

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CECA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ROMEL DUARTE VILELA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE DUAS VARIEDADES DE CANA-
DE-AÇÚCAR SOB ESTRESSE HÍDRICO**

RIO LARGO - AL

2011

ROMEL DUARTE VILELA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE DUAS VARIEDADES DE CANA-
DE-AÇÚCAR SOB ESTRESSE HÍDRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em AGRONOMIA, área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Laurício Endres

RIO LARGO - AL

2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

V699a Vilela, Romel Duarte.
Alterações fisiológicas e bioquímicas de duas variedades de cana-de-açúcar sob estresse hídrico / Romel Duarte Vilela. – 2011.
60 f. : tabs., graf.

Orientador: Laurício Endres.
Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2011.

Bibliografia: f. 50-59.
Apêndices: f. 58-60.

1. Cana-de-açúcar – Cultivo. 2. *Saccharum* spp – Tolerância à seca. 4. Fluorescência da clorofila *a*. 5. Açúcares solúveis. 6. Resposta antioxidativa. I. Título.

CDU: 633.61: 581.1

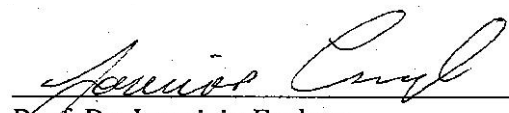
TERMO DE APROVAÇÃO

ROMEL DUARTE VILELA

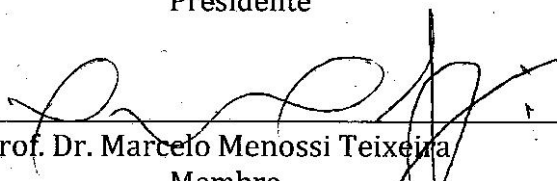
ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE DUAS VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB ESTRESSE HÍDRICO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 27 de junho de 2011.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Lauricio Endres
Presidente



Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira
Membro



Prof. Dr. José Vieira Silva
Membro



Prof. Dr. Joerfeson Reis Martins
Membro

Aos meus pais, Ronaldo Vilela Rodrigues (*in memoriam*) e Tereza Cristina Duarte Vilela, por todo amor e carinho durante toda minha vida, fundamental na construção da base para que eu chegasse até esse momento e para que ainda continue na longa caminhada da vida...

Aos meus irmãos, Rildo e Rômulo Vilela, meus grandes amigos, pela força e presença sempre constante...

Ao companheirismo, carinho, amor, dedicação e incentivo de minha noiva, Gláucia Marinho, durante esses mais de 3 anos de cumplicidade em todos os momentos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Deus todo poderoso, por me proporcionar a vida,

A Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de fazer o curso de mestrado e ser minha segunda casa,

Ao professor Laurício Endres, pela orientação e ensinamentos, muito importantes na minha formação,

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFAL, Eduardo, Breno, Simério, Sihélio, Débora, Laís, Poliana, Regina, Janaína, Israel, Felipe, Freds, Benigno, Manoel Vitor, Manoel Messias, Renan, Pedro, Tibola, Valtair, Cristiano, Tadeu, Freds, Diogo, Antonio e Weverton, pelos momentos de descontração e por toda a ajuda na realização deste trabalho,

A todos os colegas do mestrado, Adriano, Wellington, Carlos Jorge, Tatiana, Vanessa, Valdelane, Clênio, Ana Cristina, Wagner e os que não foram citados, por compartilhar os momentos de luta durante as disciplinas,

Ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar - PMGCA da UFAL, pela concessão dos rebolos de cana para a realização da pesquisa,

Ao professor Marcelo Loureiro da Universidade Federal de Viçosa - UFV, por ter me recebido no Laboratório de Fisiologia Molecular Plantas da UFV e cedido tempo e espaço para a realização de parte deste estudo,

Aos colegas, Flancer, Danilo, Caroline, Eduardo, Bárbara, Solange e aos demais da UFV, pelos ensinamentos e pela ajuda nas análises,

Aos técnicos administrativos da UFAL, em especial Geraldo, Marcos, Michele e Rinaldo pelo apoio durante o curso de mestrado,

Aos professores da Pós-Graduação em Agronomia, Vilma Marques, Gilson Moura, Paulo Vanderlei, Mauro Wagner, pelos ensinamentos durante as disciplinas,

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ, pela bolsa concedida durante o curso de mestrado.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo, caracterizar fisiologicamente as respostas à seca de duas variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), afim de contribuir com informações para o estudo dos processos fisiológicos envolvidos na adaptação das plantas ao déficit hídrico. Para tanto, instalou-se um experimento em delineamento inteiramente ao acaso, em casa de vegetação no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, localizado no município de Rio Largo - AL (9° 28' S, 35° 49' W, a 127 m de altitude), onde as variedades RB855536 e RB867515 com respostas contrastantes à seca, foram submetidas a dois, quatro, seis e oito dias de estresse hídrico e posterior reidratação. As variáveis fisiológicas e bioquímicas analisadas foram, potencial hídrico foliar (ψ_w), potencial de solutos (ψ_s), fluorescência da clorofila *a* (F_v/F_m e Φ_{PSII}), açúcares solúveis (glicose, frutose, sacarose) e amido, e atividade de enzimas antioxidantes, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX). O estresse hídrico ocasionou em redução significativa no ψ_w e ψ_s nas duas variedades estudadas, as quais não suportaram um período de seca superior a seis dias. Após a reidratação, as variedades pesquisadas, mostraram capacidade de restabelecimento do ψ_w e ψ_s . A RB867515 teve maior decréscimo no ψ_w e ψ_s em relação a RB855536. Ambas as variedades pesquisadas apresentaram fotoinibição crônica e dinâmica gradativa com o aumento do tempo de estresse hídrico além de forte redução na eficiência quântica potencial (F_v/F_m) e efetiva (Φ_{PSII}). A variedade RB867515 mostrou maior capacidade de recuperação do Φ_{PSII} e de reparação aos efeitos da fotoinibição. O déficit hídrico causou a diminuição dos teores de sacarose e amido nas duas variedades, com maior nível de redução de sacarose e amido em relação ao controle, apresentado pela RB867515. Incrementos nos níveis de glicose e frutose também foram observados nas duas variedades sob restrição hídrica. As mudanças nos níveis de açúcares, indicam que a elevação nos níveis de glicose e frutose se deu através da degradação de sacarose e amido, provavelmente, no sentido de realizar o ajuste osmótico. A variedade RB867515 mostrou maior atividade de CAT e APX, em relação a RB855536, além de atividade crescente da SOD com aumento do tempo de seca. No presente trabalho, a variedade RB867515 revelou maior eficiência na ativação de mecanismos de tolerância ao estresse hídrico.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. Tolerância à seca. Fluorescência da clorofila *a*. Açúcares solúveis. Resposta antioxidativa.

ABSTRACT

This study aimed to characterize the physiological responses to drought of two sugarcane (*Saccharum* spp.) varieties in order to contribute information to study the physiological processes involved in plant adaptation to drought. To this end, an experiment was installed in a completely randomized design in a greenhouse at the Laboratory of Plant Physiology of the Center for Agrarian Sciences, Federal University of Alagoas, located in Rio Largo - AL (9° 28' S, 35° 49' W, with 127 m of altitude), and where the varieties RB855536 and RB867515 with contrasting responses to drought, were subjected to two, four, six and eight days of water stress and rehydration. The physiological and biochemical variables were analyzed, leaf water potential (ψ_w), solute potential (ψ_s), chlorophyll fluorescence (F_v/F_m and Φ_{PSII}), soluble sugars (glucose, fructose, sucrose) and starch and antioxidant enzymes, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX). Water stress resulted in significant reduction in the ψ_w and ψ_s in two varieties studied, which did not support a drought of more than six days. After rehydration, the varieties studied, showed the ability to restore in the ψ_w and ψ_s . The RB867515 had greater reductions in the ψ_w and ψ_s in relation to RB855536. Both varieties studied presented chronic and dynamic photoinhibition gradually with the increase in time of drought stress and a strong reduction in the quantum potential efficiency (F_v/F_m) and effective (Φ_{PSII}). The variety RB867515 showed higher capacity of recovery of the Φ_{PSII} and repair the effects of photoinhibition. The drought caused the decrease in the levels of sucrose and starch in two varieties, with greater reduction of recovery sucrose and starch compared to control, presented by RB867515. Increases in the levels of glucose and fructose were also observed in both varieties under water restriction. Changes in levels of sugars, indicating that rising levels of glucose and fructose occurred through the degradation of sucrose and starch, likely to hold the osmotic adjustment. The variety RB867515 showed higher activity of CAT and APX, in relation to RB855536, and SOD activity increased with increasing time of drought. In this work, the variety RB867515 showed greater efficiency in the activation of mechanisms of tolerance to drought stress.

Keywords: *Saccharum* spp. Drought tolerance. Chlorophyll fluorescence, Soluble sugars. Antioxidative response.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Ciclo da sacarose em cana-de-açúcar e enzimas e metabólitos envolvidos. (SPS = sacarose fosfato sintase, SS = sacarose sintase, SAI = invertase ácida solúvel, NI = invertase neutra, PGI = fosfoglicoisomerase, UDPG-PPase = UDPglicose pirofosforilase 22
- Figura 2 Dados diários de temperatura mínima (T Min), média (T Med), máxima (T Max) (A), radiação fotossinteticamente ativa (B), registradas dentro da casa de vegetação durante o período experimental, e dados diários de (T Min, T Med e T Max) (C) e (PAR) (D) observadas durante o período de coleta das amostras..... 25
- Figura 3 Vista parcial do stand experimental com as variedades RB855536 e RB867515, cultivadas em casa-de-vegetação aos 56 dias após o plantio 26
- Figura 4 Teor de umidade do solo, cultivado com duas variedades de cana-de-açúcar submetidas a estresse hídrico e reidratação, em casa de vegetação aos 121 após o plantio 32
- Figura 5 Potencial hídrico foliar ψ_w antemanhã - 4h (A e B) e potencial de solutos ψ_s antemanhã - 4h (C e D) de duas variedades de cana-de-açúcar RB855536 (A e C) e RB867515 (B e D) submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio..... 33
- Figura 6 Máximo rendimento quântico do PSII (F_v/F_m) - 4h (A e B) e 11h (C e D) e rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) (E e F) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 (A, C e E) e RB867515 (B, D e F) submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio. 38
- Figura 7 Teores de amido (A e B), sacarose (C e D), glicose (E e F), e frutose (G e H) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 (A, C, E e G) e RB867515 (B, D, F e H) submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio..... 42
- Figura 8 Atividade de enzimas antioxidantes: catalase (A e B), ascorbato peroxidase (C e D) e superóxido dismutase (E e F) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 (A, C e E) e RB867515 (B, D e F) submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio 45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Máximo rendimento quântico do PSII (F_v/F_m) - 4h e 11h e rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio..... 39
- Tabela 2 Teores de glicose, frutose, sacarose e amido das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio..... 43
- Tabela 3 Atividade de enzimas antioxidantes: catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio 46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 A Cana-de-açúcar	13
2.2 O estresse hídrico.....	14
2.3 Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes	16
2.3.1 Superóxido dismutase (SOD)	17
2.3.2 Ascorbato peroxidase (APX).....	18
2.3.3 Catalase (CAT).....	18
2.4 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	19
2.5 Metabolismo de carboidratos em plantas.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Material vegetal	24
3.2 Condições de cultivo	24
3.3 Delineamento experimental e análise estatística.....	26
3.4 Análises fisiológicas	26
3.4.1 Avaliação da eficiência fotoquímica	26
3.4.2 Potencial hídrico foliar (ψ_w).....	27
3.4.3 Potencial de solutos (ψ_s).....	27
3.5 Coleta do material vegetal	27
3.6 Avaliação de carboidratos.....	27
3.6.1 Sacarose, glicose, frutose e amido.....	27
3.7 Enzimas antioxidantes.....	29
3.7.1 Catalase (CAT).....	29
3.7.2 Superóxido dismutase (SOD)	29

3.7.3 Ascorbato peroxidase (APX).....	30
3.7.4 Proteínas solúveis	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Condições meteorológicas e teor de umidade do solo.....	32
4.2 Potencial hídrico e potencial de solutos	32
4.3 Avaliação da eficiência fotoquímica	36
4.4 Avaliação de carboidratos.....	40
4.5 Atividade de enzimas antioxidantes.....	44
5 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICES	58
Apêndice A Dados diários de déficit de pressão de vapor (DPV) registradas dentro da casa de vegetação durante o período experimental.....	58
Apêndice B Curva característica de retenção de água no solo, utilizado no cultivo das variedades RB855536 e RB867515	59
Apêndice C Análise de variância (valores de F) para máximo rendimento quântico do PSII (F_v/F_m) - 4h e 11h e rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio	59
Apêndice D Análise de variância (valores de F) para teores de glicose, frutose, sacarose e amido das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio.....	60
Apêndice E Análise de variância (valores de F) para enzimas antioxidantes catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio	60
Apêndice F Análise química do solo, utilizado como substrato para o cultivo das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas ao estresse hídrico e reidratação	60

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) possui grande importância econômica devido a sua utilização como matéria prima agroindustrial na produção de açúcar e álcool. O Brasil é o maior produtor mundial de cana, e tem se destacado devido ao avanço no desenvolvimento de tecnologias para a produção de etanol, produto reconhecido atualmente por seus benefícios ao meio ambiente, sendo fonte alternativa viável aos combustíveis fósseis. Com uma demanda crescente, o setor sucroenergético deverá ampliar a capacidade de produção tanto pelo aumento de produtividade decorrente do fornecimento de variedades melhoradas, bem como pela expansão da área plantada com cana-de-açúcar (APTA, 2007). Planta de metabolismo C_4 , a cana encontra em regiões de clima tropical como o Brasil, condições ideais para o seu desenvolvimento. Contudo, a escassez de água em períodos sazonais, afeta o seu crescimento e desenvolvimento (ENDRES et al. 2010).

A deficiência hídrica é um dos fatores mais limitantes para o crescimento, desenvolvimento e produtividade das culturas agrícolas. O estresse hídrico, desencadeia um conjunto de respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas, que desenvolvem mecanismos de adaptação às circunstâncias ambientais limitantes, variando de acordo com a intensidade, com o tempo de estresse, com a interação com outros tipos de estresse, com o estágio de desenvolvimento e o genótipo (BRAY, 1997; MENESES et al. 2006). A síntese de moléculas osmoprotetoras, proteínas de defesa entre outras envolvidas no transporte de água também são características de um metabolismo celular cuja disponibilidade de água é limitada (RODRIGUES, 2008).

Estudos em diferentes culturas como café, soja, feijão, arroz (DA MATTA et al. 1997; RIBAS-CARBO et al. 2005; MIYASHITA et al. 2005; SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007), têm-se buscado entender as respostas de adaptação das plantas à seca. As perdas de produtividade ocasionadas pela escassez de água, ultrapassam 80% em diversas culturas agrícolas. Na cana-de-açúcar, os danos causados pela deficiência hídrica são mais expressivos, principalmente, no estágio inicial do desenvolvimento da planta. Somado a isto, observa-se diminuição na produtividade e mortalidade das soqueiras. As características correlacionadas com a tolerância à seca são indicadores adequados para a seleção de genótipos tolerantes em programas de melhoramento genético, com o objetivo de reduzir o impacto do déficit hídrico sobre o rendimento das culturas (SILVA et al. 2008). Desta forma, a busca para se entender as diferentes respostas das plantas aos estresses ambientais, tem levado a estudos de diversas áreas das ciências agrônômicas e biológicas, na busca pelo

conhecimento dos efeitos da deficiência hídrica sobre o metabolismo das plantas, e a identificação de características morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares, observadas durante o processo da adaptação das plantas aos estresses tem auxiliado na produção de variedades mais tolerantes (MULLET & WHITSITT, 1996)

Apesar da necessidade do desenvolvimento de genótipos mais tolerantes a déficits hídricos, o melhoramento convencional não obteve até o momento variedades com alta tolerância. Em contrapartida, plantas geneticamente modificadas com tolerância a seca, têm sido obtidas em várias culturas e, portanto a engenharia genética se apresenta teoricamente como uma opção viável para o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar tolerantes a estresse hídrico (APTA, 2007).

A comparação de genótipos tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico pode mostrar diferenças nas respostas fisiológicas e bioquímicas, e assim auxiliar a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca em plantas.

O presente estudo teve o objetivo de caracterizar fisiologicamente a respostas à seca de duas variedades de cana-de-açúcar tolerante e sensível ao estresse hídrico, afim de contribuir com informações que possam ser importantes no estudo dos processos fisiológicos envolvidos na tolerância das plantas ao estresse hídrico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cana-de-açúcar

De origem asiática, as primeiras mudas de cana-de-açúcar chegaram ao Brasil no início de sua colonização. Inicialmente no Nordeste brasileiro o cultivo da cana se multiplicou. Até o século XVII, o Brasil era o maior produtor e fornecedor mundial de açúcar (PRADO JR, 1976).

Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e álcool derivados da cana. Até dezembro de 2010 a previsão para a produção de cana-de-açúcar no país correspondeu a 624.991 mil toneladas, distribuídos em 8.033,6 mil hectares, com uma produtividade média estimada em 77.798 kg/hectare com tendência ascendente para a próxima safra (CONAB, 2011).

A sacarose da cana hoje é usada para açúcar (45%) e etanol (55%), mas há importantes atividades iniciando diversificação. Dos resíduos, 50% são usados com baixa eficiência para energia; e mais 25% (palha) são recuperáveis a custo compatível com usos energéticos. O etanol a partir da cana-de-açúcar tem ganho grande importância mundial por ser fonte de energia renovável, auxiliando desta forma, a redução da poluição pela diminuição da utilização de combustíveis fósseis. Graças também, a co-geração de energia decorrente do aproveitamento da palha e do bagaço que sobram nas moendas utilizadas também como energia no processo de produção de açúcar e álcool pelas usinas de cana. Além disso, o etanol obtido da cana-de-açúcar garante mais energia para uso final por unidade energética gasta em obtê-la do que qualquer outra fonte renovável atual (UNICA, 2005).

Planta monocotiledônea, alógama e perene, pertencente à Família Poaceae, gênero *Saccharum* spp. (DEER, 1911), esta gramínea, perfilha de maneira abundante, na fase inicial do desenvolvimento. Quando se estabelece como cultura, o autosombreamento induz a inibição do perfilhamento, culminando na aceleração do colmo principal (RODRIGUES, 1995).

O metabolismo fotossintético da cana é do tipo C₄, o que permite que ela seja muito bem adaptada à produção de biomassa em regiões tropicais. No entanto, isso depende de condições ambientais favoráveis para mostrar seu potencial máximo de produção, entre eles, a disponibilidade adequada de água durante todo o ciclo vegetativo (ENDRES et al. 2010).

Uma situação de déficit hídrico durante a fase vegetativa destas plantas, diminui a biomassa e consequentemente o crescimento dos colmos, reduzindo drasticamente a produtividade. É sabido que existem variações nas respostas de genótipos de cana em relação

ao estresse hídrico (INMAN-BAMBER & SMITH 2005). Muitos pesquisadores têm investigado a cana em condições de deficiência hídrica, no sentido de desvendar as alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares apresentadas sob condições de seca severa (HEMEPRABHA et al. 2004; ZHANG et al. 2006; GRAÇA et al. 2010).

Assim, um dos principais objetivos das pesquisas com cana-de-açúcar é a obtenção de cultivares tolerantes ao déficit hídrico, o que poderá se configurar num importante cenário de expansão do cultivo, visto que grande parte das terras disponíveis para cultivo de cana está localizada em regiões sujeitas à seca (PAPINI-TERZI et al. 2009).

2.2 O estresse hídrico

As plantas são muitas vezes sujeitas a períodos de déficit hídrico durante o seu ciclo de vida. A frequência de tais fenômenos tende a aumentar no futuro mesmo fora das regiões áridas e semi-áridas. As respostas das plantas à escassez de água são complexas, envolvendo mudanças adaptativas de natureza morfológicas e fisiológicas. Sob condições de campo estas respostas podem ser sinérgicas ou antagonicamente modificadas pela sobreposição de outras tensões. Essa complexidade é observada em espécies lenhosas e herbáceas na maior parte dos ecossistemas, com estratégias que vão desde o escape a seca, à resistência ao estresse (CHAVES et al. 2002).

A capacidade da planta em responder e sobreviver ao déficit hídrico depende dos mecanismos expressados pela planta inteira. As respostas ao déficit hídrico pode ocorrer dentro de poucos segundos, como uma mudança no estado de fosforilação de uma proteína, ou dentro de minutos e/ou horas, como uma mudança na expressão gênica (BRAY, 1997), variando de acordo com a espécie, genótipo, duração e gravidade do estresse, da idade e estágio de desenvolvimento da planta (MULLET & WHITSITT, 1996).

De acordo com Taiz (2009), o déficit hídrico pode ser definido como todo o conteúdo de água de um tecido ou célula situado abaixo do conteúdo de água mais alto exibido no estado de maior hidratação.

Para Larcher (2004), durante o estresse, o organismo passa por uma sucessão de fases. A fase *percepção* é o início do distúrbio, ocorrendo perda da estabilidade de proteínas e biomembranas, e inicia como uma *resposta ao estresse*. Já na fase de *recuperação*, ocorrem processos de reparo, como a síntese protéica e “de novo” de substâncias de proteção, levando a fase de *tolerância*, caracterizada pelo aumento na resistência por parte do organismo. Por fim uma melhora na estabilidade ocorre mesmo sob estresse contínuo, configurando na fase

de *adaptação*, porém se o estresse é muito demorado e a intensidade aumenta, um estado de exaustão pode ocorrer na *fase final*, com a morte da planta.

Em adição, Hoekstra et al. (2001) distingue a tolerância à desidratação de duas formas, tolerância à seca, considerada como a tolerância a desidratação moderada até um teor de umidade, no qual não há água presente na massa citoplasmática [$\sim 23\%$ de água base de peso fresco ou $\sim 0,3$ (g de H_2O) (g massa seca⁻¹)], e a tolerância à dessecação, que se refere a tolerância à desidratação quando o reservatório de hidratação das moléculas é gradualmente perdido, o que também inclui a capacidade das células de manterem-se hidratadas.

A primeira reação ao déficit hídrico é a diminuição da condutância estômática, minimizando a perda de água pela transpiração. No entanto, o fechamento dos estômatos têm consequências complexas, exigindo ajustes a nível de fotossíntese e respiração, nutrientes e fluxo de água, além da alteração na distribuição de carbono e nitrogênio (BOHNERT & JENSEN, 1996).

Outro efeito bastante visível da restrição hídrica nas plantas é a redução no crescimento, causado principalmente pela inibição do alongamento de haste e folhas quando o potencial hídrico é reduzido a um ponto crítico, apresentando variação de respostas em diferentes espécies (HSIAO & XU, 2000). No entanto, os órgãos que não estão em crescimento, como folhas maduras, são também fortemente afetados por uma inibição das trocas gasosas, fotossíntese e modificações metabólicas, freqüentemente associada à osmorregulação. Em adição a isto, o fechamento estomático parece ser a principal causa da diminuição na taxa fotossintética, porém o próprio aparato fotossintético tem se mostrado muito resistente à desidratação, não só em plantas C_3 , mas também em C_4 (PELLESCHI et al. 1997).

O primeiro passo na regulação da resposta ao déficit hídrico é o reconhecimento do estresse. A perda de água é percebida na célula, provocando a transdução do sinal celular. Desta forma, o estresse físico pode ser convertido em uma resposta bioquímica (BRAY, 1997).

A adaptação de plantas a estresses ambientais é dependente da ativação de cascatas de redes moleculares envolvidas na percepção, transdução de sinal e expressão de genes e metabólitos específicos relacionados ao estresse (VINOCUR & ALTMAN, 2005).

Smit & Singles (2005) apontam que existe uma variação em genótipos de cana-de-açúcar em relação ao estresse hídrico e que faltam informações para a maioria das cultivares, e que existe a necessidade de uma melhor compreensão das respostas de cana à seca. Inman-

Bamber & Smit (2005), verificaram mecanismos distintos de resposta a seca, com destaque para o controle estomático, enrolamento foliar, tamanho e distribuição do sistema radicular.

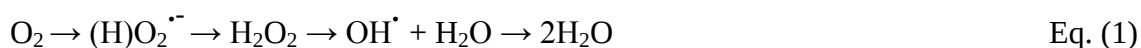
2.3 Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes

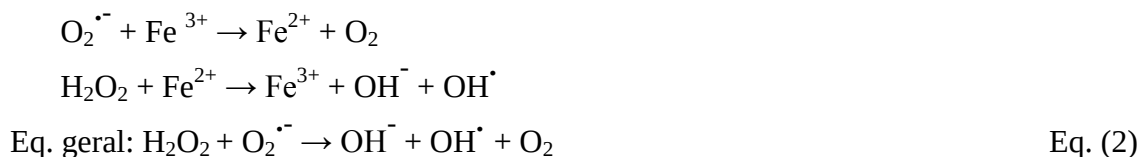
A evolução dos processos metabólicos aeróbios tais como a respiração e a fotossíntese, inevitavelmente, leva à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. Uma característica comum entre os diferentes tipos EROs é a sua capacidade de causar danos oxidativos a proteínas, DNA e lipídios. Essas propriedades citotóxicas de EROs explicam a evolução de matrizes complexas de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de desintoxicação em plantas (APEL & HIRT, 2004; PITZSCHKE et al. 2006).

Plantas e outros organismos aeróbios requerem oxigênio para a produção eficiente de energia. Durante a redução do O_2 a H_2O , espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas (ALLEN, 1995). Inicialmente a reação em cadeia necessita da entrada de energia, onde as etapas subseqüentes são exotérmicas e pode ocorrer espontaneamente, catalisada ou não. A aceitação de energia em excesso, reduz o O_2 através de quatro etapas (BREUSEGEM et al., 2001) (Eq. 1), levando a formação de oxigênio singlete (1O_2), uma molécula altamente reativa quando comparada com o (O_2) (MITTLER, 2002; APEL & HIRT, 2004).

O 1O_2 , pode transferir sua energia de excitação para outras moléculas biológicas ou reagir com elas, formando assim endoperóxidos ou hidroperoxidos. O 1O_2 é moderadamente reativo, de curta duração, com uma meia-vida de 2-4 μs , além disso, não atravessam membranas biológicas, sendo dismutado facilmente a H_2O_2 (DAT et al. 2000).

Já os radicais hidroperoxil ($OH^\bullet$), são formados a partir de $O_2^{\bullet -}$ pela protonação em soluções aquosas, podendo atravessar membranas biológicas e subtrair os átomos de hidrogênio a partir de ácidos graxos polinsaturados e hidroperoxidos de lipídios. Já o peróxido de hidrogênio, H_2O_2 é uma molécula moderadamente reativa, e de relativa vida longa, podendo difundir-se a algumas distâncias a partir de seu local de produção. A toxicidade do H_2O_2 é reforçada pela presença de catalisadores metálicos pela reação de Haber-Weiss ou Fenton (VRANOVÁ & BREUSEGEM, 2002) (Eq. 2). O $OH^\bullet$ pode reagir potencialmente com moléculas biológicas e sua produção em excesso pode levar a morte celular (BREUSEGEM et al. 2001).





Como resposta, as plantas desenvolveram um complexo sistema antioxidante para se protegerem contra danos oxidativos, que inclui enzimas e substratos moleculares que limpam espécies radicais e não radicais de oxigênio (BILGIN, 2010).

Os principais mecanismos de eliminação de EROs de plantas incluem superóxido dismutase SOD (EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidase APX (EC 1.11.1.11) e catalase CAT (EC 1.11.1.6). O equilíbrio entre as atividades da SOD, APX e CAT nas células é fundamental para a determinação do nível de estado estacionário (steady-state) de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (APEL & HIRT, 2004)

A SOD é encontrada em quase todos os compartimentos celulares, no ciclo da água nos cloroplastos, no ciclo da ascorbato-glutationa nos cloroplastos, nas mitocôndrias, citosol e peroxissomos. Por outro lado, a CAT está presente somente nos peroxissomos, sendo indispensável na desintoxicação quando níveis elevados de EROs são produzidos durante o estresse (MITTLER, 2002). A APX participa do ciclo da ascorbato-glutationa encontrada na maioria dos compartimentos celulares. A alta afinidade da APX por H_2O_2 , sugere que esta desempenhe um papel crucial no controle dos níveis de EROs (SHIGEOKA et al. 2002).

O ciclo da água em água, também é um mecanismo que realiza a eliminação de EROs em cloroplastos, dissipando efetivamente a energia de excitação em excesso sob condições de estresse, realizando uma proteção contra a fotoinibição (ASADA, 1999).

A habilidade das plantas para eliminar radicais de oxigênio em condições de estresse hídrico, é provavelmente, o requisito mais crítico para a tolerância das mesmas a tais condições (BOHNERT & JENSEN, 1996).

2.3.1 Superóxido dismutase (SOD)

A família das superóxido dismutases (EC 1.15.1.1), é composta por metaloproteínas que catalisam a dismutação dos radicais livres superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) para o O_2 e H_2O_2 . Constitui a primeira linha de defesa contra as EROs, sendo produzido em qualquer local onde a cadeia de transporte de elétrons está presente e, portanto, sua ativação pode ocorrer em qualquer compartimento celular, incluindo mitocôndrias, cloroplastos, microssomos, glioxissomos,

apoplastos e no citosol. Como os fosfolipídeos de membrana são impermeáveis a moléculas carregadas de ($O_2^{\cdot-}$), a presença da SOD é crucial na remoção de ($O_2^{\cdot-}$) e nos compartimentos onde são formados (GIANNOPOLITS & RIES, 1977).

A reação da SOD é a seguinte:



O peróxido de hidrogênio produzido é em seguida desintoxicado pela catalase ou peroxidase (CHEN & PAN, 1996).

2.3.2 Ascorbato peroxidase (APX)

A APX (EC 1.11.1.11) é uma enzima específica na eliminação do peróxido de hidrogênio em plantas, catalisa a oxidação dos componentes celulares por peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos, sendo indispensável na proteção dos cloroplastos e outros componentes de células contra danos provocados pelo peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila produzidos (ASADA, 1992).



De acordo com Shigeoka et al. (2002) o fato de o ascorbato (AsA) ser um redutor de H_2O_2 nos cloroplastos, juntamente com a ocorrência de APX nas plantas, nos mostra que o AsA é um substrato muito importante na desintoxicação de H_2O_2 em folhas sob estresse. A APX utiliza AsA como doador de elétrons específico para reduzir H_2O_2 a água, com a geração concomitante de monodehidroascorbato (MDAsA), um oxidante univalente do AsA. MDAsA é diretamente reduzido a AsA pela ação da NAD(P)H-dependente MDAsA redutase. A DAsA redutase utiliza glutathione (GSH) para sua redução e assim regenerar o AsA. A GSH oxidada é então regenerada pela GSH redutase, utilizando redutores equivalentes de NAD(P)H. Assim, APX em combinação com as funções efetivas do ciclo de AsA-GSH evitam a acumulação de H_2O_2 a níveis tóxicos em organismos fotossintéticos.

2.3.3 Catalase (CAT)

A catalase ($H_2O_2:H_2O_2$ oxidoreductase), (EC 1.11.1.6) foi a primeira enzima antioxidante a ser descoberta e caracterizada. É uma proteína tetramérica porfirina de ferro, que catalisa a dismutação do H_2O_2 em água e oxigênio. Foi a primeira enzima antioxidante

descoberta e caracterizada. Nenhum organismo multicelular foi encontrado que não possua alguma atividade da catalase (McCLUNG, 1997). A reação de catalase típica é a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 para água e O_2 . A Eq. 5 mostra o esquema simplificado do mecanismo catalítico da catalase (MHAMDI et al. 2010).



A CAT representa um dos principais mecanismos enzimáticos empregado por organismos aeróbicos para decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta enzima é particularmente abundante nos glioxissomos de plântulas, onde ela destrói o H_2O_2 gerado pela oxidação da flavina, e nos peroxissomos de folhas verdes, destruindo também o H_2O_2 decorrente da oxidação do glicolato fotorrespiratório (HAVIR & McHALE, 1987). A CAT é uma enzima notadamente distinta das outras, pois não necessita de um redutor para catalisar uma reação de dismutação. Juntamente com APX, a catalase distingue-se de outros peróxidos-metabolizadores por sua alta especificidade para H_2O_2 , contudo, possui fraca atividade contra os peróxidos orgânicos (MHAMDI et al. 2010).

2.4 Fluorescência da clorofila *a*

As moléculas de clorofila absorvem a energia luminosa (fótons) alterando temporariamente suas configurações eletrônicas. Os pigmentos fotossintéticos passam do estado basal (Chl *a*) para o estado excitado (nível de energia mais alto), denominado de singlet1 (Chl *a**). O estado excitado é muito instável e de vida muito curta ($\approx 10^{-8}$ s), de forma que essa energia proveniente da luz e captada pela clorofila é rapidamente dissipada através de três vias de dissipação: A fotoquímica (Ph), primeira via, utiliza a energia luminosa nos processos fotoquímicos da fotossíntese (doação do elétron proveniente da molécula de água para um aceptor denominado NADP^+ (Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato). Este processo é a base da fotossíntese. Esta energia dissipada é usada para a formação do poder redutor e da molécula de ATP (Trifosfato de adenosina), os quais serão utilizados na fase bioquímica do processo fotossintético. Esta dissipação de energia é representada pelo quenching fotoquímico (q_p) (dissipador fotoquímico). A segunda via é a fluorescência (F), caracterizada pela emissão de radiação na região do visível (vermelho e vermelho distante). A

terceira via é a dissipação não-fotoquímica (D), é a produção de calor na forma de radiação infravermelha. Esta dissipação de energia é representada pelo quenching não-fotoquímico (q_N) (dissipador não-fotoquímico) (MAXWELL & JOHNSON, 2000; CAMPOSTRINI, 2001).

Em temperatura ambiente, 20 a 25°C, a fluorescência é uma luz emitida que exibe um ponto máximo de emissão na faixa de 682 nm e outro ponto menos pronunciado em 740 nm. A fluorescência da clorofila a, em sua maioria, é emitida pelo PSII e pelo sistema coletor de luz do PSII. Os três processos de dissipação da energia luminosa pelas moléculas de clorofilas ($Ph+F+D$) são competitivos entre si, ou seja, alterações nas taxas fotossintéticas e na dissipação de calor causarão alterações complementares na emissão da fluorescência (CAMPOSTRINI, 2001).

Quando uma folha é mantida no escuro, a quinona A (Q_A) torna-se oxidada e os centros de reação de PSII são referidos como "abertos", ou seja, capaz de realizar a redução fotoquímica da Q_A . A exposição de uma folha adaptada ao escuro, a um feixe de luz fraca intensidade ($0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) resulta em um nível mínimo de fluorescência, F_0 (ROHÁČEK, 2002). A intensidade do feixe de luz deve ser não actínica, para garantir que a Q_A continue oxidada. Em seguida, um pulso de luz vermelho-extremo fraco, que excita preferencialmente o fotossistema I (PSI) e remove elétrons da Q_A , deverá ser aplicado antes da medição da F_0 . Se depois de atingir a F_0 , a folha for exposta a um pulso actínico curto de alta intensidade ($> 2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em menos de 1 s), a F_0 é reduzida, e a máxima fluorescência F_m , é observada. A diferença entre a F_m e a F_0 é a fluorescência variável, F_v . A razão F_v/F_m pode ser usada para estimar o máximo rendimento quântico de redução da Q_A (CAMPOSTRINI, 2001; BAKER & ROSENQVIST, 2004; BAKER, 2008).

A Q_A é maximamente reduzida quando, folhas adaptadas à luz, são expostas a um breve pulso saturante de luz. Com o pulso de luz, obtêm-se variações nos níveis de fluorescência, que passa a ser denominada de F'_m . [Desta maneira, denomina-se $F_m - F'_m$ (quenching não fotoquímico) e $F'_m - F$ (quenching fotoquímico)]. Outro parâmetro da fluorescência é o rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{PSII}) que representa a eficiência de captura da excitação pelos centros de reação abertos do PSII e está relacionado à dissipação da energia termal no complexo antena (CAMPOSTRINI, 2001; BAKER, 2008). De acordo com (MAXWELL & JOHNSON, 2000), este parâmetro mede a percentagem de luz absorvida pela clorofila associados ao PSII que é usado no processo fotoquímico.

Em particular, o estudo da fluorescência tem dado grandes contribuições ao conhecimento de plantas sob estresse ambientais, na medida em que essas tensões têm prejudicado o aparato fotossintético. Atualmente, essas informações são amplamente utilizadas em estudos de fisiologia de plantas sob condições de estresses ambientais (KRAUSE & WEISS, 1991). Com o advento e refinamento dos fluorômetros portáteis, tem-se observado um grande aumento com pesquisas que realizam medições de fluorescência da clorofila em condições de campo e casa-de-vegetação. Um aspecto importante é que a medição é rápida e não destrutiva. Medições realizadas durante o turno diurno podem render informações relativas ao quenching não fotoquímico, as taxas de transporte de elétrons, a eficiência quântica, e o grau de fotoinibição em resposta à luz, temperatura e outros tipos de estresses ambientais únicos ou combinados (BILGER et al. 1995; MAXWELL & JOHNSON, 2000).

O conhecimento da variação nas características da fluorescência entre plantas cultivadas sob condições de estresse ou não, e da relação entre essas características, bem como do rendimento do fóton em plantas, têm ganho uma importância considerável (BJÖRKMAN & DEMMIG, 1987), principalmente no estudo das respostas de adaptação das plantas a seca.

2.5 Metabolismo de carboidratos em plantas

Amido e sacarose são os principais produtos finais da fotossíntese. Durante o dia a planta acumula sacarose e realiza a exportação para o resto da planta. À noite, a sacarose e o amido armazenados são remobilizados, mantendo a exportação de sacarose para os drenos e tecidos, afim de sustentar o gasto de energia realizado durante a respiração foliar (LUNN & HATCH, 1995). O carbono fixado durante a fotossíntese ou é retido no cloroplasto e convertido em amido, ou translocado para o citosol sob a forma de triose fosfatos, principalmente dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) e convertido em sacarose. O amido desempenha um papel importante no metabolismo da planta como uma forma de reserva temporária de carbono reduzido, já a sacarose desempenha um papel central na translocação como também na forma de transporte do carbono reduzido. A sacarose sintetizada no citosol pode ser translocado da folha ou temporariamente armazenadas dentro da folha (SINGH & MALHOTRA, 2000).

Ao chegar nas células de armazenamento, o metabolismo da sacarose é realizado por diversas enzimas que realizam reações diversas e operam em paralelo. As enzimas

simplásticas diretamente envolvidas e relacionadas à síntese de sacarose são, sacarose-fosfato sintase (SPS) em conjunto com a sacarose-fosfato fosfatase (SPP) e a sacarose sintase (SS). Em relação a repartição de sacarose tem-se: invertase ácida solúvel (SAI), invertase neutra (NI) e sacarose sintase (SS). Os produtos da reação, a glicose, frutose e UDP-glicose podem ser recicladas para os precursores da síntese de sacarose novamente pela hexoquinase, fosfoglicoisomerase (IGP) e UDPglicose pirofosforilase (UDPG-PPase) (Fig.2). Todas essas enzimas supostamente são citosólicas com exceção da invertase ácida solúvel, que é vacuolar (KOMOR, 2000).

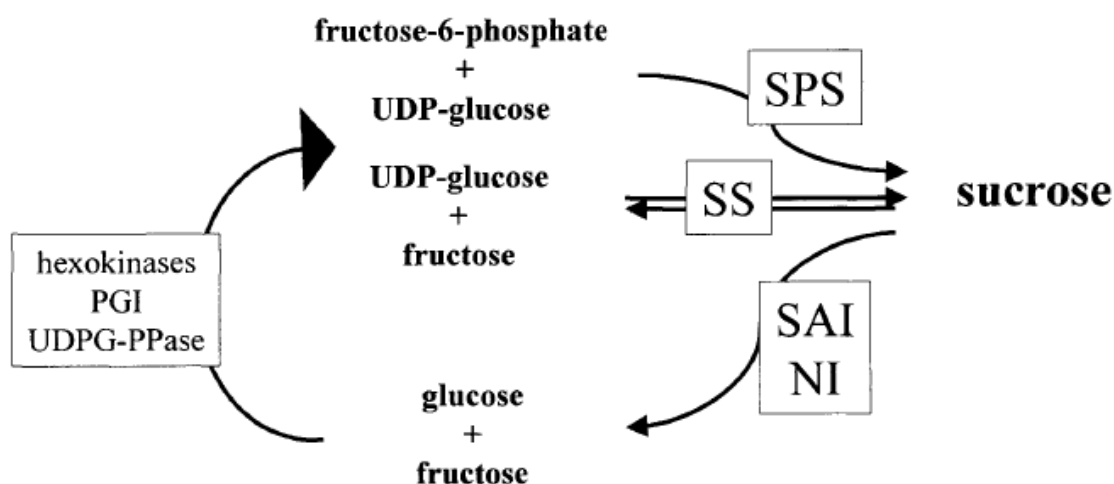


Figura 1 Ciclo da sacarose em cana-de-açúcar e enzimas e metabólitos envolvidos. (SPS = sacarose fosfato sintase, SS = sacarose sintase, SAI = invertase ácida solúvel, NI = invertase neutra, PGI = fosfoglicoisomerase, UDPG-PPase = UDPglicose pirofosforilase (KOMOR, 2000).

O metabolismo de assimilados é necessário para evitar o acúmulo de produtos e a inibição da assimilação. Mudanças consideráveis podem ocorrer nas concentrações de carboidratos e aminoácidos sob baixo conteúdo relativo de água (CRA). Como a assimilação diminui com a redução do CRA, a quantidade de assimilados disponíveis para a exportação de triosefosfato do cloroplasto para citosol diminui, e a síntese de sacarose também. O teor de sacarose nas folhas estressadas cai rapidamente sob CRA menor que 80%, causado pela baixa assimilação e respiração contínua, além de síntese de aminoácidos (LAWLOR & CORNIC, 2002).

A concentração de sacarose foliar é determinada por vários fatores, incluindo a taxa de fotossíntese, a compartimentação de carbono pela fotossíntese entre o amido e sacarose, a taxa de hidrólise da sacarose e a taxa de exportação de sacarose (WINTER & HUBER, 2000). Variando em função da idade da planta e do ambiente em que está crescendo. Qualquer efeito da seca sobre estes processos pode modificar a concentração de sacarose da folha (ZHU et al. 1997).

Modificações nos níveis de carboidratos durante a seca também têm sido atribuídas a alterações nas atividades enzimáticas. Os principais carboidratos como, amido, açúcares redutores e não redutores sofrem importantes mudanças sob eventos de seca, e vem sendo investigado por vários pesquisadores em culturas de grande importância econômica como feijão, soja e milho (CASTRILLO, 1992; PELLESCI et al. 1997; LIU et al. 2004).

Em guandu (*Cajanus cajan*), por exemplo, Keller & Ludlow (1993), relataram uma rápida diminuição da concentração foliar de amido e sacarose sob estresse hídrico, enquanto que as concentrações de glicose e frutose aumentaram significativamente, associando isto, à um aumento da atividade de hidrólise do amido e enzimas sacarose sintase. Liu et al. (2004), também observaram decréscimos nos teores de sacarose e amido foliar em virtude da seca, juntamente com acúmulo de glicose e frutose, contudo a seca não afetou a atividade da invertase solúvel das folhas.

Castrillo (1992) mencionou a influência do estresse hídrico na diminuição de 1,8 para 0,4 $\mu\text{g m}^{-2}$ de amido/sacarose e aumento de 5,0 para 8,0 $\mu\text{g m}^{-2}$ de glicose/frutose totais (valores aproximados), o autor também observou modificações na atividade da sacarose sintase e invertase de folhas de feijão, onde a percentagem de ativação da enzima sacarose sintase aumentou 143% com oito dias de restrição hídrica.

Segundo Papini-Terzi et al. (2009), compreender as diferenças nos mecanismos ligados direta ou indiretamente ao acúmulo de sacarose em diferentes cultivares é uma etapa importante na melhoria do rendimento de açúcar na cana-de-açúcar, assim como, o impacto de estresses ambientais no acúmulo de sacarose e nos demais meios de sinalização do estresse expressados pela cana-de-açúcar.

Em adição, McCormick et al. (2008) comenta que para a cana-de-açúcar, o metabolismo de carboidratos em folhas submetidas ao estresse hídrico ainda é pouco compreendido e requer mais estudos, no sentido de desvendar os efeitos da seca sobre as respostas fisiológicas das plantas. Uma melhor compreensão dos mecanismos de sinalização sobre a atividade fotossintética e seus produtos, irá apoiar os esforços biotecnológicos na investigação sobre o acúmulo de carbono na cana-de-açúcar em condições ambientais adversas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Fisiologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, localizado no município de Rio Largo - AL (9°28' S, 35°49' W, a 127m de altitude) no período de 12/11/2009 a 12/03/2010. Foram utilizadas duas variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) provenientes do Programa de Melhoramento Genético da cana-de-açúcar (PMGCA/CECA/UFAL), com respostas contrastantes à seca, onde a variedade RB867515 é considerada tolerante e a RB855536 é considerada sensível ao estresse hídrico.

3.2 Condições de cultivo

As plantas foram originadas de rebolos de cana com uma única gema, onde foram semeados quatro rebolos por vaso. Os vasos foram preenchidos com 22,0 kg de solo, o qual foi destorroado e peneirado. Após 22 dias de plantio, foi realizado o desbaste, selecionando as duas plantas que se apresentavam mais bem desenvolvidas, a fim de manter a uniformidade e homogeneidade das plantas dos vasos. Até o início da imposição dos tratamentos, o solo foi mantido próximo a capacidade de campo, determinada por um método gravimétrico direto, conforme descrito por (SOUZA et al. 2002).

A aplicação dos tratamentos se deu através da supressão da rega aos 109 dias de plantio. Os tratamentos foram divididos em quatro grupos:

Grupos:	Subgrupos:
Grupo 1	{ Controle { 2 dias de estresse hídrico { Reidratação após 2 dias de estresse hídrico
Grupo 2	{ Controle { 4 dias de estresse hídrico { Reidratação após 4 dias de estresse hídrico
Grupo 3	{ Controle { 6 dias de estresse hídrico { Reidratação após 6 dias de estresse hídrico
Grupo 4	{ Controle { 8 dias de estresse hídrico { Reidratação após 8 dias de estresse hídrico

Os tratamentos reidratados foram avaliados dois dias após a reidratação em cada tempo de estresse hídrico, afim de se observar a recuperação das plantas.

Durante as avaliações foram realizadas três leituras da umidade do solo por vaso, numa profundidade de cinco centímetros, utilizando-se um sensor de umidade modelo SM200, acoplado a um medidor de umidade modelo HH2 ambos do fabricante (DELTA-T Devices, Cambridge - England).

As temperaturas máxima, média e mínima, radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e déficit de pressão de vapor (DPV), foram registrados diariamente por uma estação meteorológica automática (Weather Station) modelo WS - GP1 AT (DELTA-T Devices, Cambridge - England), instalada no interior da casa de vegetação.

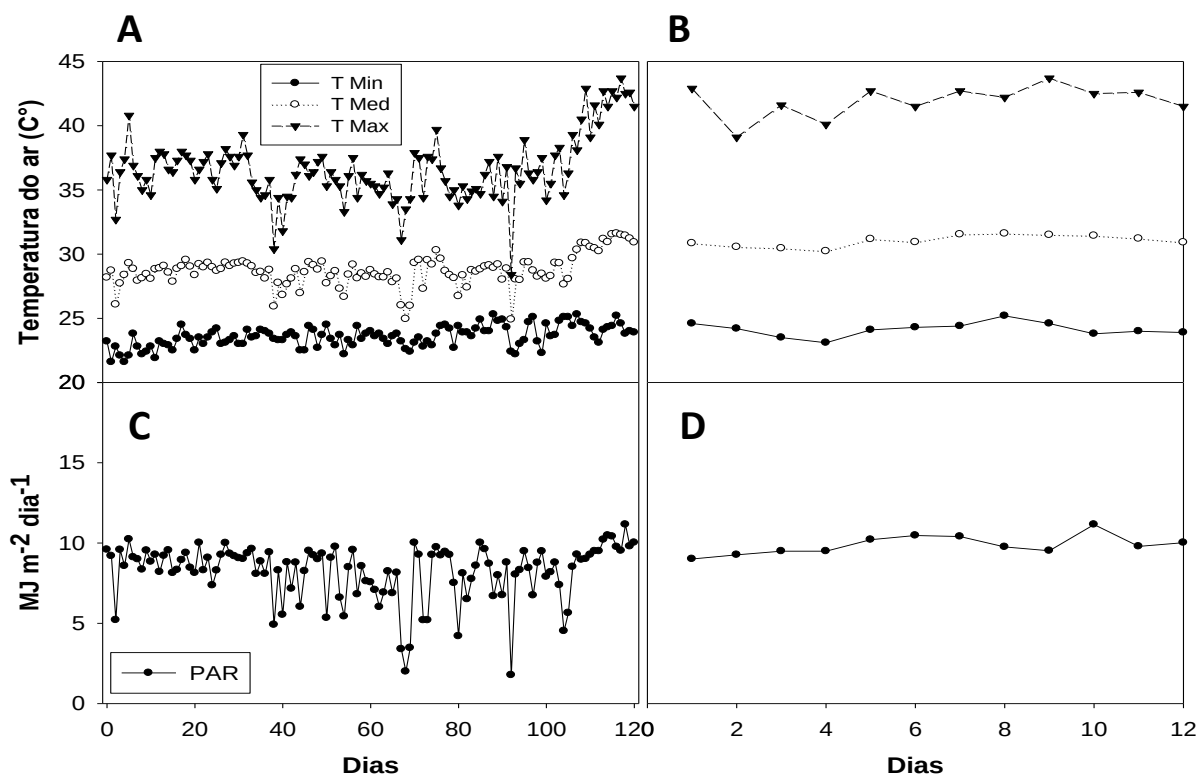


Figura 2 Dados diários de temperatura mínima (T Min), média (T Med), máxima (T Max) (A), radiação fotossinteticamente ativa (B), registradas dentro da casa de vegetação durante o período experimental, e dados diários de (T Min, T Med e T Max) (C) e (PAR) (D) observadas durante o período de coleta das amostras.

3.3 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso com arranjo em esquema fatorial com 2 (variedades) x 3 (estados hídricos) x 4 (tempos de estresse hídrico) com 4 repetições, considerando a planta como unidade experimental. Para as análises de fluorescência da clorofila *a*, açúcares solúveis, enzimas antioxidantes, potencial hídrico e potencial de solutos foliar foram utilizadas quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).



Figura 3 Vista parcial do stand experimental com as variedades RB855536 e RB867515, cultivadas em casa-de-vegetação aos 56 dias após o plantio.

3.4 Análises fisiológicas

3.4.1 Avaliação da eficiência fotoquímica

Para medidas de fluorescência da clorofila *a*, utilizou-se um fluorômetro portátil de luz modulada (Opti-Sciences, modelo OS1-FL, Hudson, USA), pelo qual se obteve a fluorescência inicial (F_0), a fluorescência máxima (F_m), a fluorescência variável (F_v) e o rendimento quântico máximo do FSII (F_v/F_m), obtidos após a adaptação da folha +1 ao escuro por (≈ 20 min) com a utilização de presilhas plásticas. As medições ocorreram nos horários entre 4 - 5 horas (antemanhã) e 11 - 12 horas (meio-dia), para quantificação do grau de fotoinibição do fotossistema II (PSII) provocado pelo estresse hídrico. O rendimento quântico

efetivo do PSII (Yield) foi determinado às 10:00 horas da manhã sob luz ambiente. Foram realizadas duas leituras do terço médio foliar da folha +1 de todas as plantas.

3.4.2 Potencial hídrico foliar (ψ_w)

O potencial hídrico foliar foi medido por uma bomba de pressão de Scholander (Soil Moisture, Equipment Corporation, Santa Barbara, USA) às 4:30h (antemanhã), utilizando a folha +2. As folhas foram seccionadas na lígula, separadas em sacos plásticos e acondicionadas em caixa térmica com gelo (sem contato com o gelo) afim de minimizar a perda de umidade. Imediatamente após a coleta, as amostras foram levadas ao laboratório para realização das leituras.

3.4.3 Potencial de solutos (ψ_s)

Para a determinação da osmolalidade total do tecido foliar, coletou-se amostras do terço médio da mesma folha utilizada na determinação do ψ_w (folha +2), às 4:30h (antemanhã), de onde se extraiu o suco celular por prensagem, transferindo-o para tubos de 1,5 mL, sendo posteriormente armazenada em -20 °C. Um osmômetro de pressão de vapor VAPRO 5520 (Wescor Inc. Logan, UT, USA), foi utilizado para obtenção dos valores de ψ_s . Para cada leitura foram utilizadas alíquotas de 10 μ L de suco celular e os valores expressos em MPa.

3.5 Coleta do material vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada às 12:30h em cada subgrupo já descrito anteriormente. O terço médio da folha +1 foi cuidadosamente recortado com tesoura, acondicionado em tubos de 15 e 50 mL, e mantido em nitrogênio líquido e armazenado em ultra-freezer -80°C para posteriores análises.

3.6 Avaliação de carboidratos

3.6.1 Sacarose, glicose, frutose e amido

As análises metabólicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. A extração de açúcares foi feita de acordo com Trethewey et al. (1998). Inicialmente, cerca de 50 mg de tecido foliar liofilizado (massa seca), foi macerado por 1 min e 30s em um Mini-beadbeater - 96 (Biospec Products, Inc. Bartlesville, USA) em tubo de 2 mL com

auxílio de 4 esferas de aço. Em seguida cerca de 10 mg da amostra, foram transferidos para um tubo de 2 ml, onde se adicionou 1000 μL de metanol 100%, e as amostras foram mantidas em Thermomixer comfort (Eppendorf, Brasil) a 70°C por 1 hora a 950 rpm. O homogenato foi centrifugado por 10 min a 11.000 g em temperatura ambiente 25°C. Posteriormente 600 μL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de 2 mL. O sedimento da extração de açúcares foi utilizado para a extração do amido e armazenado em ambiente refrigerado. Ao sobrenadante foi adicionado 500 μL de clorofórmio 100% (CHCl_3), depois adicionou-se 800 μL de água deionizada. Logo após, as amostras foram agitadas em vortex por 10s e centrifugadas por 15 min a 2.200 g . Coletou-se 1000 μL da fase polar (superior) e transferiu-se para tubos de 1,5 mL. Em seguida amostras foram levadas a Concentrator plus a vácuo (Eppendorf, Brasil) overnight a 30°C e armazenadas à -20°C.

O sedimento da extração de açúcares, foi lavado três vezes em etanol 80%, e posteriormente, hidrolisado com 400 μL de KOH 0,2 M por 1 hora a 90°C com agitação a 950 rpm em Thermomixer. Em seguida foram acrescentados 70 μL de ácido acético 1 M, agitado no vortex e centrifugado por 10 min a 13.000 g . A fração solúvel correspondeu ao amido presente na amostra, o qual foi armazenado em -20°C.

Para a extração do amido não foram utilizadas luvas, devido às mesmas possuírem amido, de modo a evitar interferências nos resultados das análises.

A determinação de glicose, frutose e sacarose, foi feita conforme Stitt et. al. (1989). Resumidamente uma alíquota do extrato etanólico foi usada em “Tampão Imidazol” (Imidazol 100 mM (pH 6,9); NAD^+ 2 mM; ATP 1 mM e H_2O), contendo, ainda, 2 U mL^{-1} de desidrogenase da glicose-6-fosfato, em volume final de 300 μL . Em seguida adicionou-se na placa de ELISA (135 μL de H_2O ; 150 μL de Tampão Imidazol e 5 μL da amostra). A reação foi registrada continuamente em leitor de ELISA (ELISA Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA), a 340 nm, por cerca de 5 min sendo então acrescentado 0,5 U reação^{-1} de hexocinase (EC 2.7.1.1), para a determinação da glicose. Depois de estabilizadas as leituras, foi adicionado 0,5 U reação^{-1} fosfoglicoisomerase (PGI) (EC 5.3.1.9), para determinação da frutose. Por último, a essa reação foram acrescentados 2 U de invertase (β -frutosidase) (EC 3.2.1.26), para determinação dos teores de sacarose.

Para determinação dos teores de amido, uma alíquota do extrato de amido foi incubada por 60 min a 55°C com 30 μL de tampão citrato 300 mM (pH 4,6), 2 U reação^{-1} de amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) e H_2O , num volume final de 300 μL . Após a digestão do amido adicionou-se na placa de ELISA (150 μL de Tampão Imidazol, 100 μL da amostra e 40 μL de

H₂O) A reação foi registrada continuamente em leitor de ELISA (ELISA Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA), a 340 nm, até a estabilização, sendo então acrescentado 0,5 U reação⁻¹ de hexocinase, para a determinação do amido.

3.7 Enzimas antioxidantes

3.7.1 Catalase (CAT)

A análise da atividade da CAT foi realizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo - AL. Para extração e determinação da CAT foi usado o método descrito por Havir et al. (1987). Aproximadamente 30 mg de material foliar fresco foram macerados (cadinho e pistilo) em 2 mL de “Tampão TFK” (Tampão Fosfato de Potássio 50 mM (pH 7,5); EDTA 2 mM; Ascorbato 20 mM; Triton X 100 0,1%, PVPP 1% (p/v) e H₂O deionizada), em seguida transferidas para tubo de 2 mL e centrifugadas por 15 min a 14000 g a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo de 2 mL e mantido a -80°C até a análise.

Na determinação da CAT as amostras foram descongeladas e mantidas a 4°C. A reação foi registrada em espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10, Madison, USA) durante 1 min a 240 nm em cubeta de quartzo. Foi usado meio de reação (Tampão TFK 50 mM (pH 7,5); H₂O₂ 12,5 mM; H₂O deionizada), (mantidos a 30°C em banho maria) e 20 µL de extrato num volume final de 1000 µL. Durante a reação observou-se o decréscimo da concentração de H₂O₂. Para os cálculos da atividade da CAT usou-se o coeficiente de extinção 36 mM⁻¹ cm⁻¹. Os valores foram expressos em unidades de CAT min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.7.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da atividade da SOD foi realizada no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. Para extração e determinação da SOD usou-se o método descrito por Giannopolitis & Ries (1977) com modificações. Aproximadamente 50 mg da amostra foram maceradas por 1 min e 30s em um Mini-beadbeater - 96 (Biospec Products, Inc. Bartlesville, USA) em tubo de 2 mL com auxílio de 1 esfera de vidro após banho de N₂ líquido. Em seguida os tubos foram transferidos para um recipiente com gelo a uma temperatura de $\pm$ 4°C, onde foram adicionados 1,5 mL de tampão de extração (TFK 100 mM (pH 6,8), EDTA 0,1 mM, DTT 1,0 mM, Triton X 100 0,1%, PMSF 1,0 mM, PVPP 1% (p/v) e H₂O deionizada),

agitados no vortex e centrifugadas por 15 min a 14000 *g* a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubo novo de 1,5 mL e mantido a -80°C até a análise. A determinação da SOD foi realizada usando-se meio de reação (TFK 50 mM (pH 7,8), Metionina 13,0 mM, NBT 75,0 µM, EDTA 0,1 mM, Riboflavina 2,0 µM, H₂O deionizada), e 10 µL do extrato enzimático, num volume final de 297 µL. A reação foi conduzida em placa de ELISA disposta em câmara de reação a 25°C, sob iluminação de lâmpada fluorescente de 45 W. Após 7,5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, medida na absorbância a 560 nm. A absorbância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (GIANNOPOLITIS & RIES, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971).

3.7.3 Ascorbato Peroxidase (APX)

A determinação da APX foi realizada conforme Nakano & Asada (1981). O extrato enzimático utilizado para a APX foi o mesmo da extração da CAT. Na determinação da APX o extrato foi descongelado e mantido a 4°C. A reação se deu em espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10, Madison, USA) durante 1 min a 290 nm em cubeta de quartzo. O meio de reação usado na análise foi composto por (Tampão TFK 50 mM (pH 7,5); H₂O₂ 0,1 mM; ascorbato de sódio 0,5 mM; H₂O deionizada), (mantidos a 25°C em banho maria) e 25 µL do extrato com um volume final de 1,0 mL. Durante a reação observou-se o decréscimo da concentração do ascorbato de sódio. Para os cálculos da atividade da APX usou-se o coeficiente de extinção 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹. Os valores foram expressos em unidades de APX min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

3.7.4 Proteínas solúveis das enzimas antioxidantes

Para a determinação dos teores de proteínas solúveis foi usado uma fração de 50 µL do extrato enzimático descrito anteriormente (não tratado com ácido tricloroacético), e completado para 1 mL com reagente Coomassie (Bradford, 1976), o qual, foi preparado, dissolvendo-se 111,0 mg de (Coomassie Brilliant Blue G-250), em 50 mL de etanol 95% com agitação constante, sem aquecimento, durante uma hora. Adicionou-se 100 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 85% e o volume completado com água deionizada até 1000 mL. Em seguida realizaram-se duas filtrações em papel de filtro qualitativo e o reagente foi mantido em frasco escuro sob ambiente refrigerado. As proteínas solúveis foram estimadas pelas

medidas de absorvância a 595 nm, utilizando como branco a mistura de 50 µL do tampão de extração e 950 µL do reagente de Bradford. Como padrão foi usada a albumina sérica bovina (Sigma Chemical Company). Os resultados foram expressos em mg g⁻¹ MF. Cada amostra foi representada por um extrato simples dosado em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições meteorológicas e teor de umidade do solo

Durante o período experimental a temperatura média foi de aproximadamente 28 °C, no entanto, durante a coleta, realizada na primeira quinzena de março de 2010, detectou-se um leve aumento na temperatura média, apresentando (± 30 °C), e uma forte elevação na temperatura máxima (± 43 °C) (figura 2). Após a suspensão da rega, uma queda pronunciada no teor de água do solo é observada até seis dias de seca nas duas variedades, em seguida mostrando uma pequena variação até o décimo dia de restrição hídrica (figura 4).

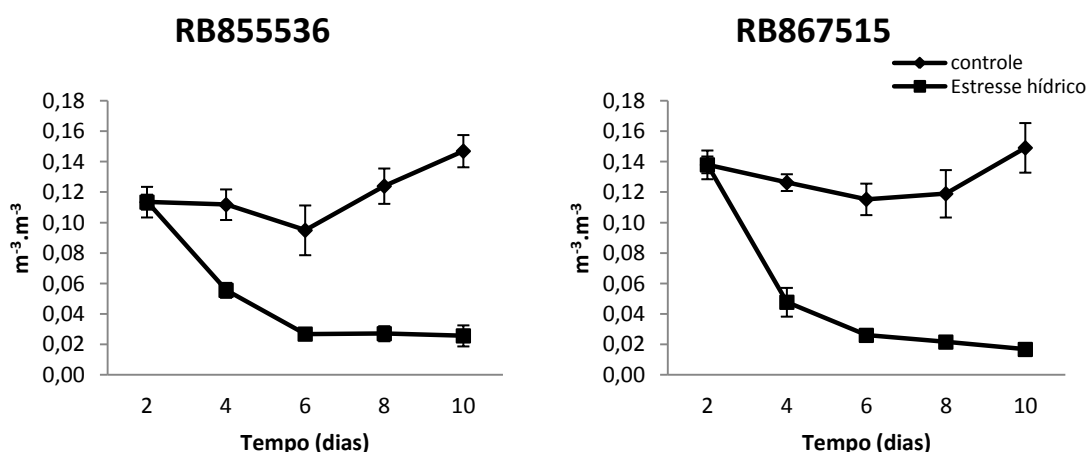


Figura 4 Teor de umidade do solo, cultivado com duas variedades de cana-de-açúcar submetidas a estresse hídrico e reidratação, em casa de vegetação aos 121 após o plantio. As barras representam o erro padrão da média (n = 6).

4.2 Potencial hídrico (ψ_w) e Potencial de solutos (ψ_s)

A suspensão da irrigação provocou decréscimos no potencial hídrico foliar e osmótico nas duas variedades (figura 5). O ψ_w da variedade RB855536, apresentou uma leve redução sob estresse (-0,23 MPa), em relação ao controle (-0,13 MPa) (figura 5 A). Após seis dias de restrição hídrica, não foram observadas leituras do potencial hídrico foliar nas duas variedades, atribui-se a tal fato, o elevado nível de desidratação apresentado pelas folhas +2 das plantas em virtude da seca, somado ao efeito das altas temperaturas registradas dentro da casa de vegetação durante o experimento (figura 3). Após a reidratação, houve recuperação do potencial hídrico, o qual diferiu significativamente do controle quando submetido por mais de seis dias de seca.

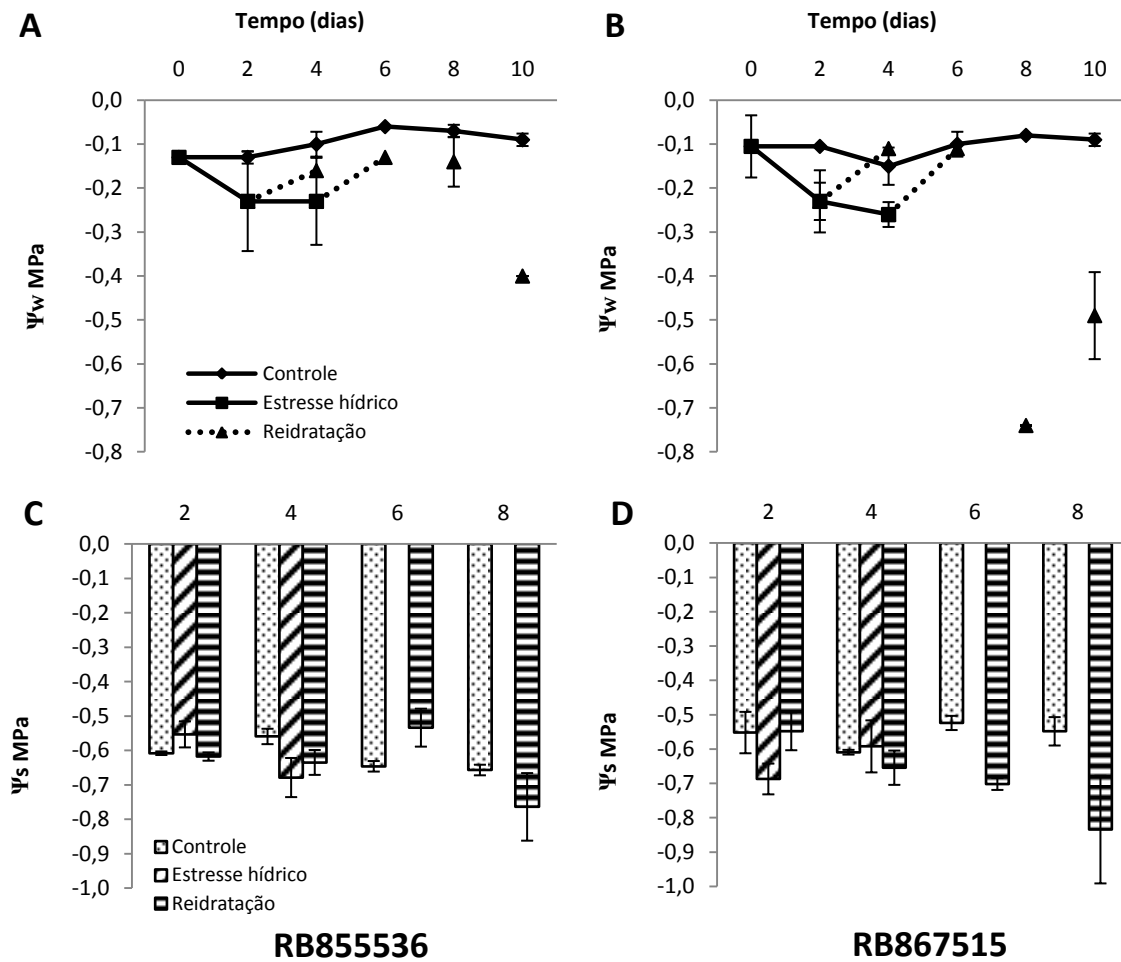


Figura 5 Potencial hídrico foliar ψ_w antemanhã - 4h (A e B) e potencial de solutos ψ_s antemanhã - 4h (C e D) de duas variedades de cana-de-açúcar RB855536 (A e C) e RB867515 (B e D) submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio.

A RB867515 (figura 5 B), também apresentou ligeira redução no ψ_w foliar até quatro dias de restrição hídrica. Porém, após a reidratação, detectou-se uma grande diminuição do ψ_w nesta variedade (-0,74 e -0,49 MPa) em comparação com o controle (-0,10 e -0,08 MPa) aos seis e oito dias de estresse respectivamente. Após a reidratação a variedade RB867515 sofreu uma maior redução no ψ_w foliar aos seis e oito dias de déficit hídrico (-0,74 e -0,49 MPa) respectivamente, em relação a RB855536 (-0,29 e -0,40 MPa) nas mesmas condições. Esses resultados mostram que as plantas apresentaram capacidade de recuperação quando submetidas a oito dias de seca, entretanto, não conseguindo restabelecer o seu status hídrico ao nível das plantas controle.

Segundo Bergonci et al. (2000), o potencial hídrico foliar de base corresponde a medição feita na antemanhã, antes do sol nascer. Assim, uma das grandes vantagens deste teste, quando comparado com outras variáveis que descrevem o estado hídrico da planta, é sua independência em relação às condições ambientais diurnas. Como no presente estudo as medições dos tratamentos reidratados foram feitas dois dias após a reidratação, mesmo

mantendo os vasos próximos a capacidade de campo, as plantas ficaram exposta às variações ambientais (altas temperaturas) durante o dia nesse intervalo de tempo. Provavelmente, tais fatores, podem ter influenciado os baixos potenciais hídricos apresentados pelas variedades nas medidas de ψ_w , principalmente na RB867515. Outro fator que possivelmente contribuiu com esses resultados, foi a presença de iluminação noturna próxima ao local do experimento, fazendo com que as plantas transpirassem neste período. Snyder et al. (2003), comparando diversas espécies C_3 e C_4 , relataram condutância estomática e transpiração noturna em 11 das 14 espécies estudadas dentre elas gramíneas. Porém uma hipótese a se considerar seria a de que, a maior redução ψ_w pode ser uma estratégia da variedade RB867515 no sentido de manter a absorção de água pelas raízes, e assim atender a demanda hídrica da planta após ter passado por um tempo de estresse.

Barbosa (2010), comparando variedades de cana sensíveis e tolerantes ao estresse hídrico, em campo, notou decréscimo significativo do ψ_w antemanhã na variedade RB867515 -0,93 MPa em relação a RB855536 -0,30 MPa sob cultivo sequeiro e -0,45 e -0,30 MPa no controle respectivamente. O resultado obtido por este autor assemelha-se ao apresentado neste trabalho quanto às variedades RB855536 e RB867515.

Em adição, Inman-Bamber & Smith (2005), pesquisando cana-de-açúcar também em condições de campo, observaram potenciais hídricos antemanhã em torno de -0,05 MPa sob condições irrigadas, e -0,2 MPa em condições de sequeiro. Enquanto Silva et al. (2001), relataram reduções no potencial hídrico foliar de três espécies de gramíneas cultivadas em casa de vegetação, em valores próximos de (-1,5 MPa) aos sete dias de seca e valores constantes de (-0,3 MPa) nas plantas controle. Os níveis de ψ_w observados por (SILVA et al. 2001) foram bem abaixo dos apresentados pelo presente estudo.

Já Gonçalves et al. (2010), trabalhando com quatro variedades de cana-de-açúcar em casa de vegetação, constataram valores de potencial hídrico antemanhã em torno de (-0,10 MPa) em plantas controle e (-0,19 MPa) sob estresse severo. Silva (2010), também comparando variedades e clones de cana-de-açúcar, observou potenciais hídricos próximos de (-0,12 MPa) nos tratamentos controle, e variações de (-0,15 e -0,24 MPa) em condições de estresse hídrico severo. Levando-se em conta os resultados observados por estes autores, podemos sugerir que as variedades analisadas nesta pesquisa já apresentavam valores de ψ_w correspondentes a estresse severo já a partir do quarto dia de seca.

Saliendra & Meinzer (1991), relatam um limite no potencial hídrico foliar de -0,8 a -0,9 MPa em que o crescimento de folhas e a abertura estomática começam a declinar, e de -1,3 a -1,7 MPa em que ambos são completamente inibidos. Por outro lado, Boyer (1970),

constatou inibição da expansão foliar em girassol, milho e soja pela diminuição do potencial hídrico, com valores críticos entre -0,4 e -0,5 MPa, e índices máximos de expansão em torno de -0,15 e -0,25 MPa.

O potencial de solutos (ψ_s) expressado pela variedade RB855536 (figura 5 C), apresentou diferença significativa apenas entre o controle (-0,46 MPa) e a reidratação (-0,94 MPa) depois de oito dias de estresse hídrico. Nesta variedade, o controle permaneceu constante, mostrando ψ_s em torno de -0,55 MPa. Até o quarto dia de estresse hídrico, observou-se uma leve redução nos valores de ψ_s (-0,67 MPa), no entanto, sem diferir significativamente do controle. A partir do sexto dia, não foram detectadas leituras nos tratamentos estressados. O que indica que as plantas não suportaram a escassez hídrica e a alta temperatura ($\pm 42^\circ\text{C}$) durante este período, não conseguindo assim, realizar o ajustamento osmótico. Após a reidratação, com seis dias de seca a planta ajustou o ψ_s ao mesmo nível do controle. De acordo com Blum et al. (1996), o ajustamento osmótico envolve a acumulação líquida de solutos nas células em resposta a uma queda do potencial hídrico. Como consequência desse acúmulo líquido, o potencial osmótico da célula é reduzido, atraindo por sua vez, a água para dentro da célula de modo a manter a turgescência.

Na variedade RB867515 (figura 5 D), não houve diferença no ψ_s do tratamento estressado (-0,68 MPa) em relação ao controle (-0,55 MPa) até o quarto dia de seca. A variedade RB867515 ainda apresentou resultados semelhantes aos da RB855536, onde não se observaram leituras a partir de seis dias de restrição hídrica. O ψ_s da RB867515 decaiu após a reidratação, mantendo uma queda nesse parâmetro com o aumento do tempo de restrição hídrica.

Molinari et al. (2007), observaram em cana-de-açúcar cultivada em casa de vegetação, e submetida aos seis e nove dias de seca, potenciais de solutos em torno de -2,33 e -2,82 MPa em plantas controle não transformadas, e -2,17 e -2,86 MPa em plantas transformadas, concluindo que a redução do potencial hídrico foi acompanhada por uma diminuição do potencial osmótico. Corroborando com os dados observados no presente estudo, os quais mostraram reduções no potencial hídrico, acompanhadas de decréscimos no potencial osmótico em condições de seca.

Clifford et al. (1998), relataram declínio no potencial hídrico (-0,5 e -1,4 MPa) e osmótico (-1,7 e -2,2 MPa) no tratamento controle e estresse respectivamente de folhas de *Ziziphus mauritiana* em resposta a uma diminuição de 14 %, no conteúdo relativo de água.

Barbosa (2010), constatou em variedades de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes à seca em condições de campo, que o ψ_s da variedade RB867515 sob cultivo de sequeiro, não diferiu do apresentado pela RB855536.

4.3 Avaliação da eficiência fotoquímica

A diminuição no conteúdo de água do solo (figura 4), ocasionada pelo estresse hídrico, provocou redução na eficiência fotoquímica nas duas variedades de cana-de-açúcar (figura 6, tabela 4).

A relação F_v/F_m da variedade RB855536, aferido às 4h, diminuiu após quatro dias de estresse hídrico (figura 6A). Na variedade RB867515, essa diferença já foi observada com dois dias após o estresse (figura 6B), indicando que as duas variedades sofreram fotoinibição crônica. No entanto, a RB867515 apresentou fotoinibição crônica mais intensa durante todo período de estresse. A fotoinibição crônica, ocorre quando a luz absorvida em excesso gera uma série de espécies reativas de oxigênio podendo causar danos ao aparelho fotossintético (MORAES et al. 2010), o mesmo ocorre quando a proteólise da proteína D1, localizada no centro de reação, excede a taxa de reparo, ocasionando em danos à integridade funcional do centro de reação do PSII (OSMOND citado por LEMOS-FILHO & ISAÍAS, 2004). Além disso, o fotossistema não consegue se recuperar de um dia para o outro.

Segundo Baker (2008), quando as plantas são expostas a estresses abióticos como estresse hídrico e temperatura, diminuições na relação F_v/F_m frequentemente são observadas, juntamente com a inativação dos centros de reação do PSII, podendo levar a oxidação, danos e perdas dos centros de reação.

Biheler & Fock (1996), investigando o processo fotoquímico em trigo, observaram que a atividade do PSII diminuiu 11,7% sob estresse hídrico.

Quando as duas variedades analisadas foram reidratadas, ambas se recuperaram da fotoinibição crônica quando submetidas até quatro dias após o estresse. A RB867515 mostrou uma resposta muito parecida quando comparada com a RB855536. O aumento do tempo de estresse hídrico, implicou em dano irreversível ao PSII das duas variedades, as quais não apresentaram restabelecimento do F_v/F_m ao nível do controle.

Souza et al. (2004), por outro lado, observaram recuperação no F_v/F_m de plantas reidratadas de *Vigna unguiculata* ao nível de controle após terem sofrido estresse hídrico.

Aro et al. (1994) por outro lado, mencionaram aumento da taxa de degradação de proteínas D1 em folhas fotoinibidas de ervilha, em relação as não fotoinibidas, e que esse

processo garantiu a restauração da função do PSII em diferentes irradiâncias, sendo diretamente relacionado com a capacidade das folhas em degradar proteínas D1 danificadas em condições de recuperação.

Em ambas as variedades também foram observadas uma redução do F_v/F_m às 11 h caracterizando fotoinibição dinâmica. A variedade RB855536 começou a apresentar fotoinibição dinâmica após quatro dias de estresse hídrico (figura 6 C). Por outro lado, a RB867515 começa a sofrer fotoinibição já a partir do segundo dia de déficit de água (figura 6 D). A maior redução no F_v/F_m do PSII às 11h, comparado com o observado às 4h 0,40 e 0,66 na RB855536 e 0,48 e 0,60 na RB867515 respectivamente (figura 6 C e D) é resultado da deficiência hídrica, somado ao efeito de temperaturas e irradiâncias elevadas observadas às 11h, podendo causar maiores danos aos tilacóides e prejuízos ao aparelho fotossintético.

A variedade RB855536 apresentou uma queda abrupta no F_v/F_m após quatro dias de seca, chegando a um F_v/F_m de 0,40, enquanto que na RB867515 a redução foi mais gradual, não reduzindo tanto, chegando a um F_v/F_m de 0,48 após oito dias de estresse. Do mesmo modo Subrahmanyam et al. (2006) mencionaram um efeito redutor mais pronunciado no F_v/F_m de variedades de trigo suscetíveis à seca.

De acordo com Baker & Rosenqvist (2004), a inativação do PSII e desorganização dos tilacóides são consideradas as maiores características do estresse a altas temperaturas. Uma folha com aparato fotoquímico intacto apresenta um F_v/F_m em torno de 0,75 e 0,85 (BOLHÀR–NORDENKAMPF et al. 1989), enquanto que uma redução nesses valores pode indicar fotoinibição.

A resposta das duas variedades ao estresse hídrico, observada às 11h, confirma o resultado apresentado na análise feita às 4h, a qual mostrou que após a reidratação, a RB867515 e a RB855536 tem capacidade similar de reparação dos danos provocados pela restrição hídrica ao aparato fotossintético (tabela 2). Já após a reidratação, a RB867515 não diferiu do controle com oito dias de seca.

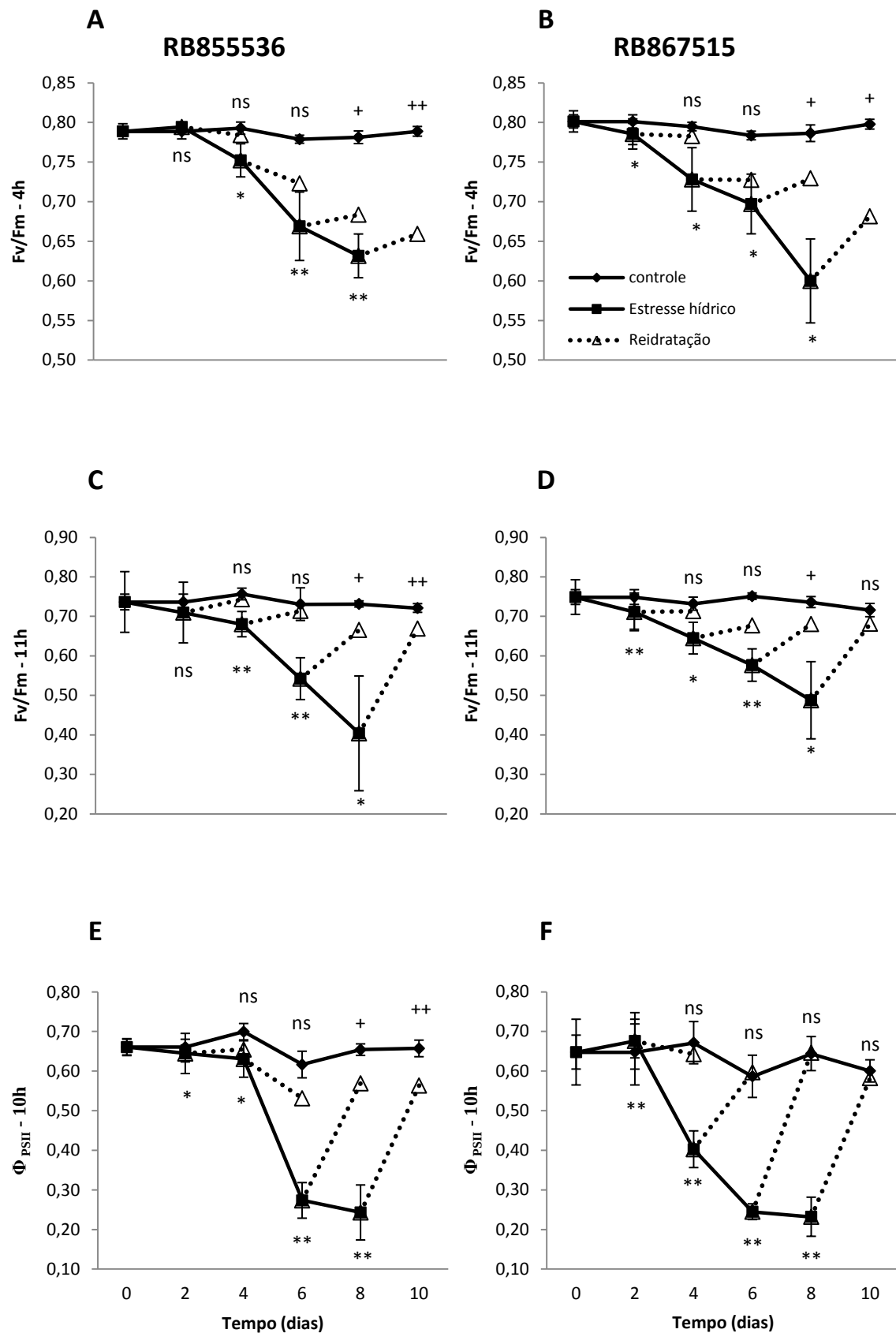


Figura 6 Máximo rendimento quântico do PSII (F_v/F_m) - 4h (A e B) e 11h (C e D) e rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) (E e F) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 (A, C e E) e RB867515 (B, D e F) submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio. ** e * comparam controle e estresse hídrico; ++ e + comparam controle e reidratação $P < 0,01$ e $P < 0,05$ pelo teste de t respectivamente. ns - não significativo.

Diminuições na eficiência fotossintética também foram observadas após sete dias de seca em feijão (MIYASHITA et al. 2005), gramíneas forrageiras (SILVA et al. 2006), e cana-de-açúcar (SILVA et al. 2007; GONÇALVES et al. 2010). Já Queiroz et al. (2002), mencionaram que não houve redução no F_v/F_m de aroeira-do-sertão, exposta a 14 dias de seca, mesmo havendo queda na taxa aparente de transporte de elétrons (ETR). Hao et al. (1999), relataram que o PSII foi principal local afetado pelo estresse hídrico em folhas de milho, atribuindo a perda funcional do PSII à degradação da proteína D1.

Segundo Zlatev & Yordanov (2004), a inibição da fotossíntese das plantas em relação à seca, é causada não apenas por lesões nas membranas dos tilacóides e transporte de elétrons, mas é resultado de distúrbios do ciclo de Calvin, atrasos na reoxidação da Q_A^- induzidos por baixa regulação do PSII, o que causa uma diminuição linear no transporte de elétrons, e consequentemente fotoinibição.

Tabela 1 Máximo rendimento quântico do PSII (F_v/F_m) - 4h e 11h e rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio. Médias de variedades, estado hídrico e tempo com letras iguais em colunas no mesmo atributo não diferem significativamente entre si $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Fator	Médias dos Fatores ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
Variedades	FvFm 4h	FvFm 11h	Φ_{PSII}
RB855536	0,716 a	0,674 a	0,558 a
RB867515	0,734 a	0,674 a	0,515 b
Estado hídrico			
Controle	0,784 a	0,740 a	0,636 a
Estresse	0,669 c	0,591 c	0,395 c
Reidratado	0,721 b	0,692 b	0,579 b
Tempo de estresse (dias)			
2 (dois)	0,788 a	0,726 a	0,607 a
4 (quatro)	0,750 a	0,695 a	0,594 a
6 (seis)	0,701 b	0,644 b	0,475 b
8 (oito)	0,660 c	0,633 b	0,470 b

O Φ_{PSII} (figura 6 E e F), apresentou redução significativa nas duas variedades analisadas em condições de estresse hídrico. A variedade RB855536 mostrou uma queda acentuada do Φ_{PSII} após quatro dias de estresse. Por outro lado, na RB867515 o declínio neste parâmetro ocorreu já a partir do segundo dia de seca. Após a reidratação, a variedade RB855536, recuperou a eficiência fotoquímica no mesmo patamar do controle, decaindo logo em seguida, com o aumento do estresse. Já a RB867515, apresentou recuperação do Φ_{PSII} até o oitavo dia de déficit hídrico. Este resultado indica que a variedade RB867515 possua maior

capacidade de recuperação do Φ_{PSII} que a RB855536 após sofrer estresse hídrico. Segundo Lemos-Filho (2000), as plantas frequentemente apresentam um marcante efeito fotoinibitório sob estresse hídrico severo, caracterizado por um decréscimo no rendimento quântico efetivo, isto em combinação com altos níveis de irradiância, pode causar uma significativa redução na eficiência fotossintética. Este mesmo autor observou em espécies do cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysenterica* e *Campomanesia adamantium*), diminuição do rendimento quântico efetivo do PSII durante a estação seca. Já Liberato et al. (2006) relataram queda na F_v/F_m e Φ_{PSII} em acariquara sob estresse hídrico. Constataram ainda que a F_v/F_m foi restabelecida quatro dias após a reidratação no entanto o Φ_{PSII} só atingiu valores semelhantes às plantas controle no sexto dia após a reidratação.

4.4 Avaliação de carboidratos

A variedade RB867515 teve 17% mais amido nas folhas do que a variedade RB855536 em condições normais de cultivo (Figura 7 A e B). Quando sob estresse hídrico a variedade RB867515 apresentou uma grande alteração na composição do amido no início do estresse, que foi menos intenso na RB855536.

Paralelo à diminuição nos teores de sacarose e aumento de hexoses nas duas variedades, constatam-se menores teores de amido no quarto e sexto dia de seca na RB855536. Já a variedade RB867515, apresentou menores quantidades de amido aos dois e quatro dias de estresse. Diminuições nos níveis de amido e sacarose em condições de estresse também foram observadas em soja (HUBER et al. 1984), assim como aumento de sacarose e amido após a reidratação. Este mesmo autor relata que durante a seca também houve aumento nos teores de glicose e frutose.

Já o teor de sacarose foi 32% maior na variedade RB855536 nas plantas em condições normais de cultivo (Figura 7 C e D). Em condições de estresse, a concentração de sacarose nas folhas diminuiu drasticamente nas duas variedades, com tendência de recuperação do conteúdo original quando colocado sob reidratação.

Uma diminuição da concentração de sacarose foi observada nas duas variedades a partir do segundo dia de estresse hídrico (figuras 7 C e D). A RB867515 apresentou decréscimo mais expressivo em torno de 42% a partir do quarto dia de seca (tabela 3). O controle apresentou os maiores níveis de sacarose nas duas variedades, seguido da reidratação e do estresse, que revelou os menores valores. Neste caso, sugere-se a ação da enzima invertase como fator chave na redução do teor de sacarose, e sua atividade tem sido muito

relatada em condição de estresse por vários pesquisadores (CHAVES, 1991; GOLDCHMIDT & HUBER, 1992; CATRILLO, 1992; LAWLOR & CORNIC, 2002). A invertase ácida solúvel (SAI) é composta pelo somatório das invertases do espaço externo (parede celular e vacúolo), quebrando a sacarose em hexoses, e assim, disponibilizando às células, carbono e energia para o processo de respiração e outras atividades metabólicas (LEITE et al. 2009).

As mudanças na atividade da enzima invertase induzidas pelo estresse hídrico geram modificações na relação invertase/hexoses e por conseguinte, conseqüências no conteúdo de carboidratos foliar, deste modo, o teor de sacarose da folha resulta do equilíbrio entre síntese, degradação e exportação, e a interpretação de sua variação ainda é complexa (PELLESCHI et al. 1997). Estes autores constataram uma modificação no metabolismo de carboidratos de folhas de milho sob estresse hídrico, o que levaram a um aumento do conteúdo de hexoses (glicose + frutose) dessas plantas associado a um estímulo na atividade da invertase e inibição da atividade da sintase sacarose fosfato (SPS). O mesmo pode ter ocorrido com as duas variedades de cana estudadas nesse experimento.

Em contraste à diminuição nos teores de sacarose, observou-se um aumento significativo dos teores de glicose e frutose nas duas variedades em razão do estresse hídrico, (figura 7 E, F, G e H). Fato que pode ser uma estratégia de adaptação das plantas às condições hídricas desfavoráveis ao crescimento, buscando realizar a osmorregulação, e assim forçar a absorção de água, diminuindo o efeito limitante da seca. Quando a regulação é insuficiente e o metabolismo não se ajusta para manter as funções metabólicas da célula, os danos eventualmente, resultam em morte celular (LAWLOR & CORNIC, 2002).

O teor de glicose nas folhas aumentou significativamente nas duas variedades quando as plantas foram colocadas sob estresse (Figura 7 E e F), atingindo 39,52 mmol kg⁻¹ na variedade RB855536 e 32,94 mmol kg⁻¹ MS na variedade RB867515 aos seis dias de estresse. Somente as plantas submetidas até quatro dias de estresse permaneceram com níveis de glicose mais elevados em relação ao controle quando reidratadas.

Aos quatro e seis dias de seca, os níveis de glicose da RB855536 subiram 222 e 134%, enquanto que na RB867515 o aumento foi de 216 e 367%, respectivamente (figura 7 B). Após a reidratação, observou-se na variedade RB855536 um acréscimo nos níveis de glicose com oito dias de seca em comparação ao controle, enquanto que a RB867515 apresentou redução nos valores de glicose a níveis muito baixos a partir do sexto dia de restrição hídrica.

Clifford et al. (1998) mencionaram um incremento significativo de hexoses em *Ziziphus mauritiana* após 13 dias de seca, sugerindo que esta alteração na partição de solutos é um importante fator na tolerância a seca.

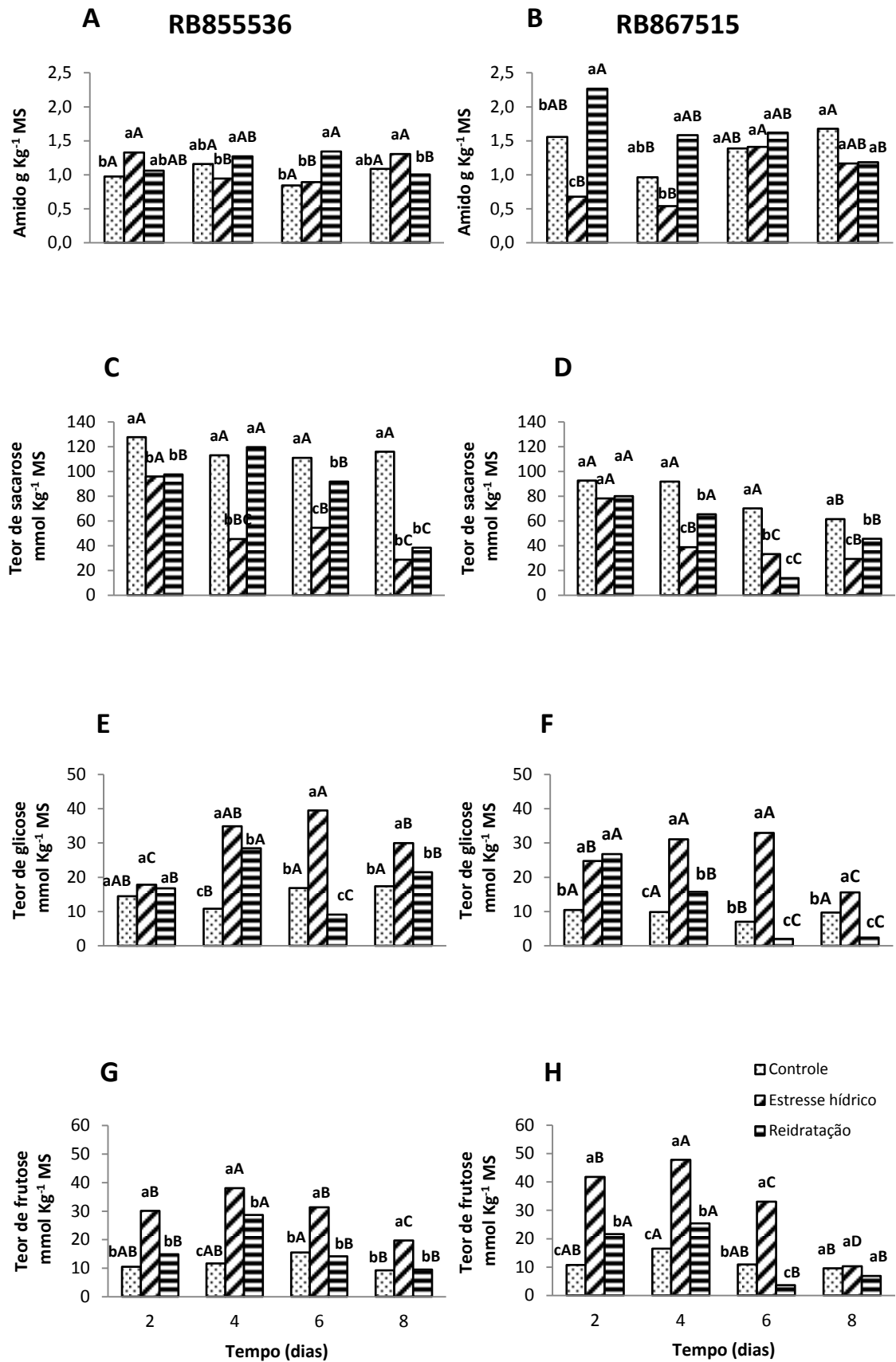


Figura 7 Teores de amido (A e B), sacarose (C e D), glicose (E e F), e frutose (G e H) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 (A, C, E e G) e RB867515 (B, D, F e H) submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio. Médias seguidas de letras iguais, tanto para condição hídrica dentro de um mesmo tempo (letras minúsculas), quanto para tempos na mesma condição hídrica (letras maiúsculas), não diferem estatisticamente entre si $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Os teores de frutose das duas variedades (figura 7 G e H), apresentaram respostas semelhantes às reveladas pela glicose sob déficit hídrico. Nota-se aumento nos níveis de frutose de 227 e 102% na variedade RB855536 com quatro e seis dias de limitação hídrica, enquanto que na RB867515 nas mesmas condições, quantificou-se incremento de 239 e 190% no segundo e quarto dia respectivamente. Níveis inferiores deste açúcar foram observados aos oito dias de seca nas duas variedades. Em geral, os teores de frutose em condição de déficit hídrico revelaram valores superiores quando comparados com o controle e a reidratação.

Tabela 2 Glicose, frutose, sacarose e amido das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio. Médias de variedades, estado hídrico e tempo com letras iguais em colunas no mesmo atributo não diferem significativamente entre si $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Fator	Médias dos Fatores (mmol kg ⁻¹ MS)			
Variedades	Glicose	Frutose	Sacarose	Amido
RB855536	22,06 a	19,41 a	86,51 a	21,39 b
RB867515	15,68 b	19,80 a	58,28 b	24,66 a
Estado hídrico				
Controle	12,95 c	11,78 c	97,81 a	23,49 b
Estresse	28,32 a	31,47 a	50,43 c	18,77 c
Reidratado	15,34 b	15,56 b	68,94 b	26,82 a
Tempo de estresse (dias)				
2 (dois)	18,49 b	21,57 b	95,21 a	25,56 a
4 (quatro)	22,69 a	27,95 a	78,91 b	20,59 c
6 (seis)	18,22 b	18,05 c	62,33 c	22,44 bc
8 (oito)	16,07 c	10,84 d	53,13 d	23,51 ab

Após a reidratação, os teores de frutose decaíram nas duas variedades a partir do sexto dia de estresse hídrico. Esse resultado também foi observado na glicose, sugerindo que o estresse hídrico tenha afetado a atividade de enzimas responsáveis pela síntese e degradação de carboidratos, provavelmente sacarose sintase e invertase.

Keller & Ludlow (1993) também observaram reduções nos teores de amido e sacarose em folhas de guandu sob estresse hídrico, como também elevações nos níveis de glicose e frutose, além de aumentos na atividade de enzimas responsáveis pela quebra de amido (amilase) e sacarose (invertase).

Liu et al. (2004) pesquisando o efeito da seca na distribuição de carboidratos em folhas de soja, relataram diminuição de sacarose e amido, e incrementos nas concentrações de glicose e frutose foliar, como consequência da redução da fotossíntese e ψ_w , contudo sem alterações na atividade da invertase solúvel.

Pelleschi et al. (1997) observaram um incremento nos teores de glicose e frutose em folhas de milho após três dias de estresse hídrico, onde também foi observado um aumento no teor de sacarose porém em menor grau, e sem correlação com a atividade da invertase ácida e SPS.

Estas alterações na composição relativa de carboidratos, indicam que a elevação nos níveis de glicose e frutose se deram às custas de sacarose e amido, porém, para tal comprovação, seria necessário um estudo mais aprofundado a respeito da atividade de enzimas responsáveis pela síntese e degradação desses açúcares.

4.5 Atividade de enzimas antioxidantes

As duas variedades de cana tiveram aumento da atividade de enzimas antioxidantes quando submetidas ao estresse hídrico (figura 8). A RB855536, apresentou um aumento de 61% na atividade da CAT com oito dias de déficit hídrico em comparação com controle, o qual se manteve constante (figura 8 A). Espécies reativas de oxigênio produzidas sob altas temperaturas, provocam estresse oxidativo produzido pelo calor, ativando respostas celulares, como alta regulação antioxidativa (ALMESELMANI et al. 2006).

Já na RB867515 (figura 8 B), constataram-se elevações de 76% na atividade da CAT com oito dias de déficit hídrico em relação ao controle. Nos demais estados hídricos avaliados (controle e reidratação), a atividade foi estável não diferindo em nenhuma destas condições nos períodos analisados.

Analisando a atividade da CAT nas duas variedades, sugere-se que a RB867515 possua melhor mecanismo de ativação dessa enzima em condições de déficit hídrico, visto que a atividade da CAT apresentou valores mais elevados nessa variedade (tabela 4), o que provavelmente poderá implicar em maior tolerância da RB867515 a seca, em contraste a RB855536. A aparente tolerância de um genótipo ao estresse hídrico, que reflete sua peroxidação lipídica comparativamente com índices inferiores e superiores de estabilidade da membrana, conteúdos de clorofila e carotenóides, estão intimamente associadas com as propriedades do sistema de enzimas antioxidantes (ARORA et al. 2002).

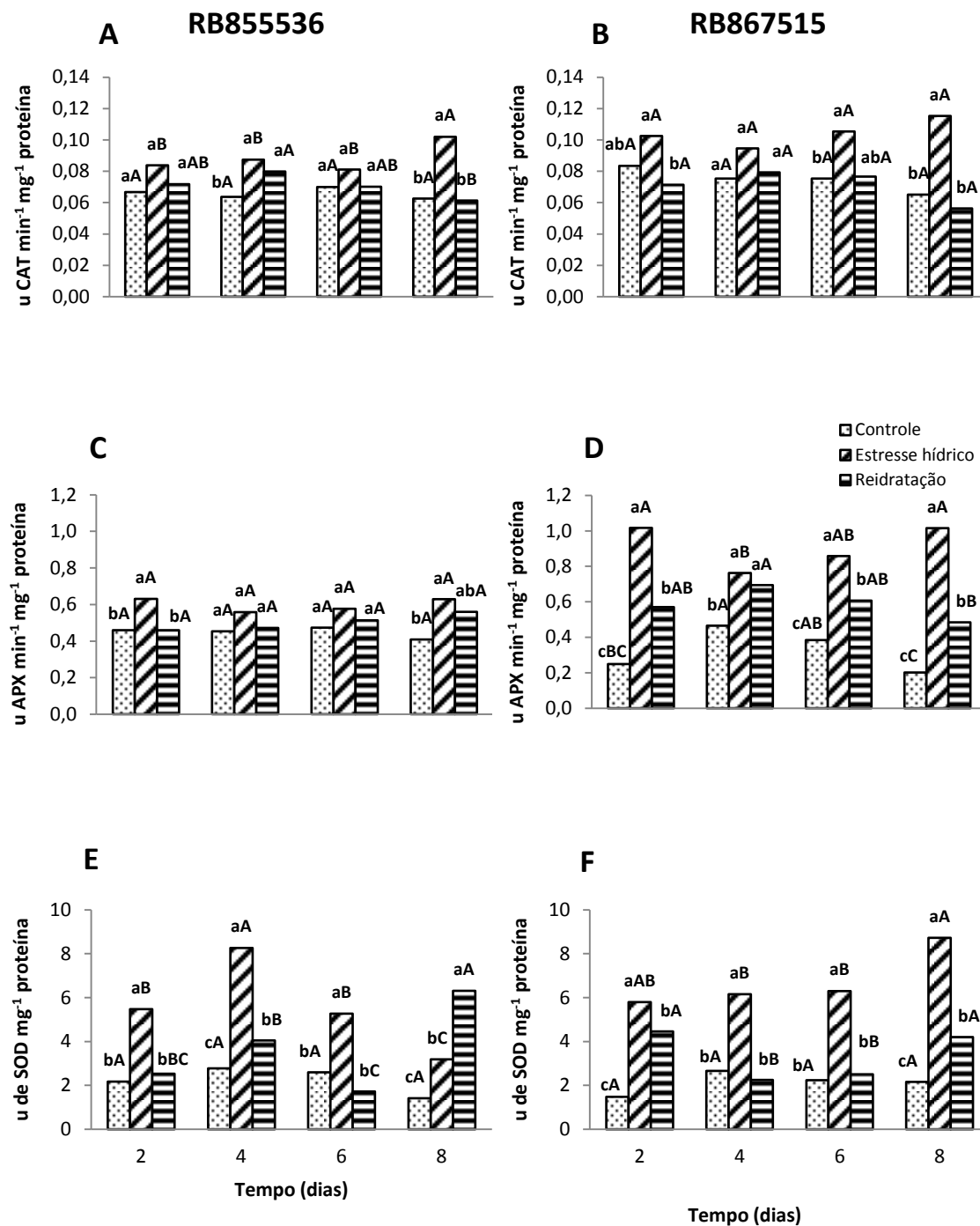


Figura 8 Atividade de enzimas antioxidantes: catalase (A e B), ascorbato peroxidase (C e D) e superóxido dismutase (E e F) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 (A, C e E) e RB867515 (B, D e F) submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio. Médias seguidas de letras iguais, tanto para condição hídrica dentro de um mesmo tempo (letras minúsculas), quanto para tempos na mesma condição hídrica (letras maiúsculas), não diferem estatisticamente entre si $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

As duas variedades apresentaram incrementos na atividade da ascorbato peroxidase (APX) sob deficiência hídrica em relação ao controle (figura 8 C e D). Na RB855536 houve atividade superior desta enzima de 37 e 54% em relação ao controle com dois e oito dias de

restrição hídrica respectivamente, não demonstrando diferenças significativas nos demais períodos quando comparados estresse hídrico, controle e reidratação.

A variedade RB867515 mostrou diferenças significativas na atividade da APX em todos os tempos sob estresse hídrico em comparação ao controle (figura 8 D). Os tratamentos estressados tiveram maior atividade quanto às demais condições hídricas, exceto aos quatro dias de seca onde apresentaram atividade semelhante ao tratamento reidratado. Foi observado ainda, que sob estresse, não houve acréscimo na atividade da APX com o aumento do período de exposição à seca. Após a reidratação a atividade da APX foi superior a apresentada pelo controle em todos os tempos estudados. O estresse hídrico somado com a temperatura elevada provavelmente contribuiu com esse resultado.

Tabela 3 Enzimas antioxidantes: catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio. Médias de variedades, estado hídrico e tempo com letras iguais em colunas no mesmo atributo não diferem significativamente entre si $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Fator	Médias dos Fatores ($\text{u min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína)		
Variedades	SOD	CAT	APX
RB855536	3,81 a	0,075 b	0,51 b
RB867515	4,20 a	0,084 a	0,61 a
Estado hídrico			
Controle	2,18 c	0,070 b	0,39 c
Estresse	6,28 a	0,097 a	0,75 a
Reidratado	3,56 b	0,072 b	0,54 b
Tempo de estresse (dias)			
2 (dois)	4,01 a	0,080 a	0,56 a
4 (quatro)	4,24 a	0,082 a	0,56 a
6 (seis)	3,33 b	0,079 a	0,57 a
8 (oito)	4,44 a	0,078 a	0,55 a

Vasconcelos et al. (2009) verificaram elevações bem superiores na atividade da APX em relação às constatadas pelo presente estudo, ($25,3$ e $28,5 \text{ u mg}^{-1}$ Proteína) em milho e soja respectivamente aos 42 dias sob seca. Silva (2010), comparando três variedades com três clones de cana-de-açúcar cultivadas em casa de vegetação, relatou um leve aumento na atividade da APX sob estresse hídrico severo, ao passo que também observou incrementos na atividade da SOD e CAT sob deficiência hídrica.

Sofo et al. (2005), também mencionaram maior atividade da CAT, SOD e APX em folhas de oliveiras sob déficit hídrico severo, indicando que a regulação do sistema

antioxidante pode ser uma importante ferramenta de tolerância a seca, ajudando a diminuir o dano celular causado por espécies reativas de oxigênio.

A atividade da SOD apresentou aumento em resposta ao estresse hídrico nas duas variedades (figura 8 E e F). Verificou-se na RB855536 maior atividade da SOD do início da suspensão hídrica até o sexto dia, com maior nível de atividade no quarto dia, diferindo significativamente do controle e da reidratação. A partir deste ponto a atividade da SOD apresentou queda. Após a reidratação a atividade da SOD manteve-se estável até o sexto dia de déficit hídrico, não apresentando diferença significativa com o decorrer do tempo de estresse. Nestas condições, diferiu do controle com dois e oito dias de estresse, revelando, neste último, maior atividade entre os tratamentos reidratados. Provavelmente após este período de seca, mesmo reidratada, a planta começa a apresentar distúrbios semelhantes aos tratamentos sob estresse, visto que a resposta da atividade enzimática após a reidratação já não difere da observada nos tratamentos estressados.

Por outro lado, diferentemente da variedade RB855536, a RB867515 mostrou nos tratamentos estressados, um incremento na atividade da SOD com o aumento do período de exposição à seca, diferindo significativamente do controle em todos os tempos avaliados. Após a reidratação não se observou diferenças significativas entre os tratamentos reidratados, contudo aos dois e oito dias de déficit hídrico a reidratação apresentou maior atividade da SOD em relação ao controle.

Zhang & Kirkham (1994), mencionaram a elevação na atividade da SOD em genótipos de trigo no início da exposição à seca, no entanto observaram uma queda na atividade desta enzima com o aumento do período de estresse. Um comportamento semelhante foi mostrado pela variedade RB855536 no presente trabalho.

Sairam et al. (1998) comparando genótipos de trigo sensíveis e tolerantes à seca, observaram maior atividade da CAT e APX no genótipo tolerante em relação ao suscetível, enquanto que a atividade da SOD não mostrou diferença significativa entre tratamentos bem irrigados em relação aos estressados. Sairam & Srivastava (2001), em outro estudo também comparando a tolerância de genótipos de trigo ao estresse hídrico, relataram aumento na atividade da SOD sob estresse hídrico, no entanto sem demonstrar diferenças entre genótipos.

Chugh et al. (2011) notaram aumento na atividade da APX de genótipos de milho tolerantes em resposta à seca, e declínio nos genótipos sensíveis, ao mesmo tempo, observaram atividade da SOD ligeiramente superior em genótipos tolerantes sob estresse hídrico, enquanto que os genótipos sensíveis mostraram uma inibição significativa na atividade desta enzima.

Propõe-se que a variedade RB867515 possua melhores mecanismos antioxidantes em relação a RB855536, visto que a RB867515 apresentou maior atividade em todas as enzimas antioxidantes analisadas, o que pode se configurar em maior tolerância desta variedade ao estresse hídrico. Allen (1995) menciona que a atividade de uma ou mais destas enzimas é geralmente maior em plantas expostas a condições de estresse e a elevação da atividade correlaciona-se com maior tolerância ao estresse.

5 CONCLUSÕES

Ambas as variedades apresentaram uma diminuição nos níveis de amido e sacarose, e incremento de glicose e frutose com o aumento da seca, não sendo um bom indicador para discernir variedades quanto à sensibilidade à seca.

A variedade RB867515, considerada mais resistente à seca, apresentou maior atividade da CAT e APX, além de atividade crescente da SOD com aumento do tempo de seca em relação à variedade RB855536, considerada mais sensível à seca. Isso talvez tenha possibilitado uma menor redução do F_v/F_m e Φ_{PSII} ao meio dia da variedade RB867515. Esses mecanismos podem estar associados à maior resistência dessa variedade a seca em relação a RB855536, sugerindo a sua utilização como marcador fisiológico para a resistência à seca.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, R.D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. **Plant Physiology**, v.107, p.1049–1054, 1995.
- ALMESELMANI, M. et al. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. **Plant Science**, v.171, p.382-388, 2006.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.373–399, 2004.
- APTA. **Desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar para as regiões de expansão da canavieira brasileira** In: Workshop de melhoramento e biotecnologia da cana-de-açúcar, São Paulo, 2007. Disponível em <http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/termo_referencia_melhoramento.pdf>. Acesso em: 11 out. 2010.
- ARO, EM. et al. Recovery from photoinhibition in Peas (*Pisum sativum* L.) Acclimated to varying to growth irradiances. **Plant Physiology**, v.104, p.1033-1041, 1994.
- ARORA, A. et al. Oxidative stress and antioxidative systems in plants. **Current Science**, v.82, p.1227–1238, 2002.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v.85, p.235–241, 1992.
- ASADA, K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.601–639, 1999.
- BAKER, N.R. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.89-113, 2008.
- BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1607-1621, 2004.
- BARBOSA, T.P. **Potencial hídrico, osmótico e acúmulo de solutes em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) submetidas a dois regimes hídricos**. 2010. 37 f. TCC (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2010.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v.44, p.276–287, 1971.
- BERGONCI, J.I. et al. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n.8, p. 1531-1540, 2000.

- BIEHLER, K.; FOCK, H. Evidence for the contribution of the mehlner-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. **Plant Physiology**, v.112, p.265-272, 1996.
- BILGER, W. et al. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, v.102, p.425-432, 1995.
- BILGIN, D.D. **ROS, oxidative stress and engineering resistance in higher plants**. In: S. Dutta Gupta (ed), Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants, Science Publishers, USA, 2010.
- BJÖRKMAN, O.; DEMMING, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v.170, p.489-504, 1987.
- BLUM, A. et al. Genetically engineered plants resistant to soil drying and salt stress: How to interpret osmotic relations? **Plant Physiology**, v.110, p.1051–1053, 1996.
- BOHNERT, H.J.; JENSEN, R.G. Strategies for engineering water- stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, v.14, p.89–97, 1996.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R. et al. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. **Functional Ecology**, v.3, p.497-514, 1989.
- BOYER, J.S. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean and sunflower at various leaf water potentials. **Plant Physiology**, Rockville, v.46, n.2, p.233-235, 1970.
- BRADFORD, M.A. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAY, E.A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v.2. p.48–54, 1997.
- BREUSEGEM, F.V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.405-414, 2001.
- CAMPOSTRINI, E. **Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas**. 2001. Disponível em <<http://www.uenf.br/downloads/ApostiladeFluorescencia.pdf>>. Acesso em: 22 dez. 2010.
- CASTRILLO, M. Sucrose metabolism in bean plants under water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v.43, p.1557–1561, 1992.
- CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**, v.42, p.1-16, 1991.
- CHAVES, M.M. et al. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, v.89, p.907–916, 2002.

- CHEN, C.N.; PAN, S.M. Assay of superoxide dismutase activity by combining electrophoresis and densitometry. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, V.37, p.107–111, 1996.
- CHUGH, C. et al. Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v.48, p.47-53, 2011.
- CLIFFORD, S.C. et al. The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.967–977, 1998.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira. Cana-de-açúcar. Safra 2010/2011.** Terceiro levantamento jan./2011, Brasília, 2011, 19 p. Disponível em <www.conab.gov.br/.../11_01_06_09_14_50_boletim_cana_3o_lev_safra_2010_2011..pdf>. Acesso em 10 mar. 2011.
- DA MATTA F.M. et al. Photosynthetic performance of two coffee species under drought. **Photosynthetica**, v.34, p.257-264, 1997.
- DAT, J. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.57, p.779–795, 2000.
- DEER, N. **A text book on the agriculture of the sugar cane the manufacture of cane sugar, and the analysis of sugar house products.** Londres: Norman Rodger, 1911.
- ENDRES, L. et al. Photosynthesis and water relations in brazilian sugarcane. **The Open Agriculture Journal**, v.4, p.31 – 37, 2010.
- GIANNOPOLITS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309–314, 1977.
- GOLDSCHMIDT, E.E.; HUBER, S.C. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. **Plant Physiology**, Rockville Pike, v.99, p.1443-1448, 1992.
- GONÇALVES, E.R. et al. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.4, p.378-386, 2010.
- GRAÇA, J.P. et al. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.22(3): p.189-197, 2010.
- HAO, L. et al. Effects of water stress and rewatering on turnover and gene expression of photosystem II reaction center polypeptide D1 in *Zea mays*. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.26, p.375-378, 1999.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450-455, 1987.

- HEMEPRABHA, G. et al. Responses of sugarcane genotypes to water deficit stress. **Sugar Tech**, v.6(3): p.165-168, 2004
- HOEKSTRA, F.A. et al. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends and Plant Science**, v.6 (9): p.431-438, 2001.
- HSIAO, T.C.; XU, L.K. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. **Journal of Experimental Botany**, v.51 (350): p.1595-1616, 2000.
- HUBER, S.C. et al. Effects of water stress on photosynthesis and carbon partitioning in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants grown in the field at different CO₂ levels. **Plant Physiology**, v.76, p.244-249, 1984.
- INMAN-BAMBER, N.G.; SMITH, D.M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v.92, p.185-202, 2005.
- KELLER, F.; LUDLOW, M.M. Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*), **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.1351-1359, 1993.
- KOMOR, E. **The physiology of sucrose storage in sugarcane**. In: GUPTA, A. K. and KAUR N. Carbohydrate Reserves in Plants - Synthesis and Regulation. Cap 2. p. 35-53, 2000.
- KRAUSE, G.H.; WEISS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.313-349, 1991.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000.
- LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.275-294, 2002.
- LEITE, G.H.P. et al. reguladores vegetais e atividade de invertases em cana-de-açúcar em meio de safra. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p.718-725, 2009.
- LEMOS-FILHO, J.P. Fotoinibição em três espécies do cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysenterica* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e na chuvosa. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, p.45-50, 2000.
- LEMOS-FILHO, J. P.; ISAIAS, R. M. S. Comparative stomatal conductance and chlorophyll *a* fluorescence in leaves vs. fruits on the cerrado legume tree, *Dalbergia miscolobium*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.16(2), p.89-93, 2004.
- LIBERATO, M.A.R. et al. Leaf water potential, gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence in acariquara seedlings (*Minquartia guianensis* Aubl.) under water stress and recovery. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.315-323, 2006.
- LIU, F. et al. Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set, **Field Crops Research**, v.86, p.1-13, 2004.

LUNN, J.E.; HATCH, M.D. Primary partitioning and storage of photosynthate in sucrose and starch in leaves of C₄ Plants. **Planta**, v. 197, p. 385-391, 1995.

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

McCLUNG, C.R. Regulation of catalase in Arabidopsis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.23, p.489–496, 1997.

McCORMICK, A.J. et al. Culm sucrose accumulation promotes physiological decline of mature leaves in ripening sugarcane. **Field Crops Research**, v.108, p.250–258, 2008.

MENESES, C.H.S.G. et al. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 10, n. 1/2, p. 1039-1072, 2006.

MHAMDI, A. et al. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v.61, N.15, p.4197–4220, 2010.

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

MIYASHITA, K. et al. Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.53, p.205-214, 2005.

MOLINARI, H.B.C. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): Osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v.130, n.2, p.218-225, 2007.

MORAES, G. A. B. K. et al. Why is it better to produce coffee seedlings in full sunlight than in the shade? A morphophysiological approach. **Photosynthetica**, v.48 (2), 199-207, 2010.

MULLET, J.E.; WHITSITT, M. S. Plant cellular responses to water deficit. **Plant Growth Regulation**, v.20, p.119–124, 1996.

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

PAPINI-TERZI F.S. et al. Sugarcane genes associated with sucrose content. **BMC Genomics**, v.10, p.120, 2009.

PELLESCHI, S. et al. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves, **Plant, Cell and Environment**, v.20, p.493–503, 1997.

PITZSCHKE, A. et al. Reactive oxygen species signaling in plants. **Antioxidants and Redox Signaling**, V.8, p.1757-1764, 2006.

PRADO JR. História econômica do Brasil. 37ª ed. São Paulo: Brasiliense, 1976

QUEIROZ, C.G.S. et al. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.14(1), p.59-63, 2002.

RIBAS-CARBO, M. et al. Effects of water stress on respiration in soybean leaves. **Plant Physiology**, v.139, p.466-473, 2005.

RODRIGUES, F.A. **Comparação do padrão de expressão gênica de plantas de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis à deficiência hídrica**. 2008. 120 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Unesp, 1995. 75 p.

ROHÁČEK, K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. **Photosynthetica**, v.40, p.13-29, 2002.

SAIRAM, R.K. et al. Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. **Biologia Plantarum**, v.41(3), p.387-394, 1998.

SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.186, p. 63-70, 2001.

SALIENDRA, N.Z.; MEINZER, F.C. Symplast volume, turgor, stomatal conductance and growth in relation to osmotic and elastic adjustment in droughted sugarcane. **Journal of Experimental Botany**, v.42, p.1251-1259, 1991.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1305-1319, 2002.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.221-227, 2007.

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

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

SILVA, M.M.P. et al. Eficiência fotoquímica de gramíneas forrageiras tropicais submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.67-74, 2006.

SILVA, P.B. **Aspectos fisiológicos de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos a estresse hídrico**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2010.

SILVA, S. et al. Respostas fisiológicas de gramíneas promissoras para revegetação ciliar de reservatórios hidrelétricos, submetidos à deficiência hídrica. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.124-133, 2001.

SINGH, R.; MALHOTRA, S.P. Carbon fixation, sucrose synthesis and its transport to storage tissues. In: GUPTA, A.K. and KAUR N. **Carbohydrate Reserves in Plants - Synthesis and Regulation**. Cap 1, p. 1-34, 2000.

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

SNYDER, K.A. et al. Night-time conductance in C_3 and C_4 species: do plants lose water at night? **Journal of Experimental Botany**, v.54, p.861–865, 2003.

SOFO, A. et al. Antioxidant defences in olive tree during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. **Functional Plant Biology**, v.32, p.45–53, 2005.

SOUZA, C.S. et al. Avaliação de métodos de determinação de água disponível em solo cultivado com algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.337-341, 2002.

SOUZA, R.P. et al. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environmental and Experimental Botany**, v.51, p.45–56, 2004.

STITT, M. et al. Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. **Methods in Enzymology**, v.174, p.518-552, 1989.

SUBRAHMANYAM, D. et al. Influence of water stress on leaf photosynthetic characteristics in wheat cultivars differing in their susceptibility to drought. **Photosynthetica**, v.44, p.125–129, 2006.

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

TRETHEWEY, R.N. et al. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. **The Plant Journal**, v.15, p.109-118, 1998.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DO ESTADO DE SÃO PAULO. **A Energia da Cana-de-Açúcar – Doze estudos sobre a agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil e a sua sustentabilidade**. Isaias de C. M. (org.) São Paulo, 2005. Disponível em <www.unica.com.br>. Acesso em: 03 dez. 2010.

VASCONCELOS, A.C.F. et al. Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. **Scientia Agricola**, v.66 (3), p.395-402, 2009.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations, **Current Opinion Biotechnology**, v.16, p.123–132, 2005.

VRANOVÁ, E.; BREUSEGEM, F.V. et al. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.1227–1236, 2002.

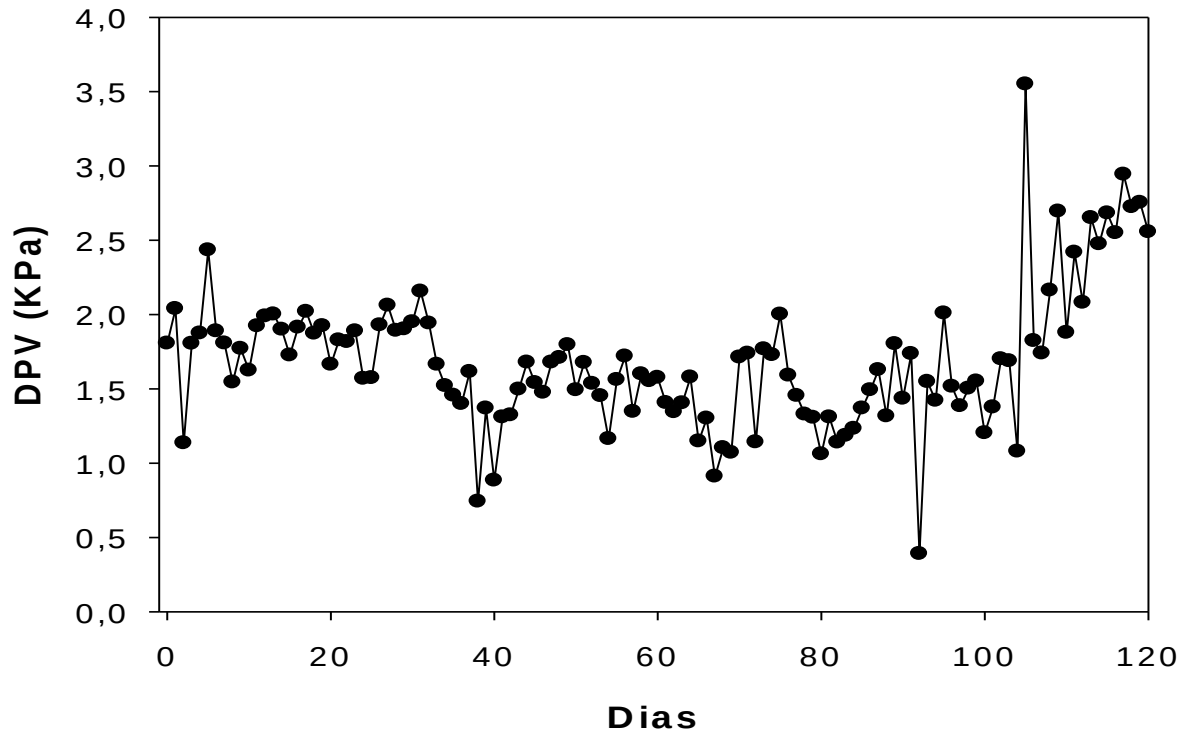
WINTER, H.; HUBER, S.C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.35(4): p.253-289, 2000.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M.B. Drought-stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidases in wheat leaves. **Plant and Cell Physiology**, v.35, p.785-791, 1994.

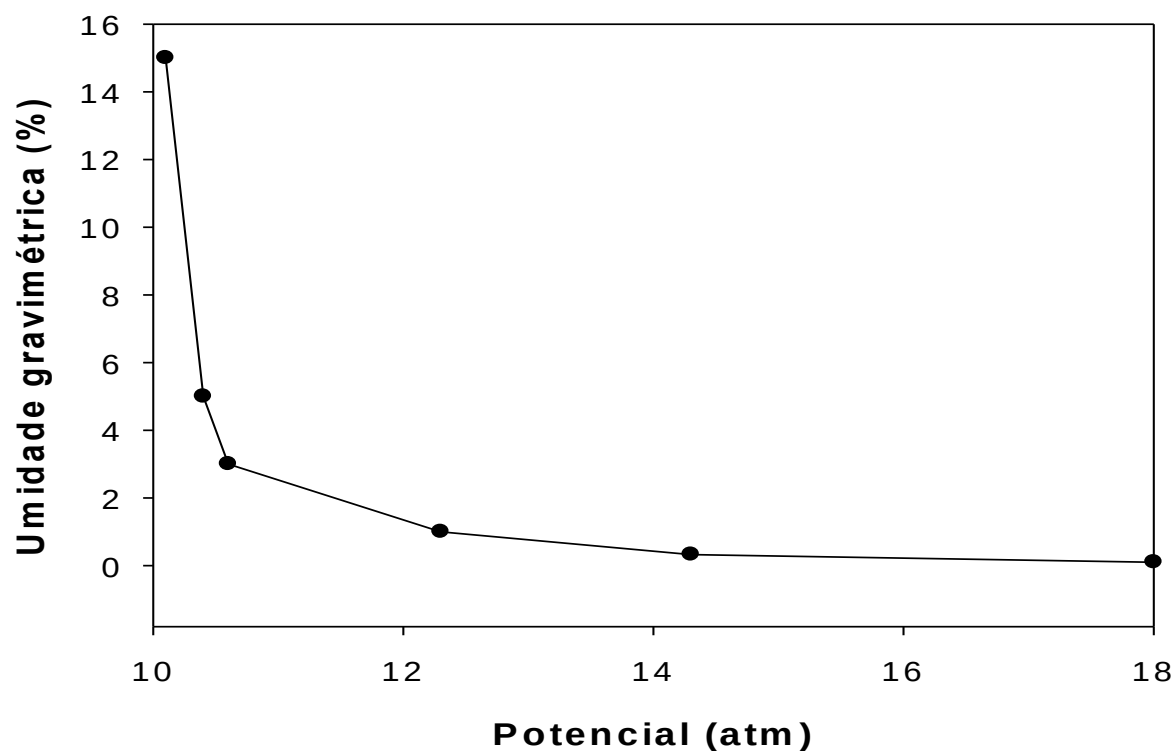
ZHANG, S.Z. et al. Expression of the *Grifola frondosa* trehalose synthase gene and improvement of drought-tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L). **Journal of Integrative Plant Biology**, v.48(4): p.453-459, 2006.

ZHU, Y.J. et al. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regaled by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. **Plant Physiology**, v.115, p.609-616, 1997.

ZLATEV, Z.S.; YORDANOV, I.T. Effects of soil drought on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in beans plants. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, V.30, p.(3-4), 3-18, 2004.

APÊNDICES

Apêndice A Dados diários de déficit de pressão de vapor (DPV) registradas dentro da casa de vegetação durante o período experimental.



Apêndice B Curva característica de retenção de água no solo, utilizado no cultivo das variedades RB855536 e RB867515.

Apêndice C Análise de variância (valores de F) para máximo rendimento quântico do PSII (F_v/F_m) - 4h e 11h e rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Fator de Variação	Variáveis Fisiológicas		
	FvFm 4h	FvFm 11h	Φ_{PSII}
Variedades (V)	1,57ns	0,00*	5,27*
Estado hídrico (Eh)	21,90**	47,37**	59,91**
Tempo em dias (T)	15,60**	11,86**	15,61**
V x Eh	0,63ns	0,15ns	5,18**
V x T	2,05ns	4,34**	2,49ns
Eh x T	4,29**	5,79**	5,31**
V x Eh x T	1,18ns	1,69ns	2,78*
CV (%)	9,56	9,21	17,14

Apêndice D Análise de variância (valores de F) para teores de glicose, frutose, sacarose e amido das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Fator de Variação	Açúcares Solúveis			
	GLI	FRU	SAC	AMIDO
Variedades (V)	138,33**	0,42ns	227,37**	17,33**
Estado hídrico (Eh)	309,93**	403,28**	216,82**	35,41**
Tempo em dias (T)	26,02**	140,95**	98,39**	6,99**
V x Eh	3,11ns	7,92**	20,86**	30,01**
V x T	48,98**	20,27**	12,47**	4,94**
Eh x T	54,98**	33,03**	16,55**	7,95**
V x Eh x T	9,96**	7,99**	14,17**	8,13**
CV (%)	14,07	15,01	12,67	16,70

Apêndice E Análise de variância (valores de F) para enzimas antioxidantes catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas a estresse hídrico e reidratação, cultivadas em casa de vegetação aos 121 dias após o plantio. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

Fator de Variação	Enzimas Antioxidantes		
	SOD	CAT	APX
Variedades (V)	3,87ns	9,54**	25,90**
Estado hídrico (Eh)	147,93**	36,23**	107,99**
Tempo em dias (T)	5,99**	0,34ns	0,23ns
V x Eh	11,32**	0,94ns	39,89**
V x T	6,64**	0,86ns	1,53ns
Eh x T	7,23**	5,16**	5,82**
V x Eh x T	11,62**	0,51ns	2,55*
CV (%)	24,17	17,63	17,30

Apêndice F Análise química do solo, utilizado como substrato para o cultivo das variedades de cana-de-açúcar RB855536 e RB867515, submetidas ao estresse hídrico e reidratação.

Resultado de análise de solo													
pH			g./dm ³	mg/dm ³	mmolc/dm ³ TFSA						%	Relações	
CaCl ₂	Água	SMP	MO	P	K	Ca	Mg	H + Al	SB	CTC	V%	Ca/Mg	Mg/K
4,5	5,7	5,8	27	17	1,3	11	5	52	17,3	69,3	24,9	2,2	3,84