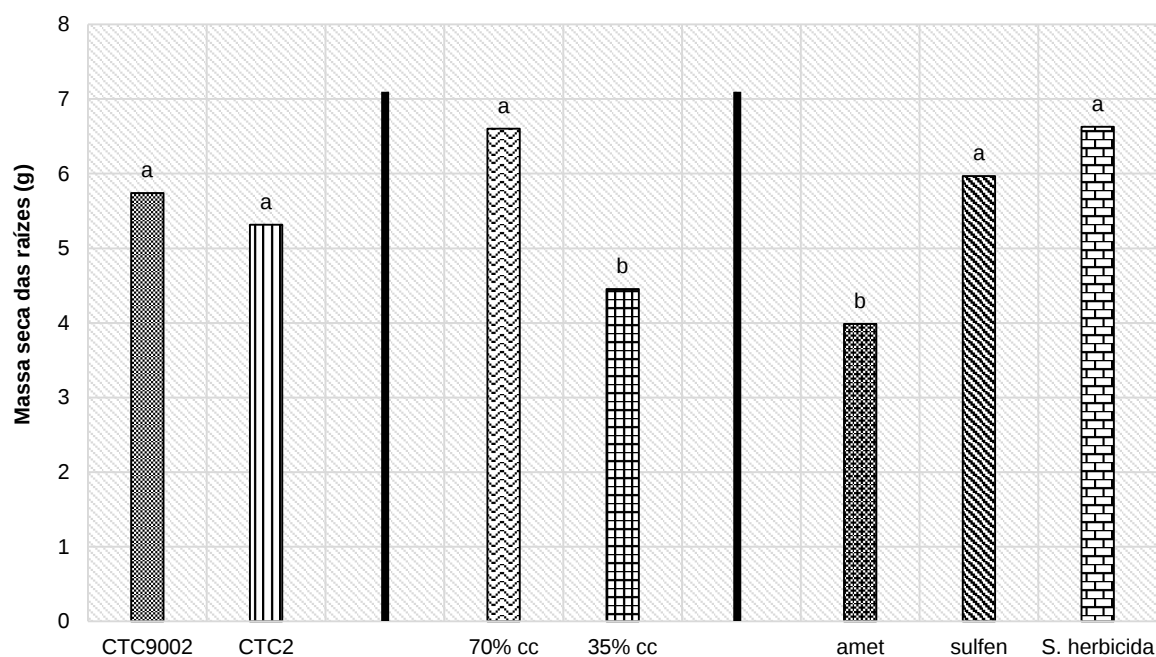


Figura 23. Acúmulo de massa seca nas raízes nas plantas de cana-de-açúcar (g) obtido ao final das avaliações para os fatores cultivares (CTC2 ou CTC9002), condição hídrica (70% ou 35% cc) e herbicidas (amet: ametrina; sulfen: sulfentrazone e sem herbicidas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 10% de probabilidade.

5. DISCUSSÃO

Um grande conjunto de informações e resultados estão disponíveis sobre alterações fisiológicas, moleculares e metabólicas em plantas expostas a uma condição única de estresse (SUZUKI et al., 2014). No entanto, estas informações são limitadas à uma única condição estressante. Sendo assim, a combinação de estresses precisa ser avaliada como um diferente estado de estresse, pois as estratégias de adaptação das plantas sob estas combinações podem ser diferentes daquelas do estresse individual (PANDY et al., 2015).

A maioria dos parâmetros avaliados aos 7 dias de exposição ao déficit hídrico e aos herbicidas não apresentaram diferenças significativas entre as condições hídricas impostas. Este resultado pode estar relacionado ao curto período (sete dias) após a imposição do déficit hídrico, o que não resultou em um nível severo de estresse nas plantas de cana-de-açúcar.

O estresse oxidativo e os danos nas células são gerados como consequência da duração e intensidade do déficit hídrico, espécies de plantas e dos genótipos analisados (CHAVES et al., 2003; GHELFI et al., 2011). Neste estudo, com 7 e 28 dias após o início do déficit hídrico, ambas as cultivares demonstraram diferentes respostas entre os parâmetros analisados.

A peroxidação lipídica além de ser uma das consequências do estresse oxidativo nas plantas (HUANG et al., 2012), é amplamente utilizada como um biomarcador para seleção de cultivares tolerantes à seca (LATA et al., 2011; SHAO et al., 2005). O malondialdeído (MDA) é um produto desse processo e causa alterações nas propriedades da membrana celular, como fluidez, transporte de íons e atividade enzimática (SHARMA et al., 2012). Aos 7 dias de exposição ao déficit hídrico e aos herbicidas, a cultivar CTC2, na condição de déficit hídrico (35% cc) apresentou aumento do MDA quando se aplicou o herbicida sulfentrazone. Em um estudo com aplicação do herbicida oxifluorfeno, mesmo mecanismo de ação do sulfentrazone, os autores observaram que as plantas de soja submetidas a este herbicida apresentaram altos conteúdos de MDA quando comparados ao controle (CATANEO et al., 2010).

Após 28 dias de déficit hídrico, a CTC9002 apresentou maior conteúdo de MDA em relação a cultivar CTC2, indicando que genótipos podem apresentar comportamentos distintos submetidos ao mesmo estresse. Além disso, é

observado maior conteúdo de MDA com aplicação de ametrina em comparação a ausência de herbicidas. Essa observação indica que os herbicidas podem causar modificações na homeostase celular e alterações no metabolismo das plantas. Vale ressaltar que a peroxidação lipídica é a última consequência e também uma ação física dos herbicidas relacionados direta ou indiretamente à fotossíntese.

Os herbicidas inibidores da PROTOX (sulfentrazone) induzem um acúmulo descontrolado de protoporfirinogênio IX, que ao vazar da membrana externa do cloroplasto para o citoplasma é convertido em Proto, sendo altamente fotodinâmico. Na presença de luz, o Proto gera o oxigênio singlet altamente reativo que induz a peroxidação lipídica (DEVINE et al., 1993; LEE et al., 1993). Os inibidores do FS II (ametrina) inibem a fotossíntese competindo com a PQ e ocupando o sítio de ligação da QB na proteína D1. O deslocamento resultante da plastoquinona (QB) interrompe o fluxo de elétrons do FSII para o FSI. Como essa transferência de elétrons é bloqueada, a energia da clorofila singleto não pode ser transferida para o centro de reação PSII, resultando no acúmulo da clorofila singleto, clorofila tripleto e oxigênio singleto (HESS, 2000).

Altos níveis de H_2O_2 seguidos por um aumento na peroxidação lipídica foram observados em plantas de cana-de-açúcar durante a fase inicial de crescimento sob déficit hídrico severo (BOARETTO et al., 2014). Além disso, foi relatada uma correlação entre a tolerância ao déficit hídrico e níveis mais baixos de peroxidação lipídica (CIA et al., 2012; SALES et al., 2015). Conforme relatado por ABBAS et al. (2014), a peroxidação lipídica pode ser considerada um bom parâmetro para identificar cultivares de cana-de-açúcar tolerantes ao déficit hídrico. Entretanto, este comportamento não foi constatado na condição hídrica de 35% cc. Esses resultados podem ser relacionados a conversão do H_2O_2 em outras ERO que possuem alto potencial oxidativo, atacam rapidamente a membrana e podem causar danos à célula. Assim, a baixa produção de H_2O_2 em plantas sob déficit hídrico ou com estresse ocasionado por herbicidas nem sempre está relacionada a um nível de estresse mais brando (LANGARO et al., 2016).

O acúmulo de prolina está relacionado à melhoria do status hídrico celular e à eliminação de ERO na cana-de-açúcar (MOLINARI et al., 2007; WAHID & CLOSE, 2007). Em relação aos resultados deste estudo, nota-se um ligeiro aumento no conteúdo de prolina nas folhas em ambas as cultivares quando

comparadas as avaliações após 7 e 28 dias de imposição ao déficit hídrico. Aos 28 dias, os conteúdos de prolina foram afetados pela interação dos três fatores impostos, evidenciando que em condições de déficit hídrico e aplicação de ametrina, a cultivar CTC9002 (tolerante à seca) apresentou maior acúmulo desse aminoácido em comparação à CTC2. Além do acúmulo de prolina na cultivar tolerante à seca, outras estratégias para superar a condição de déficit devem ser exploradas. Cia et al. (2012) mostraram que genótipos tolerantes à seca exibiram um menor acúmulo de prolina do que em comparação aos genótipos sensíveis à seca após 10 dias de seca, mas os teores de prolina foram muito semelhantes em plantas expostas a 20 dias sob déficit hídrico.

Como resposta ao estresse, o sistema antioxidante de resposta é capaz de operar metabolizando ERO tóxicas (AZEVEDO et al., 2012; GRATÃO et al., 2012). No entanto, a resposta pode variar dependendo da cultivar de cana-de-açúcar analisada, pois diferentes genótipos exibem diversos mecanismos adaptativos para regular seus estados redox. O aumento na atividade das enzimas antioxidantes em resposta ao déficit hídrico tem sido usado como um indicador de tolerância à seca (APEL & HIRT, 2004).

A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os danos causados pelas ERO, catalisando a conversão do ânion superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e O_2 nos cloroplastos, mitocôndrias, citoplasma e peroxissomos (WANG et al., 2012). Duas isoformas (SOD III e IV), caracterizadas como Cu/Zn-SODs, foram observadas na cultivar CTC9002 em comparação com a CTC2. De acordo com os dados desse estudo, não foram observadas mudanças na atividade da SOD entre os tratamentos na cultivar CTC9002, tolerante à seca. Em trabalhos com milho, a linhagem tolerante à seca pareceu estar ligada à presença das isoformas Cu/Zn-SOD (MALAN et al., 1990). A manutenção ou aumento da atividade da SOD sob condições de seca tem sido considerada um atributo de tolerância; ao mesmo tempo, uma redução na atividade da SOD poderia indicar certo grau de susceptibilidade ao déficit hídrico (BASU et al., 2010; SRIVALLI et al., 2003). As isoformas Cu/Zn-SOD desempenham um papel importante no metabolismo das plantas e são encontradas no citosol, cloroplastos e peroxissomos (AIRAKI et al., 2012; DEL RIO et al., 2002).

Com base nos resultados obtidos, a isoforma Fe-SOD não foi encontrada em ambos cultivares, o que corrobora com relatos anteriores de Fornazier et al.

(2002a, b), na qual não se constatou a isoforma em folhas de cana-de-açúcar e cultura in vitro. Embora os herbicidas sejam seletivos para a cultura, a atividade da SOD aumentou nas plantas submetidas à aplicação de sulfentrazone nas duas cultivares. No entanto, plantas de arroz apresentaram aumento na atividade da SOD de até 243% quando a atrazina foi aplicada (ZHANG et al., 2014). Plantas de trigo submetidas à aplicação de paraquat (EKMEKCI & TERZIOGLU, 2005), plantas de arroz sob aplicação de glifosato (AHSAN et al., 2008) e fluroxipir (WU et al., 2010), além de soja submetida a aplicação de lactofen (FERREIRA et al., 2010) também mostraram um aumento na atividade da SOD.

A CAT é a principal enzima que trabalha na defesa contra o excesso de ERO, mesmo apresentando menor afinidade pelo H_2O_2 . Comparada à APX, a atividade da CAT é essencial no início do estresse e auxilia a ação de outras enzimas do sistema antioxidante na redução da ação das ERO (MHAMDI et al., 2010). Vilela et al. (2017) sugeriram que na cana-de-açúcar, a maior atividade da CAT na cultivar RB867515 pode ser um indicativo de maior tolerância à seca. Boaretto et al. (2014) também observaram diferenças na atividade da CAT em genótipos de cana-de-açúcar com respostas contrastantes à seca.

No estudo em questão, a atividade da CAT aos 28 dias foi significativamente maior na cultivar CTC9002 em relação à CTC2, além de apresentar maior atividade na condição de 70% cc em comparação à condição de déficit hídrico. Provavelmente, outras enzimas atuam na eliminação das ERO e colaboram na manutenção do equilíbrio celular e na atividade da CAT.

A ação integrada das enzimas GR, CAT e SOD é uma importante função da tolerância ao déficit hídrico. Chagas et al. (2008) mostraram que a atividade da APX foi inversamente relacionada ao dano oxidativo na cana-de-açúcar, o que corrobora com a maior atividade da APX na cultivar CTC2 tolerante a herbicida aos 28 dias quando submetida à aplicação de ametrina. Vilela et al. (2017) relataram que a atividade antioxidante da APX foi 34% maior no genótipo mais tolerante RB86 7515 em comparação com o genótipo menos tolerante RB85 5536 em resposta às condições de déficit hídrico. Em um experimento comparando cultivares de cana-de-açúcar que diferiam em relação a tolerância à seca, os autores constataram um aumento na atividade das enzimas SOD e CAT nos cultivares tolerantes quando o déficit hídrico foi imposto (CIA et al., 2012). Em relação aos resultados deste estudo, uma maior atividade de APX foi observada

nas plantas CTC2 tolerantes a herbicidas em comparação com CTC9002 tolerante à seca quando submetidas à aplicação do herbicida ametrina.

A cultivar CTC2 tolerante a herbicida, apresentou maior atividade de APX aos 28 dias com exposição ao déficit hídrico e aos herbicidas. Sendo assim, fica evidente que a aplicação dos herbicidas ocasionou alterações na atividade da APX, o que sugere que estes provocam mudanças no metabolismo da planta mesmo sendo recomendados para a cultura.

A enzima GR pode participar indiretamente na regeneração do ascorbato previamente oxidado pela APX. O ciclo ascorbato-glutationa é um importante mecanismo nas plantas C4 e C3 para conter os danos oxidativos (FORNAZIER et al., 2002a; GRATÃO et al., 2012; NAYYAR e GUPTA, 2006). Parte da atividade da GR está localizada nos cloroplastos (EDREVA, 2005; FOYER et al., 2012), e a adaptação a condições de déficit hídrico tem sido relacionada ao aumento da atividade das enzimas relacionadas à glutathione (TAUSZ et al., 2004).

Nesse sentido, os resultados deste estudo não revelaram maior atividade de GR quando as plantas foram expostas ao déficit hídrico. Entretanto, aos 7 e 28 dias, houve um aumento significativo na atividade da GR nas plantas expostas ao herbicida sulfentrazone. Este resultado pode ser devido ao modo de ação do sulfentrazone, sendo que este herbicida inibe a PROTOX, uma enzima precursora da clorofila, que indiretamente gera $O^{\cdot -}$ dentro das células e promove a peroxidação lipídica da membrana (CARVALHO & LÓPEZ-OVEJERO, 2008). Cia et al. (2012) verificaram que a atividade da GR aumentou consideravelmente nas cultivares SP83 5073, SP90 3414 e SP90 1638, 20 dias após o início do período de seca.

Resultados semelhantes foram encontrados por Boaretto et al. (2014), na qual relataram que a atividade GR não se alterou em cultivares tolerantes à seca IACSP94 2094 sob um déficit hídrico moderado. As plantas estressadas desta cultivar apresentaram menor atividade da GR em comparação às plantas controle, inferindo que a IACSP94 2094 foi capaz de tolerar o déficit hídrico moderado e somente aumentou a atividade da GR quando o déficit hídrico imposto foi severo. O mesmo estudo mostrou que a cultivar de cana-de-açúcar IACSP95 5000 exibiu maior atividade da GR, mesmo sob déficit moderado de seca.

É bem estabelecido que o déficit hídrico afeta o crescimento e o desenvolvimento das plantas (LAWLOR, 2013). Considerando os resultados

obtidos neste estudo, a condição hídrica de 35% cc acarretou em menor acúmulo de massa seca da parte aérea comparado à condição de 70% cc. A exposição das plantas de cana-de-açúcar a 28 dias de déficit hídrico resultou em redução de aproximadamente 40% na massa seca da parte aérea em relação à condição hídrica de 70% cc. Resultados semelhantes foram constatados por Medeiros et al. (2013), na qual a produção da massa seca da parte aérea e raízes na cultivar RB86 7515 diminuiu em resposta ao déficit hídrico. Esses autores observaram decréscimos na ordem de 32,2; 55,2 e 49,0% para a massa seca da parte aérea, raiz e total, respectivamente. Em outros experimentos, a limitação hídrica afetou o crescimento do cultivar IACSP96 2042, resultado em uma redução de aproximadamente 50% da produção de massa seca, enquanto os genótipos SP87 365 e IACSP94 2094 não foram afetados pelo déficit hídrico (RIBEIRO et al., 2013).

Considerando os dados obtidos no presente estudo, não houve interações triplas ou duplas entre os fatores no parâmetro massa seca da parte aérea e raízes, no entanto, o déficit hídrico foi prejudicial ao desenvolvimento da parte aérea e raízes das plantas de cana-de-açúcar. Além disso, nos tratamentos submetidos à aplicação do herbicida ametrina houve redução na massa seca das raízes das plantas quando comparadas ao tratamento com sulfentrazone e sem uso de herbicidas. Uma mesma cultivar pode apresentar diferentes níveis de redução na produção, quando submetido à aplicação de ametrina ou trifloxysulfuron-sodium isolados ou em conjunto, já que estes herbicidas possuem mecanismos diferentes de ação (GALON et al., 2010b). De maneira similar, as cultivares respondem diferentemente em relação à perda de rendimento quando submetidos à aplicação de um único herbicida, o trifloxysulfuron-sodium (GALON et al., 2010b).

6. CONCLUSÕES

A aplicação do herbicida ametrina foi prejudicial às plantas de cana-de-açúcar em decorrência da maior peroxidação lipídica e redução na massa seca das raízes. Além disso, o aumento da atividade da GR em resposta à aplicação do herbicida sulfentrazone, independentemente da cultivar, indica que esta enzima pode estar relacionada a um dos mecanismos de tolerância deste grupo de herbicidas.

A cultivar CTC2 apresentou um aumento da atividade das enzimas APX e SOD quando submetidas à aplicação dos herbicidas em relação ao cultivar CTC9002. Baseado nestes parâmetros, infere-se que a CTC2 é tolerante aos herbicidas ametrina e sulfentrazone em relação a CTC9002, principalmente após 7 dias da aplicação.

Quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico por 28 dias, independente da cultivar, houve aumento na atividade da enzima APX, o que indica que essa enzima está relacionada ao mecanismo de defesa a essa condição de estresse. No entanto nenhuma das cultivares apresentou diferenças na produção de ERO e crescimento.

A combinação de estresses abióticos envolve uma rede complexa de respostas bioquímicas. Os parâmetros avaliados em ambas cultivares submetidas a aplicação de herbicida sob déficit hídrico não indicam características bioquímicas que pudessem caracterizá-las como tolerantes aos estresses combinados.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, S.; AHMAD, S.; SABIR, S.; SHAH, A. (2014). Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation, antioxidant activity, glycine-betaine and proline contents. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. 14, 233–243. <http://doi.org/10.4067/s0718-95162014005000019>

AIRAKI, M.; LETERRIER, M.; MATEOS, R. M.; VALDERRAMA, R.; CHAKI, M.; BARROSO, J. B.; DEL-RIO, L. A.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. (2012). Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. **Plant, Cell & Environment**, 35, 281–295.

AHSAN, N.; LEE, D. G.; LEE, K. W.; ALAM, I.; LEE, S. H.; BAHK, J. D.; LEE, B. H. (2008). Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 1062-1070.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, 24, 1337-1344.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, 53, 1331e1341.

APEL, K.; HIRT, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, 55, 373–399.

ASADA, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of reactive oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Biology**, 50(1), 601-639.

Da SILVA AUDE, M. I. (1993). Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. **Ciência Rural**, 23(2), 241-248.

AZANIA, C. A. M.; AZANIA, A. A. P. M.; VITORINO, R.; BORGES, I. S.; SILVA, T. P. (2014). MPB no canavial. **Revista Cultivar**, 185, 40-41.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. (1998). Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, 104(2), 280-292.

AZEVEDO, R. A.; LEA, P. J. (2011) Research on abiotic and biotic stress – what next?. **Annals of Applied Biology**, 159, 317-319.

AZEVEDO, R.A., CARVALHO, R.F., CIA, M.C., GRATÃO, P.L. (2011) Sugarcane under pressure: an overview of biochemical and physiological studies of abiotic stress. **Tropical Plant Biology**, 4, 42–51.

AZEVEDO, R. A.; GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F. (2012). What is new in the research on cadmium induced stress in plants? **Food and Energy Security**, 1(2), 133-140. <http://doi.org/10.1002/fes3.10>.

AZEVEDO, R. A. (2012). Publications in the field of agrarian sciences in the anais da academia brasileira de ciências: what next? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 84(1), 1 – 3.

BALKE, N. E. (1985). Herbicide effects on membrane functions. In: DUKE, S. O. (Ed), **Weed Physiology**. Boca Raton, EUA: CRC Press, v. II, p. 113-139.

BARTELS, P. G. (1985). Effects of herbicides on chloroplast and cellular development. In: DUKE, S. O. (Ed), **Weed Physiology**. Boca Raton, EUA: CRC Press, v. II, p. 64-91.

BEAUCHAMP, C. H.; FRIDOVICH, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, 44(1), 276-287.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, 39(1), 205–207.
<http://doi.org/10.1007/BF00018060>

BASU, S.; ROYCHOUDHURY, A.; SAHA, P. P.; SENGUPTA, D. N. (2010). Differential oxidative responses of indica rice cultivars to drought stress. **Plant Growth Regulation**, 60(1), 51–59.

BENESOVÁ, M.; HOLÁ, D.; FISCHER, L.; JEDELSKY, P. L.; HNILICKA, F.; WILHELMOVÁ, N.; ROTHOVÁ, O.; KOCOVÁ, M.; PROCHÁZKOVÁ, D.; HONNEROVÁ, J.; FRIDRICHÓVA, L.; HNILICKOVÁ, H. (2012). The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration?. **PLoS ONE** 7(6), e38017.

BENNETT, R.; PHIPPS, R.; STRANGE, A.; GREY, P. (2004). Environmental and human health impacts of growing genetically modified herbicide tolerant sugar beet: a life-cycle assessment. **Plant Biotechnology Journal**, 2(4), 273–278.

BERNSTEIN N., KRAVCHIK M., DUDAI N. (2010) Salinity-induced changes in essential oil, pigments and salts accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum*) in relation to alterations of morphological development. **Annals of Applied Biology**, 156, 167–177.

BOARETTO, L. F.; CARVALHO, G.; BORGIO, L.; CRESTE, S.; LANDELL, M. G. A.; MAZZAFERA, P.; AZEVEDO, R. A. (2014). Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, 74, 165-175. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.11.016

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, 43(1), 83-116.

BRADFORD, M. M. A. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

CAMPBELL, P. L. (2008). Efficacy of glyphosate, alternative post emergence herbicides and tillage for control of *Cynodon dactylon*. **South African Journal of Plant and Soil**, 25(4), 220–228.

CARR, M.K.V., KNOX, J.W. (2011). The water relations and irrigation requirements of sugarcane (*Saccharum officinarum*): a review. **Experimental Agriculture**, 47, 1–25.

CARVALHO, S. J. P.; DIAS, A. C. R.; MINAMIGUCHI, M. H.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P. J. (2012). Atividade residual de seis herbicidas aplicados ao solo em época seca. **Revista Ceres**, 59(2), 278-285.

CARVALHO, S. J. P.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. (2008). Resistência de plantas daninhas aos herbicidas inibidores da PROTOX (Grupo E). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Piracicaba: HRAC-BR, 3, 69-77.

CATANEO, A. C. et al. (2010). Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max* L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. **Revista Brasileira de Herbicidas**, 4(2), 23-31.

CRUZ DE CARVALHO, M. H. C. (2008). Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. **Plant Signaling & Behavior**, 3(3), 156–165.

CARVALHO, R. F.; MONTEIRO, C. C.; CAETANO, A. C.; DOURADO, M. N.; GRATÃO, P. L.; HADDAD, C. K. B.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. (2013). Leaf senescence in tomato mutants as affected by irradiance and phytohormones. **Biologia Plantarum**, 57, 749–757. <http://doi.org/10.1007/s10535-013-0333-1>

CHAGAS, R. M.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, R. V.; VITORELLO, V. A.; CARRER, H. (2008). Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 90, 181–188.

CHAVES M. M., PEREIRA J. S., MAROCO J. P., RODRIGUES M. L., RICARDO C. P. P., OSÓRIO M. L., CARVALHO I., FARIA T., PINHEIRO C. (2002) How plants cope with water stress in the field: photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, 89, 907–916.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J.; PEREIRA, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, 30, 239–264.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; FILHO, J. C. B.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A. V. O.; FILGUEIRAS, T. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; GUZZO, E.; C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. C.; ROMANO, E.; SILVA, W. J.; FILHO, M. C. S.; ULIAN, E. C. (2011). Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Bioloogy**, 4(1), 62-89.

CIA, M.; GUIMARÃES, A.; MEDICI, L.; CHABREGAS, S.; AZEVEDO, R. (2012). Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and-sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biololgy**, 161(3), 313–324.
<http://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00575.x>

Companhia Nacional de Abastecimento (2018). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar | v. 5 - Safra 2018/19, n.2 - Segundo levantamento, agosto de 2018**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em: 18 set 2018.

CREISSEN, G.P.; EDWARDS, E.A.; MULLINEAUX, P.M. (1994). Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**, 343-364.

DAN HESS, F. (1994). Mode of action of photosynthesis inhibitors. In: Purdue Unversity, (Ed), **Herbicide Action Course**. West Lafayette, EUA: CRC Press, p. 85-102.

DAVIES, W. J.; ZHANG, J.; YANG, J.; DODD, I. C. (2011). Novel crop science to improve yield and resource use efficiency in water-limited agriculture. **Journal of Agricultural Science**, 149, 123-131.

DESIKAN, R.; MACKERNESS, S.A.H.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S. J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology**, 127(1), 159-172.

DEVINE, M. D.; DUKE, S. O.; FEDTKE, C. (1993). Oxygen toxicity and herbicidal action. **Physiology of Herbicide Action**, Englewood Cliffs: Prentice Hall, 177–189.

DOORENBOS J., KASSAM A. H. (1979) **Yield response to water**. In FAO Irrigation and Drainage Paper No. 33. Rome: FAO.

ECCO, M.; SANTIAGO, E. F.; LIMA, P. R. (2014). Respostas biométricas em plantas jovens de cana-de-açúcar submetidas ao estresse hídrico e ao alumínio. **Comunicata Scientiae**, 5(1), 59-67.

EDREVA, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 106, 119–133.

EKMEKCI, Y.; TERZIOGLU, S. (2005). Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 83(1), 69-81.

ELLOUZI, H.; BENHAMED. K.; JANA, C.; MUNNÉ-BOSCH, S.; ABDELLY, C. (2011). Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte) seedlings. **Plant Physiology**, 16, 128–143.

ENDRES L., SILVA J. V., FERREIRA V. M., BARBOSA G. V. S. (2010) Photosynthesis and water relations in Brazilian sugarcane. **The Open Agriculture Journal**, 4, 31–37.

FERREIRA, R. R.; OLIVEIRA, F. T. R. D.; DELITE, F. D. S.; AZEVEDO, R. A.; NICOLAI, M.; CARVALHO, S. J. P. D.; FIGUEIRA, A. V. D. O. (2010). Tolerância diferencial de variedades de cana-de-açúcar a estresse por herbicidas. **Bragantia**, 69(2), 395-404.

FERREIRA, L. C.; CATANEO, A. C.; REMAER, L. M. R.; CORNIANI, N.; DE FÁTIMA FUMIS, T.; DE SOUZA, Y. A.; SCARVRONI, J.; SOARES, B. J. A. (2010). Nitric oxide reduces oxidative stress generated by lactofen in soybean plants **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 97(1), 47-54.

FORNAZIER, R. F.; FERREIRA, R. R.; PEREIRA, G. J. G.; MOLINA, S. M. G.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. (2002^a). Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. **Biologia Plantarum**, 45, 91–97.

FORNAZIER, R. F.; FERREIRA, R. R.; PEREIRA, G. J. G.; VITÓRIA, A. P.; MOLINA, S. M. G.; SMITH, R. J.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. (2002^b). Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 71, 125–131.

FOYER, C. H.; SHIGEOKA, S. (2010). Understanding Oxidative Stress and Antioxidant Functions to Enhance Photosynthesis. **Plant Physiology**, 155(1), 93-10.

FOYER, C. H.; NEUKERMANS, J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G.; HARBINSON, J. (2012). Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. **Journal of Experimental Botany**, 63, 1637–1661.

FRIDOVICH, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, 64(1), 97-112.

GALLEGO, S. M.; PENA, L. B.; BARCIA, R. A.; AZPILICUETA, C. E.; IANNONE, M. F.; ROSALES, E. P.; ZAWOZNIK, M. S.; GROPPA, M. D.; BENAVIDES, M. P. (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, 83, 33–46.

GALON, L.; CONCENÇO, G.; FERREIRA, E. A.; ASPIAZÚ, I.; SILVA, A. F.; FERREIRA, F. A.; SILVA, A. A.; TIRONI, S. P.; FREITAS, M. A. M.; SOARES, R. E. (2010a). Eficiência do uso da água em genótipos de cana-de-açúcar submetidos à aplicação de herbicidas. **Planta Daninha**, 28(4), 777-784.

GALON, L.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, E. A.; SILVA, A. A.; CONCENÇO, G.; SILVA, A. F.; REIS, M. R.; ASPIAZÚ, I.; FIALHO, C. M. T.; BARBOSA, M. H. P.; TIRONI, S. P. (2010b). Tolerância de novos genótipos de cana-de-açúcar a herbicidas. **Planta Daninha**, 28(2), 329-338.

GARCIA, J. S.; GRATÃO, P. L.; AZEVEDO, R. A.; ARRUDA, M. A. Z. (2006). Metal contamination effects on sunflower (*Helianthus annuus* L.), growth and protein expression in leaves during development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 8623-8630.

GAVELIENE, V.; NOVICKIENE, L.; KYTE, L. P. (2013). Effect of auxin physiological analogues on rapeseed (*Brassica napus*) cold hardening, seed yield and quality. **Journal of Plant Research**, 126(2), 283–292.

GHELFI, A.; GAZIOLA, S. A.; CIA, M. C.; CHABREGAS, S. M.; FALCO, M. C.; KUSER-FALCÃO, P. R.; AZEVEDO, R. A. (2011). Cloning, expression, molecular modeling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. **Annals of Applied Biology**, 159, 267–280.

GOLDEMBERG, J. (2007) Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, 315, 808–810.

GOMES-JUNIOR, R. A.; MOLDES, C. A.; DELITE, F. S.; POMPEU, G. B.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. (2006). Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, 65(8), 1330-1337.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, 32, 481–494.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; ANTUNES, A. M.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. (2008). Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium- induced stress. **Annals of Applied Biology**, 153, 321–333.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F. A.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. (2012). Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, 56, 79-96.
<http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.04.009>.

GRESSEL, J. (1985). Herbicide tolerance and resistance alteration of site of activity. In: Duke, S. (Ed.), **Weed Physiology**. Boca Raton, EUA: CRC Press, v. II, p. 160-190.

GUO, Z.; OU, W.; LU, S.; ZHONG, Q. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, 44, 828–836.

HAYAKAWA, T., KANEMATSU, S., ASADA, K. (1984). Occurrence of Cu, Zn-superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, 25(6), 883-889.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; VAN STADEN, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell & Environment**, 21(6), 535–553.

HEATH, R. L.; PACKER, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry Biophysics**, 125, 189-198. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](http://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)

HESS, F. D. (2000). Review: Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, 48, 160–170.

HOLTMAN, W. L., HEISTEK, J. C., MATTERN, K. A., BAKHUIZEN, R., DOUMA, A. C. (1994). β -Oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. **Plant Science**, 99(1), 43-53.

HUANG, G-T.; MA, S-L.; BAI, L-P.; ZHANG, L.; MA, H.; JIA, P. LIU, J.; ZHONG, M.; GUO, Z-F. (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. **Molecular Biology Reports**. 39, 969–987. <http://doi.org/10.1007/s11033-011-0823-1>

HU, H., XIONG, L. (2014). Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. **Annual Review of Plant Biology**. 65, 715–741. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040000

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. (2002). The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of fotosynthetic organism, **Phytochemistry**, 60(7), 651-674.

INMAN-BAMBER, N., SMITH, D. (2005). Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, 92(2-3), 185–202. doi: 10.1016/j.fcr.2005.01.023

INMAN-BAMBER, N., LAKSHMANAN, P., PARK, S. (2012). Sugarcane for waterlimited environments: Theoretical assessment of suitable traits. **Field Crops Research**, 134, 95–104. doi: 10.1016/j.fcr.2012.05.004

JANGPROMMA, N.; SONGSRI, P.; THAMMASIRIRAK, S.; JAISIL, P. (2010). Rapid assessment of chlorophyll content in sugarcane using a spad chlorophyll meter across different water stress conditions. **Asian Journal of Plant Sciences**, 9, 368–374.

JEYARAMRAJA, P. R.; THUSHARA, S. S. (2013). Sequence of physiological responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) subjected to soil moisture deficit. **Photosynthetica**, 51(3), 395-403.

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

KELLOS, T.; TIMAR, I.; SZILAGYI, V.; SZALAI, G.; GALIBA, G.; KOCSY, G. (2008). Stress hormones and abiotic stresses have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. **Plant Biology**, 10, 563–572.

KHAN N., MISHRA A., CHAUHAN P.S., NAUTIYAL C.S. (2011) Induction of *Paenibacillus lentimorbus* biofilm by sodium alginate and CaCl₂ alleviates drought stress in chickpea. **Annals of Applied Biology**, 159, 372–386.

KIDO E.A., NETO J.R.C.F., SILVA R.L.D., PANDOLFI V., GUIMARÃES A.C.R., VEIGA D.T., CHABREGAS S.M., CROVELLA S., BENKO-ISEPPON A.M. (2012) New insights in the sugarcane transcriptome responding to drought stress as revealed by supersage. **Scientific World Journal**, 2012. DOI:10.1100/2012/821062.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M.R. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk (2001). **Trends in Plant Science**, 6(6), 262-267.

LACLAU, P.B., LACLAU, J.P. (2009) Growth of the whole root system for a plant crop of sugarcane under rainfed and irrigated environments in Brazil. **Field Crops Research**, 114, 351–360.

LANDELL, M.G.A.; CAMPANA, M.P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M.A.; ANJOS, I.A.; DINARDO-MIRANDA, L.L.; et al. (2012). **Sistemas de multiplicação de cana-de-açúcar com o uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Ribeirão Preto: Instituto Agronômico de Campinas, 16p.

LANGARO, A. C.; AGOSTINETTO, D.; OLIVEIRA, C.; SILVA, J. D. G.; BRUNO, M. S. (2016). Biochemical and Physiological Changes in Rice Plants Due to the Application of Herbicides. **Planta Daninha**, 34(2), 277-290.

LATA, C.; JHA, S.; DIXIT, V.; SREENIVASULU, N.; PRASAD, M. (2011). Differential antioxidative responses to dehydration induced oxidative stress in core set of foxtail millet cultivars. **Protoplasma**, 248, 817–828.

LAWLOR, D. W. (2013). Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, 64, 83-108.

LEE, H. J.; DUKE, M. V.; DUKE, S. O. (1993). Cellular localization of protoporphyrinogen-oxidizing activities of etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. **Plant Physiology**, 102(3), 881–889.

LEMBKE C.G., NISHIYAMA M.Y. Jr., SATO P.M., ANDRADE R.F., SOUZA G.M. (2012) Identification of sense and antisense transcripts regulated by drought in sugarcane. **Plant Molecular Biology**, 79, 461–477.

MACHADO, R., RIBEIRO, R., MARCHIORI, P., MACHADO, D., MACHADO, E., LANDELL, M. (2009). Biometric and physiological responses to water deficit in sugarcane at different phenological stages. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 44, 1575–1582. <http://10.1590/S0100-204X2009001200003>

MALAN, C.; GREYLING, M. M.; GRESSEL, J. (1990). Correlation between Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. **Plant Science**, 69, 157-166.

MÁRQUEZ-GARCÍA, B.; HOREMANS, N.; CUYPERS, A.; GUISEZ, Y.; CÓRDOBA, F. (2011). Antioxidants in *Erica andevalensis*: a comparative study between wild plants and cadmium- exposed plants under controlled conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, 49, 110–115.

MARRS, K. A. (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annual review of plant biology**, 47(1), 127-158.

MARTINS, P. F.; CARVALHO, G.; GRATÃO, P. L.; DOURADO, M. N.; PILEGGI, M.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, R. A. (2011). Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, 46, 1186–1195.

MEDEIROS, D. B.; SILVA, E. C. D.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; TEIXEIRA, M. M.; BUCKERIDGE, M. S. (2013). Physiological limitations in two sugarcane varieties under water suppression and after recovering. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, 25(3), 213-222.

MITRA, J. (2001) Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. **Current Science**, 80, 758–763.

MITTLER, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, 7(9), 405-410.

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; VAN BREUSEGEM, F.; NOCTOR, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, 61, 4197–4220.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, J. F. R. P.; BESPALHOK-FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.) osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, 130, 218–229.

MONDINI L., FARINA A., PORCEDDU E., PAGNOTTA M. A. (2010) Analysis of durum wheat germplasm adapted to different climatic conditions. **Annals of Applied Biology**, 156, 211 – 219.

MONQUERO, P. A.; SILVA, A. C.; BINHA, D. P.; AMARAL, L. P.; SILVA, P. V.; INACIO, E. M. (2008). Mobilidade e persistência de herbicidas aplicados em pré-emergência em diferentes solos. **Planta Daninha**, 26(2), 411-417.

MOUSSA H. R., ABDEL-AZIZ S. M. (2008) Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. **Australian Journal of Crop Science**, 1, 31–36.

MULWA, R. M. S.; MWANZA, L. M. (2006) Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. **African Journal of Biotechnology**, 5, 396–404.

NAVARATNA, D.; ELLIMAN, J.; COOPER, A.; SHU, L.; BASKARAN, K.; JEGATHEESAN, V. (2012). Impact of herbicide Ametryn on microbial communities in mixed liquor of a membrane bioreactor (MBR). **Bioresource Technology**, 113, 181–190.

NAYYAR, H.; GUPTA, D. (2006). Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. **Environmental and Experimental Botany**, 58, 106–113.

NOGUEIROL, R. C.; MONTEIRO, F. A.; GRATÃO, P. L.; BORGO, L.; AZEVEDO, R. A. (2015). Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. **Environmental Monitoring and Assessment**, 187(3), 73. <http://doi.org/10.1007/s10661-015-4282-3>

OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (2011). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. (ed. 1º) Curitiba: Ed. Omnipax, v. 1. 348p.

PALL, P.; ALLEN, M.; STONE, D. (2007). Testing the Clausius-Clapeyron constrain on changes in extreme precipitation under CO₂ warming. **Climate Dynamics**, 28(4), 351-363.

PANDEY, P., RAMEGOWDA, V., SENTHIL-KUMAR, M. (2015). Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, 6, 723.

PIRES, R. C. M.; ARRUDA, F. B.; SAKAI, E. 2008. Irrigação e drenagem. In: DINARDO- MIRANDA, L.L., VASCONCELOS, A.C.M., LANDELL, M.G.A. (Eds.), **Cana-de-açúcar**. Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, p. 882.

PITZSCHKE, A.; FORNAZI, C.; HIRT H. (2006). Reactive oxygen species signaling in plants. **Antioxidants and Redox Signalling**, 8(9), 1757-1764.

DEL POZZO A., CASTILLO D., INOSTROZA L., MATUS I., MENDEZ A.M., MORCUENDE R. (2012) Physiological and yield responses of recombinant chromosome substitution lines of barley to terminal drought in a Mediterranean-type environment. **Annals of Applied Biology**, 160, 157–167.

PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; VARGAS, L. (2004). Manejo e controle de plantas daninhas em cana-de-açúcar. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S., (Eds.) **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 397-452.

RAMESH, P. (2000). Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. **Journal of Agronomy and Crop Science**, 85(2), 83-89.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, 161(11), 1189-1202.

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. (2012). **Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination**. In: CATALA, A (ed). Lipid peroxidation. InTech, Rijeka, 3-30.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, R. S.; MACHADO, E. C.; MACHADO, D. F. S. P.; MAGALHÃES FILHO, J. R.; LANDELL, M. G. A. (2013). Revealing drought-resistance and productive patterns in sugarcane genotypes by evaluating both physiological responses and stalk yield. **Experimental agriculture**, 49(2), 212-224.

del RIO, L. A.; CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; PALMA, J. M.; GOMEZ, M.; BARROSO, J. B. (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, 53, 1255–1272.

ROGIERS S.Y., GREER D.H., HUTTON R.J., CLARKE S.J. (2011) Transpiration efficiency of the grapevine cv. Semillon is tied to VPD in warm climates. **Annals of Applied Biology**, 158, 106–114.

SALES, C. R.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, R. S.; FONTENELE, A. V.; MACHADO, E. C.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, R. V. (2015). Photosynthetic and antioxidant responses to drought during sugarcane ripening. **Photosynthetica**, 53, 547–554. <http://doi.org/10.1007/s11099-015-0146-x>

SAIRAM R.K., RAO K.V., SRIVASTAVA G.C. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. **Plant Science**, 163, 1037–1046.

SANDHU, S. S.; BASTOS, C. R.; AZINI, L. E.; NETO, A. T.; COLOMBO, C. (2002) RAPD analysis of herbicide-resistant Brazilian rice lines produced via mutagenesis. **Genet. Mol. Res**, 1(4), 359–370.

dos SANTOS, C. M., & de ALMEIDA SILVA, M. (2015). Physiological and biochemical responses of sugarcane to oxidative stress induced by water deficit and paraquat. **Acta Physiologiae Plantarum**, 37(8), 1-14.

SARLIKIOTI V., DRIEVER S.M., MARCELIS L. F. M. (2010) Photo- chemical reflectance index as a mean of monitoring early water stress. **Annals of Applied Biology**, 157, 81–89.

SCANDALIOS, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38(7), 995-1014.

SHAO, H-B.; CHEN, X-Y.; CHU, L-Y.; ZHAO, X-N.; WU, G.; YUAN, Y-B.; ZHAO, C-X.; HU, Z-M. (2006). Investigation on the relationship of proline with wheat antidrought under soil water deficits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 53, 113–119.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/217037>

SILVA, M. A.; JOHN, J. L.; DA SILVA J. A. G.; SANTOS, C. M.; SHARMA, V. (2014). Relationships between physiological traits and productivity of sugarcane in response to water deficit. **The Journal of Agricultural Science**, 152(1), 104–118.

SINGH P. N., SHUKLA S. K., BHATNAGAR V. K. (2007) Optimizing soil moisture regime to increase water use efficiency of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid complex) in subtropical India. **Agricultural Water Management**, 90, 95–100.

SMIRNOFF, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, 125(1), 27-58.

SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G. B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 4, p. 94-113.

SOLOMON, S.; PLATTNER, G. K.; KNUTT, R.; FRIEDLINGSTEIN, P. (2009). Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, 16(6), 1704-1709.

SONG Y., BIRCH C.J., HANAN J. (2010) Maize canopy production under contrasted water regimes. **Annals of Applied Biology**, 157, 111–123.

SONG, N. H.; LE YIN, X.; CHEN, G. F.; YANG, H. (2007). Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils. **Chemosphere**, 68(9), 1779-1787.

SNA – Sociedade Nacional da Agricultura. **MEIOSI**: sistema antigo volta a ser opção para aumentar produtividade da cana. Rio de Janeiro: SNA, 2016. Disponível em: < <https://www.sna.agr.br/meiosi-sistema-antigo-volta-a-ser-opcao-para-aumentar-produtividade-da-cana/>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

SRIVALLI, B.; SHARMA, G.; KHANNA-CHOPRA, R. (2003). Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. **Physiologia Plantarum**, 119, 503–512.

SUGIHARTO, B. (2004). Biochemical and molecular studies on sucrose-phosphate synthase and drought inducible-protein in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Journal ILMU DASAR*, 5(1), 62-67.

SUZUKI, N, RIVERO, R.M., SHULAEV, V., BLUMWALD, E., MITTLER, R., (2014). Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, 203(1), 32–43.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2013). Fisiologia vegetal. 5.ed. Porto Alegre: Artemed, 954p.

TAVARINI, S.; GIL, M. I.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; BUENDIA, B.; REMORINI, D.; MASSAI, R.; DEGL'INNOCENTI, E.; GUIDI, L. (2011) Effects of water stress and root stocks on fruit phenolic composition and physical/chemical quality in Suncrest peach. **Annals of Applied Biology**, 158, 226-233.

TAUSZ, M.; SIRCELJ, H.; GRILL, D. (2004). The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? **Journal of Experimental Botany**, 55, 1955–1962.

TEOTIA, S., SINGH, D. (2014). **Oxidative stress in plants and its management**. In *Approaches to Plant Stress and their Management* (pp. 227-253). Springer, New Delhi.

TRIPATHY, B. C.; MOHAPATRA, A.; GUPTA, I. (2007). Impairment of the photosynthetic apparatus by oxidative stress induced by photosensitization reaction of protoporphyrin IX. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, 1767(6), 860–868.

UNIÃO DAS INDUSTRIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (UNICA). Fotografia do Setor Sucroenergético. Abril de 2018. Disponível: <<http://www.unica.com.br/documentos/documentos/cana-de-acucar/>>. Acesso: 7 jan 2019.

VILELA, R. D.; BEZERRA, B. K. L.; FROEHLICH, A.; ENDRES, L. (2017). Antioxidant system is essential to increase drought tolerance of sugarcane. **Annals of Applied Biology**, 171(3), 451-463.

WAHID, A.; CLOSE, T. J. (2007). Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. **Biologia Plantarum**, 51, 104–109.

WANG, W., LU, J., REN, T., LI, X., SU, W., LU, M. (2012). Evaluating regional mean optimal nitrogen rates in combination with indigenous nitrogen supply for rice production. **Field Crops Research**, 137, 37-48.

WU, G. L.; CUI, J.; TAO, L.; YANG, H. (2010). Fluroxypyr triggers oxidative damage by producing superoxide and hydrogen peroxide in rice (*Oryza sativa*). **Ecotoxicology**, 19(1), 124-132.

YOU, J., CHAN, Z. (2015). ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. **Frontiers in Plant Science**. 6, 1092. doi: 10.3389/fpls.2015.01092

XAVIER, M.A.; LANDELL, M.G.A.; TEIXEIRA, L.G., RODRIGUES, P.A.; NASSIF, G.L.; MINE, K. (2014). Sistema de multiplicação MPB e integração com o setor sucroenergético. **O Agrônômico**, 64-66, 32- 41.

ZABALZA, A.; GASTON, S.; SANDALIO, L. M.; RÍO, L.A.; ROYUELA, M. (2007). Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. **Environmental and Experimental Botany**, 59(2), 150–159.

ZHANG, J. J.; LU, Y. C.; ZHANG, J. J.; TAN, L. R.; YANG, H. (2014). Accumulation and toxicological response of atrazine in rice crop. **Ecotoxicology and environmental safety**, 102(1), 105-112.

ZOBIOLE, L. H. S.; OLIVEIRA, J. R. R. S.; KREMER, R. J.; CONSTANTIN, J.; BONATO, C. M.; MUNIZ, A. S. (2010). Water use efficiency and photosynthesis of glyphosateresistant soybean as affected by glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 97(3), 182–193.

ZOUA, J.; LIUA, C.; LIUB, A.; ZOUB, D.; CHENA, X. (2012). Overexpression of *OsHsp17.0* and *OsHsp23.7* enhances drought and salt tolerance in rice. **Journal of Plant Physiology**, 169, 628–635.