



UFAL

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



CECA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE SEIS GENÓTIPOS DE CANA-DE-  
AÇÚCAR SUBMETIDOS A ESTRESSE HÍDRICO**

**PEDRO BENTO DA SILVA**

RIO LARGO, ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL  
JULHO DE 2010

**Pedro Bento da Silva**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE SEIS GENÓTIPOS DE CANA-DE-  
AÇÚCAR SUBMETIDOS A ESTRESSE HÍDRICO**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Alagoas  
como parte das exigências do  
programa de Pós-Graduação em  
Produção Vegetal e Proteção de  
Plantas, para obtenção do título  
de mestre em agronomia.**

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vilma Marques Ferreira

Co-Orientador: Prof. Dr. José Vieira Silva

**RIO LARGO, ESTADO DE ALAGOAS, BRASIL  
JULHO DE 2010**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecária: Lucia Lima do Nascimento

S586a Silva, Pedro Bento da.  
Aspectos fisiológicos de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos a estresse hídrico. / Pedro Bento da Silva, 2010.  
89 f. : grafs., tabs. ; 30 cm.

Orientador: Vilma Marques Ferreira.

Co-orientador: José Vieira Silva.

Dissertação (mestrado em Agronomia: Produção Vegetal e Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2010.

Bibliografia: f. [80]-89.

Apêndices. f. 91-[96].

1. Cana-de-açúcar – deficiência hídrica. 2. Cana-de-açúcar – tolerância à seca  
3. *Saccharum*. 4. Cana-de-açúcar – osmorreguladores. 5. Cana-de-açúcar – defesa oxidativa. I. Título.

CDU: 633.61

**TERMO DE APROVAÇÃO**

PEDRO BENTO DA SILVA  
08130103

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE SEIS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR  
SUBMETIDOS A ESTRESSE HÍDRICO**

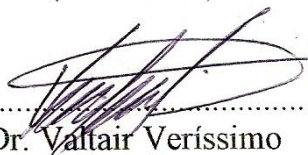
Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas. A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovado em 07/07/2010

**BANCA EXAMINADORA**



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vilma Marques Ferreira  
(Orientador)



Dr. Valtair Veríssimo



Prof. Dr. José Vieira Silva



Prof. Dr. Mauro Wagner de Oliveira

*Primeiramente a Deus, Criador do Céu e da Terra pelo dom da vida...*

*Aos meus amados pais, e Manoel Bento (in memoriam) e Edite Ribeiro pela educação e incentivo...*

*Aos meus irmãos: Francisco Bento, Maria Célia e Quitéria Bento pelo apoio, amor fraterno e companheirismo de sempre...*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL) pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

À Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias (CECA) pela possibilidade de ingresso no curso de graduação e posteriormente na pós-graduação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vilma Marques Ferreira pela orientação confiança e ensinamento durante a jornada de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. José Vieira Silva pela confiança e ensinamentos como co-orientador.

Aos colegas de laboratório Manoel Vitor, Débora Teresa, Eduardo Rebelo, Tadeu Patêlo, Weverton Góes, Polyana da Silva, Humberto Cristiano, Antonio Henrique, Laís Fernanda, Israel Mariano, Filipe Cardoso, Romel Vilela e Clênio Santana pela ajuda na instalação do experimento e análises laboratoriais.

Aos colegas de Turma de mestrado Hully Monaíse, Carlos Jorge, Alice Maria, Maria Quitéria, Ricardo Araújo, Renan Cantalice, Sihélio Julio, Silvia Sianiele e aos demais pelo companheirismo, partilha e lutas nas disciplinas.

Aos Professores Paulo Vanderlei Ferreira, Mauro Wagner de Oliveira, José Paulo Vieira da Costa, Laurício Endres, Iracilda Maria de Moura Lima e Leila de Paula Rezende pela contribuição e ensinamento no mestrado

À Residência Universitária Alagoana (RUA), pela estadia e aprendizado durante minha vida acadêmica.

Ao programa de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PMGCA), pelo apoio logístico.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

À Secretaria do curso da Pós-Graduação nas pessoas de Geraldo e Marcos...

...Meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE APÊNDICES</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	18
2.1 Deficiência hídrica.....	20
2.2 Resposta ao déficit hídrico.....	20
2.3 Estresse oxidativo.....	22
2.4 Ajustamento osmótico.....	23
<b>2.5 Cana-de-açúcar.....</b>	24
2.5.1 Aspectos gerais.....	24
2.5.2 Características agronômicas.....	25
<b>2.6 Respostas da cana-de-açúcar ao estresse hídrico.....</b>	26
2.6.1 Crescimento.....	27
2.6.2 Relações hídricas.....	28
2.6.3 Pigmentos fotossintéticos e clorofila <i>a</i> .....	21
<b>CAPÍTULO 1: Fluorescência do fotossistema II e pigmentos fotossintéticos em genótipos de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica.....</b>	31
1.1 Introdução.....	31
1.2 Material e Métodos.....	32
1.3 Resultados e Discussão.....	34
1.4 Conclusões.....	44
<b>CAPÍTULO 2: Osmorreguladores e defesa oxidativa de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica.....</b>	45
2.1 Introdução .....	45
2.2 Material e Métodos .....	46
2.3 Resultado e Discussão .....	53
2.4 Conclusões.....	64

<b>CAPÍTULO 3: Desenvolvimento inicial de seis genótipos de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica.</b>	65
3.1 Introdução .....	65
3.2 Material e Métodos .....	66
3.3 Resultados e Discussão .....	68
3.4 Conclusões .....	79
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	80
<b>APÊNDICES.....</b>	90



## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO 1: Fluorescência do fotossistema II e pigmentos fotossintéticos em seis genótipos de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica</b>		Pág.
<b>TABELA 1.1</b>	Valores de F obtidos da análise de variância para atributos fisiológicos: $\psi_w$ , Fv/Fm, índice SPAD em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação. .....	35
<b>TABELA 1.2</b>	Leituras quinzenais de eficiência quântica potencial (Fv/Fm) e efetiva ( $\Phi_{PSII}$ ), em dois horários, de seis genótipos de cana-de-açúcar ao submetidos ao tratamento controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 após o plantio.Os valores representam as médias de quatro épocas de leituras distintas.....	38
<b>TABELA 1.3</b>	Índice SPAD e em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação.....	40
<b>TABELA 1.4</b>	Valores de F obtidos da análise de variância para clorofila a (Chl <i>a</i> ), clorofila b (Chl <i>b</i> ), clorofila total (Chl <i>Total</i> ), relação clorofila <i>a/b</i> (Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i> ) e carotenóides em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio. .....	41
<b>TABELA 1.5</b>	Teores de clorofila a (Chl <i>a</i> ), clorofila b (Chl <i>b</i> ), clorofila total (Chl <i>Total</i> ), relação clorofila <i>a/b</i> (Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i> ) e carotenóides em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivadas em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio.	

**CAPÍTULO 2: Osmorreguladores e defesa oxidativa de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidas à deficiência** Pág.

<b>TABELA 2.1</b>	Valores de F obtidos da análise de variância para os atributos fisiológicos: Carboidratos Solúveis, N- $\alpha$ -aminossolúvel, Proteínas Solúveis e Prolina Livre em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100 da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60%) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio. ....	53
<b>TABELA 2.2</b>	Teores de carboidratos solúveis, N- $\alpha$ -aminossolúvel, Proteínas Solúveis e Prolina livre em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100 da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60%) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio. ....	54
<b>TABELA 2.3</b>	Valores de F obtidos da análise de variância para Aldeído Malônico (MDA), Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Ascorbato Peroxidase (APX) em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100 da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60%) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio. ....	57

**CAPÍTULO 3: Desenvolvimento inicial de seis genótipos de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica**

<b>TABELA 3.1</b>	Valores de F obtidos da análise de variância para altura de Planta ( $h_{planta}$ ), Diâmetro do Colmo ( $\Phi_{colmo}$ ), Número de Perfilhos (Unid) e Área Foliar (AF) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio. ....	68
<b>TABELA 3.2</b>	Altura de Planta ( $h_{planta}$ ), Diâmetro do Colmo ( $\Phi_{colmo}$ ), Número de Perfilhos (Unid) e Área Foliar (AF) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio. ....	69

<b>TABELA 3.3</b>	Equações de regressão e coeficientes de determinação para Área Foliar (AF) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio. ....	73
<b>TABELA 3.4</b>	Valores de F obtidos da análise de variância para produção de Matéria Seca em Folhas, Colmos + Bainhas (C+B), e Parte Aérea (PA), e Massa Seca de Raízes (MsR), Relação Raiz/Parte Aérea (MsR/PA) e Matéria Seca Total (Ms.Total) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio. ....	74
<b>TABELA 3.5</b>	Produção de Matéria Seca em Folhas, Colmos + Bainhas (C+B), e Parte Aérea (PA), e Massa Seca de Raízes (MsR), Relação Raiz/Parte Aérea (MsR/PA) e Matéria Seca Total (Ms.Total) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio. ....	76

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 1: Fluorescência do fotossistema II e pigmentos fotossintéticos em genótipos de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica</b>		Pág.
<b>FIGURA 1.1</b>	Potencial Hídrico Foliar ( $\Psi_w$ ) da Antemanhã (A) e ao Meio-dia (B) em folhas de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio. ....	36
<b>CAPÍTULO 2: Osmorreguladores e defesa oxidativa de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidas à deficiência</b>		
<b>FIGURA 2.1</b>	Teor de aldeído malônico (MDA) em três variedades RB931011, RB931013 e RB72910 (A) e em três Clones CL001, CL002 e CL003 (B) de cana-de-açúcar submetidos aos níveis de estresse hídrico em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio C = controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), EM = estresse moderado (40 a 60% AD) e ES = estresse severo (0 a 20% AD).. ....	58
<b>FIGURA 2.2</b>	Atividade da superóxido dismutase (SOD) em três variedades RB931011, RB931013 e RB72910 (A) e em três Clones CL001, CL002 e CL003 (B) de cana-de-açúcar submetidos aos níveis de estresse hídrico em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio C = controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), EM = estresse moderado (40 a 60% AD) e ES = estresse severo (0 a 20% AD).. ....	59
<b>FIGURA 2.3</b>	Atividade da Ascorbato peróxidase (APX) em três variedades RB931011, RB931013 e RB72910 (A) e em três Clones CL001, CL002 e CL003 (B) de cana-de-açúcar submetidos aos níveis de estresse hídrico em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio C = controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), EM = estresse moderado (40 a 60% AD) e ES = estresse severo (0 a 20% AD).. ....	61
<b>FIGURA 2.4</b>	Atividade da catalase (CAT) em três variedades RB931011, RB931013 e RB72910 (A) e em três Clones CL001, CL002 e CL003 (B) de cana-de-açúcar submetidos aos níveis de estresse hídrico em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio C = controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), EM = estresse moderado (40 a 60% AD) e ES = estresse severo (0 a 20% AD).. ....	62

**FIGURA 3.1** Desenvolvimento da Área Foliar, em cm<sup>2</sup>, de seis genótipos de cana-de-açúcar de 80 a 170 dias após o plantio, submetidos aos tratamentos: Controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), Estresse Moderado (40 a 60% AD) e Estresse Severo (0 a 20% AD), cultivado em casa-de-vegetação..... 72

## LISTA DE APÊNDICES

- APÊNDICE A** Dados diários de temperatura mínima, máxima e média, em °C, e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) observados na casa de vegetação, durante o período de imposição dos tratamentos..... 91
- APÊNDICE B** Reduções no potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) da antemanhã e ao meio-dia em folhas de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos ao tratamento controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivados em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio em vasos. .... 92
- APÊNDICE C** Tabela de redução para os teores de clorofila a (Chl *a*), clorofila b (Chl *b*), clorofila total (Chl *Total*), relação clorofila *a/b* (Chl*a* / Chl*b*) e carotenóides em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo – AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivadas em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio..... 93
- APÊNDICE D** Tabela de redução para teores de carboidratos solúveis, N- $\alpha$ -aminosolúvel, proteínas solúveis e prolina livre em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60%) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio..... 94
- APÊNDICE E** Tabela de redução de altura de planta ( $h_{\text{planta}}$ ), diâmetro do colmo ( $\Phi_{\text{colmo}}$ ), número de perfilhos (Unid) e área foliar (AF) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivadas em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio..... 95
- APÊNDICE F** Tabela de Redução da produção de massa seca em folhas, colmos + bainhas (C+B), e parte aérea (PA), e massa seca de raízes (MsR), relação raiz/parte aérea (R/PA) e matéria seca total (Ms.total) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivadas em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio. 96

## RESUMO

**Aspectos fisiológicos de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos a estresse hídrico.** 2010. 96p. Dissertação de mestrado (Agronomia – Produção Vegetal e Proteção de Plantas)- Universidade Federal de Alagoas.

A deficiência hídrica dos solos é um problema que afeta boa parte das áreas cultivadas no mundo, sobretudo aquelas situadas nas regiões semi-áridas. A cana-de-açúcar é uma cultura em expansão no Nordeste do Brasil, onde a limitação da disponibilidade hídrica afeta o crescimento e o desenvolvimento da planta, causando prejuízos sócio-econômicos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, de maneira comparativa, aspectos fisiológicos de seis genótipos de cana-de-açúcar (RB931011, RB931013, RB72910, CL001, CL002 e CL003) submetidos ao déficit hídrico, durante a fase inicial de crescimento vegetativo, sob condições de casa-de-vegetação. O experimento foi realizado no Centro de Ciências Agrárias da UFAL, em Rio Largo, Estado de Alagoas, disposto em delineamento inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 6x3, com quatro repetições. Os níveis de água foram assim definidos: controle (80-100% da água disponível no solo - AD); estresse moderado (40-60% AD); e estresse severo (0-20% AD) e controlados pela pesagem diária dos vasos. Plantas de 19 dias de idade foram transplantadas para vasos de 15 L, e aos 80 dias após o transplante, iniciou-se o experimento. Periodicamente foram realizadas leituras SPAD e de parâmetros da fluorescência da clorofila (eficiência quântica potencial -  $F_v/F_m$  e eficiência quântica efetiva -  $\Phi_{PSII}$ ) e medições da área foliar. Ao final do experimento foram realizadas medidas do potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ), diâmetro do colmo, altura de plantas, número de perfilhos e massa seca de folhas, colmo mais bainha e parte aérea. Também foram quantificados os teores de pigmentos fotossintéticos, osmorreguladores (açúcares solúveis, prolina, N-amino e proteínas) e atividade das enzimas de defesa oxidativa. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de média (Tukey a 5% de probabilidade). De modo geral, houve redução nos teores de pigmentos fotossintéticos de acordo com a intensidade do estresse. O  $\Psi_w$  foi reduzido pelo déficit hídrico, entretanto, o genótipo RB931011 não apresentou redução significativa entre os níveis de água na ante-manhã e, ao meio dia, foi o que apresentou menor redução quando submetido ao estresse moderado. A relação  $F_v/F_m$  foi reduzida em função da deficiência hídrica para os genótipos RB931011, RB72910 e CL002, ao meio dia, apresentando alta taxa de recuperação durante o período noturno (leituras às 4:00h da manhã). O RB72910 apresentou a maior redução em  $\Phi_{PSII}$ , no índice SPAD e nos teores de clorofila *a* e *b*, clorofila total e relação chl *a*/chl *b*, porém manteve o teor de carotenóides. Em relação aos osmorreguladores, houve aumento para N- $\alpha$ -amino solúveis, prolina livre, carboidratos solúveis e redução para o teor de proteína solúvel, em função dos níveis de água, independente dos genótipos. Houve aumento no teor de aldeído malônico (MDA) em resposta ao estresse hídrico, sendo mais intenso nas variedades RB931011 e RB931013. Para a atividade da ascorbato peroxidase (APX), houve maior aumento no CL002, mesmo apresentando estabilidade para a catalase. O estresse hídrico reduziu o crescimento inicial e a produção de matéria seca total, e

induziu a ativação das defesas oxidativas das plantas de cana-de-açúcar. A variedade RB72910 e o CL001 apresentaram-se mais tolerantes ao déficit hídrico.

**Palavras-chave:** *Saccharum* sp., deficiência hídrica, tolerância à seca, osmorreguladores, defesa oxidativa.



## ABSTRACT

**Physiological aspects of six genotypes of sugarcane submitted to water stress.** 2010. 96p. Dissertation Master degree (Agronomy - Vegetable Production and Plant Protection) - Federal University of Alagoas, Rio Largo, State of Alagoas, Brazil, 2010.

The soil water deficit is a problem that affects much of the cultivated areas in the world, especially those located in semi-arid regions. The sugarcane is a crop growing in northeastern Brazil, where the limitation of water availability affects growth and development of the plant, causing social and economic damage. Thus, this study aimed to evaluate, in a comparative way, the physiological aspects of six genotypes of cane sugarcane (RB931011, RB931013, RB72010, CL001, CL002 and CL003) submitted to water deficit during early vegetative growth under greenhouse conditions, at the Centre for Agrarian Sciences of the Federal University of Alagoas, Rio Largo, State of Alagoas, Brazil. The experimental design was completely randomized in factorial arrangement 6x3 with four replications. Water levels were defined as follows: control (80-100% of available water in soil - AW), mild stress (AW 40-60%) and severe stress (0-20% AW). Plants of 19 days were transplanted to pots. The treatments were applied to 80 days after transplanting and the pots were weighed daily to control of the humidity. Were taken periodically the SPAD readings, chlorophyll fluorescence parameters (quantum efficiency potential -  $F_v / F_m$  and effective quantum efficiency -  $\Phi_{PSII}$ ) and measurements of leaf area. At the end of the experiment were measured the leaf water potential, plant height, tiller number and dry weight of leaf, stem plus sheath and shoot. Were also quantified the levels of photosynthetic pigments, osmoregulators (soluble sugars, proline, N-amino and proteins) and the enzyme activity of oxidative defense. Data were subjected to analysis of variance and average test (Tukey, 5% probability). Overall, there was reduction in the levels of photosynthetic pigments according to the intensity of stress. The  $\Psi_w$  was reduced by the drought stress, however, the cultivar RB931011 showed no significant reduction in the water levels in the predawn and at noon, showed the smallest reduction when subjected to moderate stress. The  $F_v/F_m$  ratio was reduced by the treatments for genotypes RB931011, RB72910 and CL002, at noon, with high recovery rate during the night time (readings at 4:00 am). The RB72910 showed the greatest reduction in  $\Phi_{PSII}$ , SPAD index, content of chlorophyll b, total chlorophyll and ratio chl a/chl b, but kept the carotenoids content. Regarding the osmoregulators, were increased the N- $\alpha$ -amino-soluble, free proline, soluble carbohydrate and were decreased the soluble protein amount, depending on water levels, independent of the genotypes. There was an increase in the level of malonaldehyde (MDA) in response to water stress, more intense in RB931011 and RB931013 varieties. For the ascorbate peroxidase activity, there was a greater increase in CL002, even showing stability for catalase. Water stress reduced the initial growth and total dry matter production, and induced the activation of the oxidative defenses of sugarcane plants. RB72910 and CL001 genotypes showed higher tolerance to water deficit.

**Keywords:** Saccharum sp., water deficiency, drought tolerance, osmoregulators, oxidative defense.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A seca é um problema que afeta grande parte das áreas cultivadas no mundo, principalmente, aquelas situadas nas regiões semi-áridas, que reduz a produção vegetal, sobretudo, provocando enormes prejuízos de ordem sócio-econômica (MUNNS, 2002), por alterar diversos processos do desenvolvimento das plantas, sendo de ampla ocorrência nos cultivos agrícolas e nos ecossistemas naturais. Porém, como existe variação na adaptação das plantas a esse fenômeno, tanto inter quanto intraespecífica, torna-se necessário avaliar o comportamento de diferentes materiais genéticos em condições de deficiência hídrica, visando recomendações de cultivo (BRAY, 1997; PIMENTEL, 1999).

O estresse hídrico é decorrente dos fatores climáticos e afeta, principalmente, as áreas não irrigadas, onde a distribuição das chuvas apresenta irregularidade temporal e espacial. No Brasil, esse problema é percebido, sobretudo, na região Nordeste, onde cerca de 54% da sua área está situada no semi-árido (FAO, 2000), abrangendo áreas cultivadas, irrigadas ou não (GHEYI, 2000).

Moderadamente sensível ao estresse hídrico (MAAS & HOFFMAN, 1977), a cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é de grande importância sócio-econômica e ambiental para o país, sendo cultivada por pequenos, médios e grandes produtores rurais, em áreas que totalizam mais de 7,0 milhões de hectares (CONAB, 2010).

Devido à grande demanda por veículos bi-combustíveis e por combustíveis renováveis, principalmente etanol, tem havido expansão no cultivo da cana-de-açúcar (NÓBREGAS & DORNELAS, 2006), cultura que também é utilizada como fonte de energia elétrica e na alimentação animal (SILVA et al., 2007). O país destaca-se como o maior produtor e exportador mundial dos produtos açúcar e álcool, seguido por Índia e Austrália, sendo que metade da produção é destinada ao mercado interno (SEAG-ES, 2008).

Atualmente, o Brasil estima uma produção de 629 milhões de toneladas para a safra do ano de 2009/2010, apresentando um aumento de 10% em relação à safra do ano de 2008. Do volume total estimado para o corrente ano, a região Centro-Sul, tem participação em 90%, com uma produção aproximada de 566 milhões de toneladas, tendo como maior produtor o Estado de São Paulo com aproximadamente 365 milhões de toneladas, enquanto o Norte-Nordeste contribui com 63 milhões ou cerca de 10% do total produzido no país. O Estado de Alagoas tem a maior produção do Norte-Nordeste com uma produção de 26 milhões de toneladas. Parte dessa pequena participação do Nordeste na produção nacional é devido à baixa produtividade obtida nessa região, apesar do aumento observado nos últimos anos devido ao uso de variedades selecionadas e melhoradas (CONAB, 2010).

Em regiões onde os estresses ambientais são fatores constantes e limitantes para a produção vegetal, vêm se destacando a realização de pesquisas que visam à identificação de características de ordem morfológica, bioquímica e molecular durante a adaptação ao estresse que, posteriormente, serão utilizadas na produção de variedades resistentes, por meio de melhoramento genético ou de engenharia genética (MUNNS, 2002; ZHU, 2002).

No sistema de produção da cana-de-açúcar, o cultivo de variedades com boas características agroindustriais é a forma mais consistente de se obter produtividade e qualidade com baixo custo. No passado, a introdução da lavoura canavieira era exclusivamente através de importações de materiais, até surgirem os mais recentes programas de melhoramento genético e, com esse, as variedades RBs, oriundas de eficientes métodos, pois são obtidos cultivares adequados para ambiente de cultivo na região, através de cruzamentos genéticos (MATSUOKA, 2000).

Nas últimas décadas houve um significativo aumento do número de variedades cultivadas pelas empresas do setor sucroalcooleiro que são dotadas de grande diversidade genéticas, de acordo com o manejo, solo, clima, épocas de plantio e colheita. Características específicas de cada variedade para arquitetura foliar, riquezas de açúcares, profundidade e distribuição do sistema radicular, resistências a seca, pragas e doenças (OLIVEIRA et. al, 2007). Nesse sentido, estudos que tem como intuito selecionar variedades tolerantes aos estresses abióticos, podem ser apontados como uma alternativa para aumentar a produtividade da cana-de-açúcar na região Nordeste, sem aumento de custo na produção.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a tolerância a seca, através de respostas fisiológicas, bioquímicas e de crescimento, em seis genótipos de cana-de-açúcar, sob condições de casa-de-vegetação.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 - Deficiência Hídrica**

No ambiente de crescimento, as plantas cultivadas são frequentemente submetidas a condições adversas, que resultam em estresses, afetando de maneira desfavorável seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. Esses estresses podem ser de origem biótica ou abiótica, podendo ocorrer de forma isolada ou concomitante. Dentre os abióticos, os de ocorrência comum são: salinidade, déficit hídrico, deficiência ou excesso de nutrientes minerais além de altas e baixas temperaturas (BRAY, 1997; LAWLOR, 2002; CAMBRAIA, 2005).

Na maioria das vezes, a deficiência hídrica nas plantas é perceptível quando a taxa transpiratória é superior à absorção de água e seu transporte para parte aérea, o que é de ocorrência comum durante o ciclo de diversas culturas agrícola, inclusive da cana-de-açúcar. Assim, é de importância primordial, o conhecimento de como os vegetais respondem ao estresse hídrico, sendo um dos pré-requisitos para escolha tanto da variedade como de melhores práticas de manejo, sobretudo, para aperfeiçoar a exploração dos recursos naturais (SMIT & SINGELS, 2006), tendo em vista o uso eficiente da água (ROBERTSON et al., 1999).

### **2.2 - Respostas das plantas ao déficit hídrico**

O estresse hídrico em plantas inicia-se a partir de uma complexa via de respostas, começando com a percepção do déficit hídrico, o qual desencadeia uma seqüência de eventos de ordem molecular, finalizando com várias respostas fisiológicas, metabólica e de desenvolvimento. Mudanças no potencial osmótico, através da membrana plasmática, pode ser a maior causa de resposta ao estresse hídrico a nível molecular (BRAY, 1997).

Segundo Larcher (2004), um organismo vegetal atravessa uma sucessão de fases características ao estresse: fase de alarme, onde ocorre perda de estabilidade das

estruturas e das funções vitais (processos bioquímicos e metabolismo de produção de energia), onde a planta pode reagir e se restituir do efeito do estresse imposto; fase de resistência, a qual é induzida sob estresse contínuo, quando a planta está adquirindo características de rusticidade e ajustamento, no entanto se o estresse persistir leva a planta a fase de exaustão, causando suscetibilidade das plantas às infecções que ocorrem em consequência da diminuição das defesas levando ao colapso prematuro.

Embora razoavelmente conhecidas, as respostas das plantas ao estresse dependem da espécie, do genótipo, da duração e severidade, da idade e estágio de desenvolvimento, do órgão e tipo de célula e do comportamento sub-celular. Dessa forma, as plantas podem ser dotadas de mecanismos de tolerância ou resistência e suscetibilidade em seu crescimento, podendo chegar à morte, dependendo da severidade do estresse a que as mesmas são submetidas (CHAVES et al., 2003; CAMBRAIA, 2005).

De acordo com Artlip & Wisniewski (2001), a resistência ao estresse hídrico se manifesta geralmente de quatro formas distintas: a) limitação do crescimento como forma de economia de água; b) adaptações morfológicas; c) adaptações fisiológicas; e d) alterações metabólicas. No entanto, a capacidade da planta responder e sobreviver ao estresse hídrico celular depende dos mecanismos internos que integram as respostas celulares. Tais respostas podem ocorrer em alguns segundos, minutos ou até mesmo em horas (BRAY, 1997).

Gonçalves, (2008) afirma, ainda, que sendo o ácido abscísico sintetizado continuamente em baixas taxas nas células do mesófilo e tende a se acumular nos cloroplastos, sob condições ambientais favoráveis, a concentração de ABA nas raízes e nas folhas é  $\text{ng.g MF}^{-1}$ , sendo substancialmente elevada quando as plantas são submetida a estresse hídrico. Esse hormônio promove uma proteção fisiológica contra esse tipo de estresse, causando fechamento estomático e evitando perdas excessivas de água da planta para a atmosfera.

Dependendo da espécie, fisiologicamente, as plantas podem apresentar respostas diferenciadas, sendo a taxa fotossintética uma das variáveis que apresente maior suscetibilidade à seca. Contudo, de forma contínua, as plantas podem realizar fotossíntese por um tempo superior àquela destinada ao crescimento em expansão, pois os estômatos respondem mais lentamente no início do estresse hídrico que o turgor, responsável pelo alongamento celular que governa a expansão celular (INMAN-BAMBER & SMITH, 2005; TAIZ & ZEIGER, 2009).

### 2.3 Estresse Oxidativo

Sob deficiência hídrica mais acentuada, reduções nas taxas fotossintéticas podem ser devidas às fortes limitações bioquímicas no aparato de fixação do carbono do que ao processo de captura e transferência de energia entre os fotossistemas (PINHEIRO et al., 2004). Dessa forma, o contínuo transporte de elétrons gera um excesso de energia na forma de poder redutor (NADPH), o qual deixa de ser consumido de maneira adequada pela fase bioquímica da fotossíntese sob condições de déficit hídrico. Como consequência disso, a cadeia de transporte de elétrons permanece reduzida por um tempo maior e os elétrons provenientes da contínua absorção de energia pelos fotossistemas encontram-se potencialmente livres para reagir com o oxigênio molecular livre no estroma, que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e clorofila tripleto ( $^3Chl^*$ ) (NOCTOR, 1998; ASADA, 1999; MITTLER, 2002).

Essas EROs são extremamente reativas às proteínas, DNA, RNA e, principalmente, aos lipídios de membrana, ocasionando a perda de seletividade e a capacidade de compartimentalização celular. O efeito negativo da ação das EROs recebe o nome de estresse oxidativo e este, é responsável pela ocorrência de danos fotoinibitórios e fotooxidativo em plantas sob condições de seca (ASADA, 1999), que se manifesta nos tecidos das plantas em forma de necrose e/ou clorose devido à degradação das clorofilas (KARPINSKI et al., 1999).

Os mecanismos detoxificadores das EROs são de origem tanto enzimática como não-enzimática, que se encontram em diferentes compartimentos celulares (cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos). Nos enzimáticos estão incluídas: as enzimas superóxido dismutase (SOD), a qual catalisa a reação de dismutação do radical  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ ; as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa, como a ascorbato peroxidase (APX) que detoxifica o  $H_2O_2$  produzido pela SOD e a catalase (CAT), cuja função, também, é a detoxificação do  $H_2O_2$ , formando água e oxigênio (ASADA, 1999; MITTLER, 2002). Dentre os compostos antioxidantes não-enzimáticos pode-se citar o ascorbato (vitamina C), a glutaciona e o tocoferol (vitamina E) e alguns lipídios de membranas, com especial atenção para os carotenóides, que agem na dissipação da excedente de energia na forma de calor através do ciclo das violaxantinas (MITTLER, 2002). Portanto, a coordenada



ativação das enzimas e dos compostos antioxidantes (não-enzimáticos) de detoxificação de EROs é de importância crucial em conferir tolerância à seca.

## 2.4 - Ajustamento osmótico

As plantas desenvolveram um mecanismo de adaptação à seca a nível celular, que é a produção de solutos osmoticamente ativos, também conhecidos como ajustamento osmótico ou osmorregulação (MOLINARI et al. 2004). Tais solutos podem ser acumulados em altos níveis, sob baixos potenciais hídricos, no entanto, sem ocorrer transtorno na função protéica (PIMENTEL, 1999; INMAN-BAMBER & SMITH, 2005), pois esses são hidrofílicos, possuindo alta afinidade com a água e protegem a célula contra a desidratação (BOHNERT & SHEN, 1999).

Dentre os osmorreguladores estão incluídos aminoácidos (por exemplo, prolina), carboidratos (frutose e glicose) e os compostos quaternário de amônia (glicinabetaína). De forma semelhante, as enzimas envolvidas na síntese desses solutos compatíveis permitem ajustamento osmótico ou acumulação líquida de solutos, resultando em decréscimo do potencial osmótico, mantendo um fluxo de água a favor de um gradiente de potencial hídrico, protegendo ainda a turgescência foliar (BRAY, 1997). Segundo Pimentel (1999), a osmorregulação por si só, não é responsável pelo crescimento, pois a turgescência gerada não é o único fator de controle do mesmo, sendo este dependente da turgescência celular, mas também da elasticidade da parede celular e, conseqüentemente, do coeficiente de elasticidade desta. O ajustamento osmótico vai promover o turgor necessário para o crescimento, mas, se não houver um ajustamento da elasticidade da parede celular, aumentando a sua capacidade de extensão, não haverá crescimento (PIMENTEL, 2004).

Possivelmente, as plantas ajustam seu potencial hídrico foliar de acordo com a diminuição no potencial hídrico do solo, de forma a manter um gradiente no sistema solo-parte aérea. Prisco (1980) relata que quando o potencial hídrico do solo decresce de forma abrupta, a fase inicial do ajustamento osmótico é a desidratação, ou seja, há uma diminuição de água nas células e como resultado tem-se um abaixamento no potencial osmótico celular.

Segundo Larcher (2004), sob influência de estresses ambientais, a síntese de proteínas é inibida e a degradação é acelerada, o que leva a um acúmulo de aminoácidos e aminas livres, apresentando como característica marcante o distúrbio no metabolismo

das proteínas, uma mudança nas proporções de aminoácidos e, possivelmente, um aumento elevado na concentração de prolina livre, sendo este, talvez, o aminoácido mais amplamente atribuído como osmólito compatível, cuja síntese, transporte, acumulação e degradação podem ser atribuídas como respostas adaptativas das plantas ao estresse hídrico (MITTLER, 2002).

Amplamente estudada, a prolina é um soluto compatível, sintetizado do ácido L-glutâmico via  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate (P5C); a reação é catalisada por duas enzimas, P5C sintetase (P5CS) e P5C redutase (P5CR). A enzima P5CS é induzida por estresse hídrico, salinidade e ABA, porém, o mesmo não ocorre com a P5CR. A desintegração de prolina à partir de P5C, catalisada pela prolina dehidrogenase, é reprimida pela deficiência hídrica e induzida por prolina e reidratação (SAMARAS et al., 1995). O papel da prolina em plantas pode não estar restrito ao de soluto compatível, pois, durante o estresse hídrico, ao ser sintetizada, pode servir como reserva de nitrogênio orgânico, podendo ser utilizado durante a reidratação (BRAY, 1997 MITTLER, 2002).

O transporte de prolina pode também ser controlado pelo conteúdo hídrico celular. O gene codificado como o transportador específico de prolina, *ProT2*, é induzido por estresse hídrico (apesar de nem todas os membros da família do gene *ProT* serem induzidas por essa rota); isso pode indicar que a distribuição de prolina em toda a planta pode ser um importante aspecto da função do osmólito (BRAY, 1997).

A síntese e acúmulo de outros solutos compatíveis também são regulados durante o estresse hídrico. O transporte de proteínas, assim como os canais transportadores de íons, também desempenha importante papel para evitar o déficit hídrico através da osmorregulação. As aquaporinas, proteínas de membranas que transportam água, podem estar envolvidas no controle do status hídrico celular em células das raízes nas zonas mais velhas, em resposta a condição de baixa disponibilidade de água (PIMENTEL, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2009).

## **2.5 - Cana-de-açúcar**

### **2.5.1 - Aspectos gerais.**

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) é uma planta que pertence a família das Gramíneas ou Poáceas. Seis espécies de *Saccharum* são reconhecidas: *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. edule*, *S. spontaneum* e *S. robustum*. O centro de origem fica na

região leste da Nova Guiné (DANIELIS & ROACH, 1987). Na Antigüidade, o açúcar não passava de uma especiaria exótica, sendo utilizada apenas como tempero ou remédio, uma vez que o preparo de alimentos adocicados era feito com mel de abelhas. O termo sânscrito sarkara deu origem a todas as versões da palavra açúcar nas línguas indo-européias: sukkar em árabe, saccharum em latim, zuccheru em italiano, seker em turco, zucker em alemão, sugar em inglês (FAUCONNIER & BASSEREAU, 1975).

A espécie chegou ao continente europeu no século XII, a partir daí surgiram importantes regiões produtoras, em especial no extremo Oriente. O interesse pela especiaria foi bastante crescente depois do século XV, quando as novas bebidas, como café, chá e o chocolate eram adoçados com açúcar. Já em 1493, o navegador Cristovam Colombo iniciou o cultivo da cana-de-açúcar nas Antilhas. A partir daí, a história do açúcar no mundo ganhou novas dimensões. Diferente da Europa, no Brasil, o açúcar é produzido a partir da cana, enquanto na Europa é quase totalmente fabricado a partir da beterraba açucareira. Hoje, o interesse mundial pela cultura da cana-de-açúcar é crescente, dada sua importância na produção de energia elétrica (bagaço), combustível (álcool hidratado), medicamento (álcool medicinal) e alimento (açúcar) (FAUCONNIER & BASSEREAU, 1975).

### **2.5.2 - Características Agronômicas**

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene, cujo crescimento pode variar de doze a dezoito meses. Com o estabelecimento da cultura, o auto-sombreamento inibe o perfilhamento e acelera o crescimento do colmo principal. O crescimento em altura continua até a ocorrência de alguma limitação no suprimento de água, ocorrência de pouca luminosidade, baixas temperaturas ou ainda devido ao florescimento, sendo este último, um processo indesejável em culturas comerciais (RODRIGUES, 1995). Em condições tropicais, por ser dotada de metabolismo C4, a planta tem como principal característica elevadas taxas fotossintéticas, sendo altamente eficiente na conversão de energia luminosa em energia química. A planta produz muitos perfilhos, em seu desenvolvimento inicial, cada qual com diversos nós separados por entrenós, que por sua vez são responsáveis pelo armazenamento da sacarose nas células do parênquima e tecido vascular, sendo o colmo o principal órgão de armazenamento dos fotoassimilados (sacarose), havendo, porém, vários fatores que promovem a inibição ou favorecem o desenvolvimento da cultura (OLIVEIRA et al., 2004).

Segundo Rodrigues (1995), características que definem números de colmos, altura, diâmetro de colmos, comprimento e largura de folhas e a arquitetura da parte aérea, são inerentes a cada genótipo, sendo a expressão dessas influenciada pelo clima e práticas culturais. Além do mais, de modo geral, essas características das variedades influenciam na eficiência fotossintética da cana-de-açúcar, assim como nas respostas às variações climáticas que oscilam durante toda fase de desenvolvimento. Um menor ângulo de inclinação da folha no colmo traduz-se em maior eficiência fotossintética, sobretudo em populações de alta densidade, devido à penetração mais eficiente da luz no dossel (RODRIGUES, 1995; OLIVEIRA et al., 2007).

A cana-de-açúcar é uma espécie dotada de mecanismos morfológicos como enrolamento das folhas, para diminuição da área foliar em resposta a intensa incidência de radiação solar, e o controle estomático que reduz a transpiração (LISSON et al., 2005). Mesmo assim necessita de uma grande quantidade de água para desenvolvimento pleno, estimando-se 250 partes de água para formar uma parte de matéria seca, durante seu período de crescimento (LARCHER, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2009).

## **2.6 - Respostas da cana-de-açúcar ao estresse hídrico**

### **2.6.1 - Crescimento**

Na fase inicial da cultura, é de primordial importância o crescimento e comportamento da arquitetura do dossel, pois o mesmo desempenha um papel importante no rendimento final da cultura, pela interceptação de radiação solar, o que influencia nos processos fotossintéticos e transpiração da cultura, além de controlar ervas daninhas, sendo, portanto, fatores cruciais ao desenvolvimento final da cultura (SMIT & SINGELS, 2006). O estresse hídrico afeta tanto o crescimento quanto a estrutura do dossel (OLIVEIRA et al., 2007), tornando necessário investigar o efeito deste em diferentes variedades.

Inman-Bamber (2004) e Rodrigues (1995) ressaltam que o tempo de exposição à seca afeta negativamente o crescimento da parte aérea, sobretudo a produção de folhas, acelerando a senescência foliar e da planta como um todo, podendo, ainda, levar a uma redução na interceptação da radiação, na eficiência do uso de água e na fotossíntese, bem como ao aumento da radiação transmitida para a superfície do solo. Em adição, estudos de área foliar em variedades de cana-de-açúcar permitem correlacioná-la com o

potencial produtivo das mesmas, seja em massa seca, quantidade de açúcar ou taxas de crescimento (OLIVEIRA et al., 2007).

A análise de crescimento aplicada à cultura da cana-de-açúcar permite avaliar e quantificar as taxas de crescimento em diferentes condições ambientais, sendo ainda, considerado como um método padrão para se medir a produtividade biológica de espécies vegetais, permitindo o estudo de diferentes variedades de uma determinada cultura em seu ambiente de produção (OLIVEIRA et al., 2004). No entanto, dois dos componentes responsáveis pelo aumento da produtividade são biomassa e fração de sacarose, onde o aumento de um ou de ambos, resulta em maior rendimento da cultura, sendo que a biomassa pode aumentar devido à maximização da radiação interceptada e a eficiência da fotossíntese (INMAN-BAMBER, 2004; SINGELS et al., 2005). Também, de certa forma, se faz necessário o conhecimento de alguns mecanismos fisiológicos de resposta das culturas. O potencial hídrico foliar, por exemplo, pode ser uma relevante medida de sensibilidade da planta ao status hídrico do solo (TAIZ & ZEIGER, 2009). Além deste, o fechamento estomático, a senescência de folhas e o ajustamento osmótico também são mecanismos de tolerância à seca, cujas informações são escassas para a maioria das variedades, sendo, no entanto, necessárias para se obter melhor entendimento acerca das respostas das culturas à deficiência hídrica (ROBERTSON et al., 1999; SMIT & SINGELS, 2006).

### **2.6.2 - Relações hídricas**

O conhecimento das relações hídricas é fundamental para melhorar o manejo da cultura nas regiões tropicais, em virtude do grande déficit hídrico existente em áreas cultivadas com cana-de-açúcar. Assim em áreas desprovidas de irrigação, o conhecimento das relações hídricas pode auxiliar os programas de melhoramento genético de culturas, pois a resistência à seca pode ser uma importante característica para seleção de novas variedades. Entretanto, a eficiência de uso da água na irrigação é, provavelmente, a maneira mais eficaz de melhorar o conhecimento acerca das relações hídricas em cana-de-açúcar (INMAN-BAMBER & SMITH, 2005).

Durante a transpiração vegetal, que é uma forma eficiente de dissipar o calor proveniente do sol, os gradientes energéticos ou potenciais são desenvolvidos ao longo de toda a planta. Isso se faz necessário para que ocorra o fluxo de água desde as raízes, passando pelo xilema e chegando às células do parênquima das folhas. O status

energético da água na planta é expresso como potencial hídrico ( $\Psi_w$ ), definido como o trabalho mecânico requerido para transferir uma unidade de água, no estado padrão, de um local com  $\Psi_w = 0$  para uma situação onde o  $\Psi_w$  tem valor menor e definido (TAIZ & ZEIGER, 2009), sendo o potencial hídrico da antemanhã (medido antes do amanhecer) bastante informativo, pois corresponde aproximadamente ao potencial hídrico do solo (LARCHER, 2004).

Apesar de estudos relevantes acerca das respostas das plantas ao potencial hídrico do solo, Santos & Carlesso (1998) afirmaram que tal variável não indica, de maneira geral, as condições de déficit ou excesso de água na profundidade do solo explorado pelas raízes. Assim, os mesmos autores fazem restrição ao uso do potencial hídrico do solo para caracterizar a intensidade de ocorrência de déficit hídrico, sugerindo que a resposta fisiológica das plantas à seca seja avaliada em função da água disponível no solo. Por outro lado, o potencial hídrico foliar da manhã tem sido relatado como indicador de estresse hídrico em plantas de milho, refletindo o quanto de água está disponível no solo para as plantas (BERGONCI et al., 2000; BIANCHI et al., 2005).

### **2.6.3 - Pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila *a***

Nas plantas, a maior parte da radiação incidente na folha não é utilizada nos processos fotossintéticos. Esta radiação é perdida de várias formas, sendo uma parte refletida e outra transmitida, ou seja, atravessa a folha sem ser absorvida, enquanto uma terceira fração é absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes. No entanto, nem todos esses fótons absorvidos pelos pigmentos são utilizados nos processos fotoquímicos (TAIZ & ZEIGER, 2009). Dentre os pigmentos fotossintéticos, as clorofilas (*a* e *b*) e os carotenóides são os mais abundantes pigmentos biológicos existentes no planeta. Por sua estrutura química ser instável, as clorofilas são facilmente degradadas, resultando em produtos de decomposição que modificam a percepção e qualidade dos vegetais (STREIT et al., 2005). As clorofilas localizam-se nos cloroplastos organelas, onde ocorre a fotossíntese, a qual possui duas reações importantes: a fotoquímica, nas membranas dos tilacóides e a bioquímica, no estroma do cloroplasto. Tais organelas, além das clorofilas, contêm outros pigmentos denominados de acessórios, tais como os carotenóides (carotenos e xantofilas) (LARCHER, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Ao absorver a energia luminosa, as moléculas de clorofila modificam temporariamente suas configurações eletrônicas, passando do estado basal para o estado mais energético, sendo ainda muito instável e de vida curta. Assim, após absorver os fótons, esses pigmentos podem dissipar o excesso de energia proveniente da luz por meio de quatro formas competitivas: dissipação fotoquímica (utilizada na fotossíntese), fluorescência (re-emissão na forma de luz), conversão direta de energia (retorno da clorofila ao seu estado base sem ocorrer emissão de fótons) e dissipação não-fotoquímica (re-emissão na forma de calor) (MAXWELL & JONHSON 2000; CAMPOSTRINI, 2008; TAIZ & ZEIGER, 2009).

O déficit hídrico caracteriza-se como um dos estresses ambientais responsáveis pela alterações dos pigmentos nas folhas, alterando a relação clorofila *a* e *b*, a qual pode ser usada em plantas terrestres como indicativo de respostas a sombreamento e senescência, e a relação clorofila:carotenóides que é usada em menor proporção para diagnosticar senescência sob condições de estresse hídrico (HENDRY & PRICE, 1993). Assim, métodos de quantificação e de estimativa de tais pigmentos, de certa forma, também podem ser utilizados como ferramentas para seleção de genótipos tolerantes à seca (SILVA et al., 2007). Métodos destrutivos são citados na literatura como sendo relativamente eficiente, sobretudo, o de extração com acetona à 80% (v/v) e posterior determinação em espectrofotômetro. Um método não destrutivo, caracterizado pela simplicidade e rapidez, através de medidores de clorofila tais como o SPAD-502, permite leituras instantâneas do teor relativo de clorofila na folha (ARGENTA et al., 2001).

Por outro lado, o rendimento quântico potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) e rendimento quântico efetivo ( $\Phi_{PSII}$ ), obtido a partir da fluorescência da clorofila *a*, pode estimar a integridade do FSII de uma determinada folha, pois revela o nível energético de excitação dos pigmentos que dirigem à fotossíntese (O'NEIL et al. 2006). Esse nível depende do balanço entre irradiação e da soma das taxas de fotossíntese e dissipação térmica (SCHOLES & HORTON, 1993). Segundo Campostrini (2008), essa técnica apresenta-se como uma ferramenta de grande potencial nos estudos relacionados aos efeitos dos fatores do ambiente sobre o processo fisiológico em plantas, indicando ausência ou presença de comprometimento no processo fotossintético.

As principais variáveis observadas nas medições da fluorescência da clorofila *a* são: fluorescência inicial ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ), fluorescência variável ( $F_v$ ) e rendimento quântico máximo do FSII ( $F_v/F_m$ ). O  $F_0$  representa a fluorescência com

todos os centros de reação “abertos” e refere-se à emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila *a* do complexo coletor de luz do FSII. O  $F_m$  indica a completa redução da quinona A (QA) a partir da incidência de um pulso de luz saturante no centro de reação QA, gerando fluorescência máxima. A diferença entre  $F_m$  e  $F_0$  resulta na fluorescência variável ( $F_v$ ), que representa o fluxo de elétrons do centro de reação do FSII (P680) até a plastoquinona ( $PQH_2$ ). O rendimento quântico máximo é calculado como:  $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$  (MAXWELL & JOHNSON, 2000). Para a eficiência quântica efetiva (Yield), determinada no claro,  $F'_m =$  Fluorescência máxima em folhas à luz ambiente;  $F_s =$  fluorescência inicial em ambiente claro, sendo o rendimento quântico efetivo obtido pela seguinte formula:  $(F'_m - F_s)/F'_m$ .

Dessa forma, a habilidade em manter elevadas razões  $F_v/F_m$  e o  $\Phi_{PSII}$  sob estresse hídrico pode ser um indicativo de eficiência no uso da radiação pela fotoquímica e pela assimilação de carbono, assim como uma resposta relativamente rápida de  $F_v/F_m$  ao estresse hídrico moderado pode ser um traço importante para seleção de germoplasma de cana-de-açúcar tolerantes à seca (SILVA et al., 2007). Por outro lado, a eficiência fotoquímica inalterada durante períodos de estresse indica que os genótipos apresentam uma alta recuperação de danos temporários de fotoinibição no fotossistema II, do contrário, para as duas variáveis, pode ser um indicativo de fotoinibição associado a danos no FSII (MAXWELL & JOHNSON, 2000).



## CAPÍTULO 1

### **Fluorescência do fotossistema II e pigmentos fotossintéticos em genótipos de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica**

#### **1.1 INTRODUÇÃO**

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura de importância mundial, não só apenas para a produção de açúcar e álcool, mas também como uma das culturas bioenergéticas, devido à sua grande capacidade de produção de matéria seca. A seca é um dos estresses ambientais que mais limita a produção mundial de cana (O'NEIL et al. 2006, SILVA et al., 2007). Devido à natureza irregular das chuvas, os produtores de cana são dependentes de tecnologias de irrigação para atender seus objetivos de produção. Entretanto, a disponibilidade de água para irrigação é limitada, necessitando de uso criterioso e gestão eficaz, para diminuir os custos e garantir a manutenção da produtividade. Dessa forma, estudos de natureza fisiológica envolvendo genótipos de cana-de-açúcar, buscando identificar aqueles que são resistentes às condições adversas, são cruciais nas áreas de maior limitação hídrica (HASEGAWA et al., 2000; MUNNS, 2002).

O máximo potencial fotossintético da cultura raramente é alcançado, devido aos fatores ambientais desfavoráveis incluindo, principalmente, a seca. Salientando, ainda, que o grau de limitação da produção pelo meio ambiente varia entre os genótipos dentro de uma espécie (AGUILERA et al., 1999). As relações hídricas são indicadores de estresse hídrico em plantas de milho, refletindo o quanto de água está disponível no solo para as plantas (BERGONCI et al., 2000; BIANCHI et al., 2005). A exposição ao déficit hídrico pode induzir alterações nos processos fotobiológicos nas plantas,

resultando em restrições estomáticas ao fornecimento de dióxido de carbono, a perda de vapor de água, bem como as limitações de componentes não estomáticos, como danos aos centros de reações dos fotossistemas I e II (FSI e FSII) comprometendo a eficiência da fotossíntese (SILVA et al 2007).

Embora, medidas da taxa fotossintética em folhas tenham se mostrado confiáveis para distinguir evidências de resistência à seca em alguns tipos de plantas (GIMENEZ et al.,1992), essas técnicas de avaliação são trabalhosas e de pouca praticidade (SILVA et al., 2007). O'Neil et al. (2006) e Silva et. al., (2007), trabalhando com milho e cana-de-açúcar, respectivamente, mostram que os métodos indiretos de medir atividade fotossintética e a integridade do fotossistema II, que podem ser avaliadas através de medidas de emissão de fluorescência podem ser tão eficazes quanto as técnicas de avaliação de trocas gasosas. A medida da emissão de fluorescência pode ser determinada através da fluorescência inicial ( $F_0$ ), da fluorescência máxima ( $F_m$ ) e da fluorescência variável que permitem calcular a relação  $F_v/F_m$ , a qual reflete o rendimento quântico potencial do FSII. Além de medidas do rendimento quântico efetivo ( $\Phi_{PSII}$ ), podemos incluir o teor de clorofila estimada (índice SPAD).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a tolerância à seca através da análise do comportamento fotossintético medido por meio da emissão de fluorescência da Clorofila *a* e dos teores de pigmentos fotossintéticos em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos à deficiência hídrica.

## 1.2 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em casa-de-vegetação e no laboratório de Fisiologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, localizado no município de Rio Largo (09°28' S, 35°49' W e 127 m de altitude), no período de 11/11/2008 a 07/04/2009. Foram utilizados seis genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) oriundos do Programa de Melhoramento Genético da Cultura da cana-de-açúcar (PMGCA/CECA/UFAL). Deste, três são variedades comerciais (RB931011, RB931013 e RB72910) e três são materiais em processo de seleção, identificados nesse trabalho como CL001, CL002 e CL003. O experimento foi disposto em delineamento inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial, 6 (genótipos) x 3 (níveis de água), com quatro repetições. Através da curva de retenção de umidade do

solo, obteve-se o ponto de murcha permanente (a -1,5 MPa) e a capacidade de campo (a -0,03 MPa), sendo os mesmos de 10,5 e 25% da massa seca do solo, respectivamente. Os níveis de água foram assim definidos: controle (80-100% da água disponível no solo AD); estresse moderado (40-60% AD); e estresse severo (0-20% AD).

O material vegetal utilizado para plantio consistiu de toletes com uma gema, previamente tratados com solução de hipoclorito de sódio a 0,1% (v/v) e com o fungicida Derosal 500 na dose de 100 mL/100 kg e semeados em caixas plásticas contendo substrato na proporção 2:2:1, solo:fibra de coco:torta de filtro, respectivamente. No dia 07/11/2008, aos dezenove dias após a semeadura, foram transplantadas duas plântulas para cada vaso plástico contendo 15 kg de solo, previamente destorroado e peneirado. Após o estabelecimento das plantas, aos 80 dias após o transplântio, os vasos foram pesados diariamente com o auxílio de uma balança digital, para estabelecimento dos níveis de água de acordo com os tratamentos adotados.

Os dados meteorológicos foram registrados a cada 15 minutos, em uma estação meteorológica automática (Weather Station) modelo WS – GP1 (AT DELTA – T Devices, Cambridge – England) localizada no interior da casa-de-vegetação, ao longo do período de imposição dos tratamentos, os quais foram coletados e, posteriormente, transformados para dados horários e calculados as médias diárias (Apêndices).

As medidas fisiológicas foram realizadas a intervalo de 15 dias após o início do transplântio, utilizando-se a folha +2. A intensidade de verde foliar foi determinada com auxílio do SPAD-502 (Minolta Corporation, Ramsey, USA), sendo as médias obtidas a partir de 10 leituras em cada planta, segundo Markwell et al. (1995). Para medidas de fluorescência da clorofila *a* utilizou-se um fluorômetro portátil de luz de frequência modulada (Opti-Sciences, modelo OS1-FL, Hudson, USA), obtendo-se fluorescência inicial (F0), a fluorescência máxima (Fm) e o rendimento quântico potencial do FSII (Fv/Fm), sendo as leituras realizadas nos horários entre 4 a 5 horas (ante-manhã) e entre 11 a 12 horas (meio-dia). Visando quantificar em cada planta o grau de fotoinibição do fotossistema II provocado pelo estresse hídrico, no horário do meio-dia, após cerca de 20 minutos de relaxamento do aparelho fotossintético ou adaptação ao escuro com uso de presilhas plásticas, foram efetuadas duas leituras do terço médio da folha, de acordo com Maxwell e Johnson (2000). Neste horário

também foram realizadas as leituras no claro, para obtenção da fluorescência efetiva ( $\Phi$ PSII). Estas leituras foram realizadas em quatro épocas distintas e calculadas as médias das quatro épocas.

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) foi medido na folha +2 de uma das plantas do vaso (que se encontrava em estado intacto) ao final do experimento (170 DAT), com o auxílio de uma bomba de pressão (Soil Moisture, Equipment corporation, Santa Barbara, USA) em dois horários: ante-manhã (5:00 horas) e meio-dia (12:00 horas). A mesma folha foi utilizada para extração dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides) em acetona a 80% (v/v), os quais foram quantificados segundo metodologia descrita por Hendry & Grime (1993).

Os dados de  $\Psi_w$ , Fv/Fm,  $\Phi$ PSII, leituras SPAD e teores de clorofilas e de carotenóides foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) sofreu efeito significativo de todos os fatores estudados e de sua interação, enquanto que a eficiência quântica potencial (Fv/Fm) sofreu efeito dos fatores isolados e a eficiência quântica efetiva ( $\Phi$ PSII) sofreu efeito apenas da condição hídrica (CH). O índice SPAD sofreu efeito dos fatores isolados genótipo e condição hídrica, pelo teste F (Tabela 1.1).

Para todas as condições hídricas, as plantas apresentaram valores significativamente mais elevados para  $\Psi_w$ , no *predawn* em relação ao meio dia com diferença entre os genótipos (Figura 1.2). No *predawn* valores de  $\Psi_w$  para o nível de maior restrição hídrica (-0,19 MPa), foram semelhantes aos encontrados por Inman-Bamber & Smith (2005), em plantas de cana-de-açúcar sob restrição de irrigação, que observaram resultados de  $\Psi_w$  de -0,19 MPa. Em contrapartida, foram inferiores aos valores encontrados por Gonçalves (2008), o qual trabalhando com níveis de estresse hídrico semelhantes observou  $\Psi_w$  de -0,11 MPa na variedade RB72454 indicando baixa tolerância a estresse hídrico.

**Tabela 1.1** Valores de F obtidos da análise de variância para atributos fisiológicos:  $\Psi_w$ , Fv/Fm,  $\Phi$ PSII e índice SPAD em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos ao tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivados em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio.

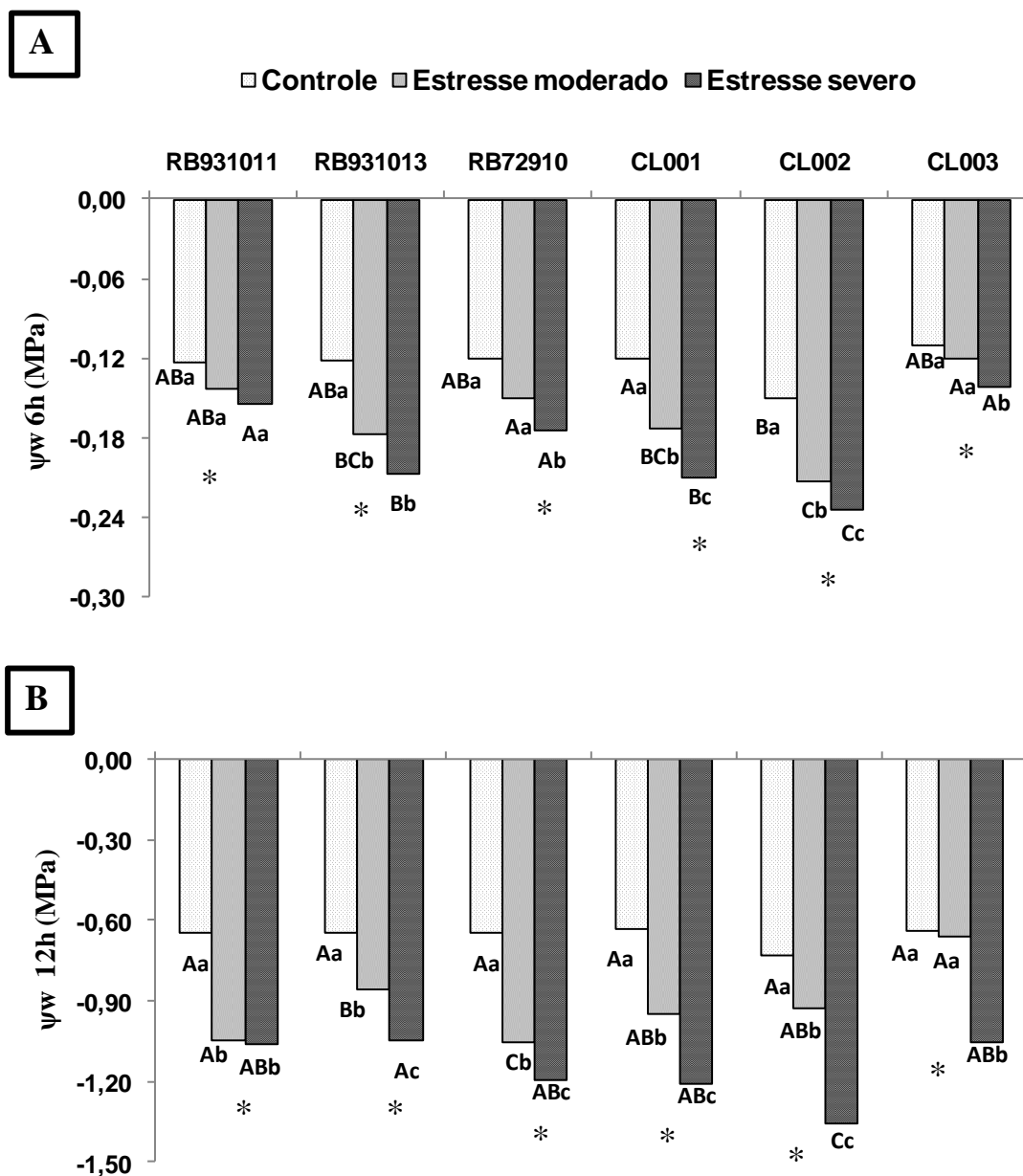
Fonte de variação	Atributos fisiológicos			
	$\Psi_w$	Fv/Fm	$\Phi$ PSII	SPAD
Genótipos (G)	18,75**	3,846*	1,68 <sup>ns</sup>	8,14**
Cond. Hídrica (CH)	265,24**	7,147*	44,93**	11,58**
Horário (H)	617,14**	300,521**	---	---
G x CH	9,23**	0,283 <sup>ns</sup>	1,59 <sup>ns</sup>	0,569 <sup>ns</sup>
G x H	4,93**	1,034 <sup>ns</sup>	---	---
CH x H	141,93**	0,461 <sup>ns</sup>	---	---
CH x G x H	5,96**	0,181 <sup>ns</sup>	---	---
CV (%)	8,50	2,16	6,5	10,9

ns, \*\*, \* não significativo, 1% e 5% de probabilidade, pelo teste F.

Esse comportamento pode ser considerado normal, pois segundo Inman-Bamber (2005), ao meio-dia, com o aumento da evapotranspiração, soma-se à diminuição da disponibilidade hídrica e a redução da absorção da água e o seu transporte da raiz a parte aérea. Provocando redução no  $\Psi_w$  foliar no final do dia, com o declínio da evaporação, o potencial hídrico das folhas tende a reduzir e aproximar-se do  $\Psi_w$  do solo durante o período noturno.

No início da manhã, os genótipos diferiram entre si quanto ao  $\Psi_w$  do *predawn*, quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica severa, sendo que o CL003, nessas condições apresentou maior capacidade de recuperação apresentando maior valor (-0,14 MPa), enquanto o CL002 apresentou o menor valor de  $\Psi_w$  (-0,24 MPa) (Figura 1.2A).

Ao analisar os genótipos dentro dos tratamentos, verifica-se que o  $\Psi_w$  foliar *predawn* não apresentou diferença significativa entre os níveis de estresse hídrico na RB931011 (Figura 1.1 A). Em contrapartida, houve redução no  $\Psi_w$  para os demais genótipos à medida que a disponibilidade hídrica foi reduzida, sendo que no estresse hídrico mais severo, a RB931013 e CL002 foram aqueles que apresentaram os menores valores de  $\Psi_w$  foliar, bem como as maiores taxas de redução, em comparação com o tratamento controle (cerca de 69%).



**Figura 1.1** Potencial hídrico foliar  $\Psi_w$  da antemã (A) e ao meio-dia (B) em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivados em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio em vasos. Médias seguidas de letras iguais, tanto para tratamentos dentro de genótipos (letras minúsculas), como para genótipos dentro de tratamentos (letras maiúsculas), não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. \* Indicam diferença significativa entre os horários para os três tratamentos.

Para o comportamento do  $\Psi_w$  das plantas ao meio-dia (Figura 1.1 B), foram observadas diferenças significativas em todos os genótipos, sendo que a variedade RB931011 apresentou a menor redução para o estresse severo em relação ao controle (38,2%), essas plantas também apresentaram redução de mesma ordem para o estresse moderado (36,4%).

Possivelmente, o genótipo RB931011 consegue sobreviver por um longo período de tempo com os seus protoplasmas hidratados sob condições hídricas adversas, como discutido por Silva et al. (2007), e também observado por Robertson et al. (1999), onde ocorreu redução do potencial osmótico e, por conseguinte, um incremento na absorção de água ao meio dia, em condições semelhantes. Por outro lado os genótipos RB72910, CL001 e o CL002 apresentaram os maiores percentuais de redução entre o estresse severo e o controle, com valores de 88,2, 88,3 e 82,2%, respectivamente. Estas reduções severas no  $\Psi_w$  podem ser atribuídas à menor regulação do controle de abertura estomática ocasionando maiores perda de água das folhas por transpiração, bem como à menor capacidade de absorção e houve e transpiração de água ou a ambas.

Sob condições de campo, Smit & Sangels (2006), trabalhando com duas variedades de cana-de-açúcar, encontraram correlações positivas entre o potencial hídrico foliar e o conteúdo de água disponível no solo, as quais atingiram valores de  $\Psi_w$  próximos de -2,0 MPa, quando o solo apresentava cerca de 20% da água disponível.

De modo geral, a eficiência fotoquímica (Fv/Fm) dos genótipos em função do estresse hídrico, no início da manhã e ao meio-dia, mostrou reduções significativas (Tabela 1.2). Para o efeito entre os dois horários (5:00 e meio-dia) verificou-se diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey, com uma redução de aproximadamente de 5% do primeiro para o segundo horário (Tabela 1.2). Aparentemente os danos apresentados ao meio-dia foram recuperados durante o período noturno, mostrando valores de Fv/Fm mais elevados na antemanhã.

Em geral, notou-se redução de 1,3% para o tratamento de maior restrição hídrica, quando comparado ao tratamento controle, que não diferiu do estresse moderado.

**Tabela 1.2** Leituras quinzenais de eficiência quântica potencial (Fv/Fm) e efetiva ( $\Phi$ PSII), em dois horários, de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos ao tratamento controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 após o plantio. Os valores representam as médias de quatro épocas de leituras distintas.

Fatores	Fv/Fm	$\Phi$ PSII
<b>Horários (H)</b>	<b>Média</b>	
5 hora da manhã	0,7822 a	---
Meio-dia	0,7432 b	---
<b>Cond. Hidrica (CH)</b>		
Controle	0,7681 a	0,676 a
Estresse Moderado	0,7623 ab	0,649 b
Estresse Severo	0,7577 b	0,619 c
<b>Genótipos</b>		
RB931011	0,7689 a	0,642 a
RB931013	0,763 ab	0,654 a
RB72910	0,7611 ab	0,654 a
CL001	0,7538 b	0,636 a
CL002	0,7678 a	0,656 a
CL003	0,7616 ab	0,647 a

Medias seguidas de letras iguais, não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

Constatou-se um possível dano fotooxidativo no aparato fotossintético das plantas devido a diferença de intensidade luminosa entre 4 e 5 horas da manhã e ao meio-dia. Isso caracteriza a fotoinibição dinâmica ocorrida em alguns dos genótipos, especialmente no CL001. Os genótipos diferiram entre si na relação Fv/Fm, sendo que os RB931011 e o CL002 que apresentaram os maiores valores para a variável, diferindo estatisticamente apenas do CL001 o qual apresentou o menor valor (Tabela 1.2). De acordo com Liberato et al. (2006), esse mecanismo pode ser indicativo da capacidade das plantas em recuperar sua atividade fotossintética sob condições adversas, apresentando também proteção na proteína D1.

De acordo com Silva et al. (2007), plantas que estão com aparelho fotossintético intacto, apresentam valores médios da relação Fv/Fm variando de 0,75 a 0,85, enquanto que, reduções desses valores refletem danos fotooxidativos causados por fotoinibição no centro de reação do PSII. Os valores observados nos genótipos se encontram dentro do intervalo citado anteriormente, mas são menores do que os valores apresentados por Silva et al. (2007), que encontraram valores de 0,80 em genótipos de cana-de-açúcar sob condições de irrigação.



Silva et al., (2007) estudando variedades de cana-de-açúcar tolerantes à seca, após 90 dias sob restrição hídrica, observaram redução de aproximadamente 6% na eficiência quântica efetiva relação ao controle. Essa capacidade dos genótipos de manter a relação  $F_v/F_m$  sob estresse hídrico, pode indicar uma alta eficiência do uso da radiação, eventualmente, para a fase fotoquímica e assimilação de carbono (COLOM & VAZZANA, 2003). Além disso, protegem o fotossistema II de inativação por fotoinibição, ocasionada pela degradação das proteínas D1 e D2, responsáveis pelo transporte de elétrons da água para a clorofila associada ao mesmo centro de reação (LIBERATO et al., 2006).

Para a eficiência quântica efetiva ( $\Phi_{PSII}$ ), foi verificada diferença significativa apenas para os níveis de deficiência hídrica, (Tabela 1.3). Isso indica uma redução de utilização da energia luminosa para as reações fotoquímicas da fotossíntese nesses genótipos (MAXWELL & JONHSON, 2000). Outros autores mostram que alterações no fotossistema II sob baixa disponibilidade de água no solo estão diretamente relacionadas com danos causados por fotoinibição (BAKER & ROSENQVIST, 2004).

Com a redução da disponibilidade hídrica do solo, observou-se decréscimo nos pigmentos fotossintéticos das folhas, estimados pelo índice do clorofilômetro SPAD-502 (Tabela 1.3). Entre os genótipos constatou-se a maior redução (13,1%) no genótipo RB72910 para o estresse severo quando comparado ao controle. Os genótipos RB931011 e CL003 apresentaram as menores reduções (8,4 e 9,2%, respectivamente) para a mesma variável, quando comparado ao controle (Tabela 1.3).

Esses valores são superiores aos observados por Silva et al. (2007), trabalhando com grupos de variedades tolerantes o déficit hídrico, encontraram reduções de 3,1%, entre o estresse hídrico e o controle. Essa diferença pode ser atribuída ao fato de que os autores trabalharam sob condições de campo, onde a deficiência hídrica se estabelece de forma gradual.

Gonçalves (2008), estudando cana-de-açúcar sob restrição hídrica em casa-de-vegetação, observou reduções de 11,6%, na mesma variável, para a condição de restrição hídrica severa quando comparado ao controle. Do mesmo modo, O'Neil et al, (2006), obtiveram reduções de 7,8% em híbridos de milho submetidos a deficiência hídrica.

**Tabela 1.3** Índice SPAD em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação.

SPAD				
Genótipos	Controle	Est. Moderado	Est. Severo	Média
<b>RB931011</b>	42,36 Aa	39,75 Aab	38,79 Ab	40,30 a
<b>RB931013</b>	43,07 Aa	40,39 Aa	39,15 Aa	40,87 a
<b>RB72910</b>	39,15 ABa	38,86 Aa	34,01 ABb	37,34 bc
<b>CL001</b>	38,97 ABa	38,87 Aa	37,57ABa	38,85ab
<b>CL002</b>	40,11 ABa	38,34 Aa	37,65 ABCa	38,70 abc
<b>CL003</b>	36,85 Ba	35,33Bab	33,43 Cb	35,20 c
<b>Media</b>	9,66a	38,27a	36,53b	

Medias seguida de letras iguais, tanto para tratamentos dentro de genótipos (letras minúsculas), como para genótipos dentro de tratamentos (letras maiúsculas), não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.

A degradação de clorofila é uma das conseqüências do estresse hídrico, resultante da fotoinibição e do foto-branqueamento, que pode causar declínio no índice SPAD, que por sua vez serve como uma medida rápida usada como ferramenta indicativa da seca (LONG et al., 1994).

Para os teores de clorofila *a*, *total* e carotenóides houve efeito altamente significativo, a nível de 1% de probabilidade, pelo teste F, para genótipos (G) e condição hídrica (CH), sendo que para interação G x CH apresentou efeito significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste F (Tabela 1.4).

O teor de clorofila *total* obtidos por extração apresentou coerência com os índices obtidos com o clorofilômetro SPAD-502, sofrendo reduções significativas de acordo com a severidade do estresse (Tabela 1.5). As reduções nos teores de clorofilas, cerca de 20,6%, foram inferiores as obtidas por Cruz (2006), em milho sob níveis de estresse hídrico, que observou reduções superiores a 30% nos teores de clorofila em relação ao controle, indicando que essas plantas podem apresentar baixa eficiência na absorção de radiação.

**Tabela 1.4** Valores de F obtidos da análise de variância para os teores de clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), clorofila total (Chl *Total*), relação clorofila *a/b* (Chl *a* / Chl *b*) e carotenóides em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivadas em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio.

FATORES	Pigmentos fotossintéticos				
	Chl <i>a</i> (mg.g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>b</i> (mg.g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>Total</i> (mg.g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>a/Chl b</i>	Carotenóides (μmol.g <sup>-1</sup> MF)
<b>Genótipos (G)</b>	16,514**	4,909**	15,447**	4,332*	9,610**
<b>Cond. Hídrica (CH)</b>	35,315**	1,220 <sup>ns</sup>	27,381**	9,608*	31,410**
<b>G x CH</b>	3,066*	1,538 <sup>ns</sup>	2,974*	1,120 <sup>ns</sup>	4,784*
<b>CV (%)</b>	6,66	9,54	6,01	10,81	8,64

ns, \*\* e \* = não significativo, significativo a 1 e a 5% de probabilidade, respectivamente.

Para os teores de clorofila *b* houve efeito altamente significativo altamente significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, apenas para genótipos. E por ultimo para a relação Chl *a/Chl b* houve efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para G e para interação G x CH (Tabela 1.4).

Analisando-se os genótipos na condição de controle observou-se que o RB931011 apresentou os maiores valores de clorofila *a* e *total* (Tabela 1.5). Observou-se ainda que o mesmo genótipo, quando submetido ao estresse moderado, comportou-se de forma semelhante ao controle, apresentando valores de clorofilas *a*, *b* e *total* superiores ou iguais aos demais genótipos na mesma condições hídrica (Tabela 1.5).

Gonçalves (2008) encontrou um decréscimo de 46,7% no teor de clorofila total em variedades de cana-de-açúcar sob restrição hídrica, atribuindo tal redução às mudanças na proporção de proteínas e lipídeos do complexo pigmento-proteína, ou ainda devido ao aumento da atividade da clorofilase, enzima que degrada as moléculas de clorofila existentes.

As respostas apresentadas pelo genótipo RB931011, quanto aos teores de clorofilas, pode ser uma característica importante, pois o mesmo apresentou valores de Fv/Fm mais elevados que os demais genótipos em condição de controle (Tabela 1.5). O CL003 apresentou redução significativa apenas no teor de clorofila *total* de 13,2 %, embora não apresentando redução no teor de carotenóides, em função da severidade do estresse hídrico (Tabela 1.5).

**Tabela 1.5** Teores de clorofila a (Chl *a*), clorofila b (Chl *b*), clorofila total (Chl *Total*), relação clorofila *a/b* (Chl*a* / Chl*b*) e carotenóides em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo – AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivadas em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio.

Genótipos	Trat.	Pigmentos Fotossintéticos				
		Chl <i>a</i> (mg.g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>b</i> (mg.g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>Total</i> (mg.g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>a/Chl b</i>	Carotenóides (μmol.g <sup>-1</sup> MF)
RB931011	C	1,85 Aa	0,54 Aa	2,39 Aa	3,43 Aa	0,58 Aa
	EM	1,56 Ab	0,53 Aa	2,09 Ab	3,00 ABb	0,56 Aa
	ES	1,36 Abc	0,53 Aa	1,88 ABc	2,58 Ac	0,51 Aa
RB931013	C	1,64 Ba	0,54 Aa	2,19 ABa	3,04 Aa	0,57 Ba
	EM	1,53 Aba	0,54 Aa	2,05 ABa	2,94 ABa	0,48 Aa
	ES	1,51 Aa	0,52 Aa	2,05 Aa	2,79 Aa	0,43 BCb
RB72910	C	1,58 Ba	0,53 Aa	2,07 BCa	3,28 Aa	0,55 Aba
	EM	1,37 Ca	0,49 Bab	1,90 Ca	3,17 Aa	0,51 Aa
	ES	1,28 ABb	0,41 Ab	1,70 ABb	2,60 Aa	0,51 Aa
CL001	C	1,36 Aa	0,54 Aa	1,90 Ca	2,56 Aa	0,48 Ba
	EM	1,31 Ba	0,53 Aa	1,84 BCab	2,52 Bab	0,39 Bab
	ES	1,20 Ca	0,48 Aa	1,68 Ab	2,51 Ab	0,38 Cb
CL002	C	1,46 ABa	0,46 Aa	1,92 Ca	3,15 Aa	0,53 Aba
	EM	1,35 Ca	0,46 ABa	1,81 BCa	2,96 ABa	0,44 BCa
	ES	1,32 Ba	0,45 Aa	1,77 Aa	2,91 Aa	0,43 ABb
CL003	C	1,52 ABa	0,52 Aa	2,02 BCa	2,99 ABa	0,48 Aa
	EM	1,46 ABCb	0,51 ABa	1,97 ABa	2,85 ABa	0,48 Aa
	ES	1,52 Bb	0,48 Aa	1,77 Ab	2,69 Aa	0,48 BCa
CV (%)		7,10	9,54	6,10	10,80	8,64

Tratamentos: C = controle; EM = estresse moderado; ES = estresse severo. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, tanto para tratamentos dentro da variedade (letras minúsculas), como para variedades dentro de tratamento (letras maiúsculas), não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Por outro lado, Gonçalves et al. (2008), estudando o desenvolvimento inicial da variedade RB92579, observou uma redução de 33,5% no teor de clorofila *total*, enquanto que os teores de carotenóides permaneceram inalterados. Plantas com este comportamento podem ser classificadas como dotadas de eficientes sistemas de fotoproteção, onde, mesmo apresentando reduções em seu teor de clorofila total, mantêm os carotenóides intactos.

O genótipo RB72910 apresentou reduções significativas para os teores de clorofila *chl a*, *chl b*, e total relação *a/b*, como observado para o genótipo RB931011, continuou com seus teores de carotenóides sem diferenciar do controle, em função do estresse hídrico. Os demais genótipos quando (RB931013, CL001 e CL002) quando

submetidos à restrição hídrica severa, , foram os que apresentaram reduções nos teores de carotenóides de 24,7, 38,6 e 18,6%, respectivamente, em relação ao controle. Também reduções nos teores de carotenóides obtidas em estudos de restrições hídrica, foram obtidas por Cruz (2006), em milho (41,2%), e por Zhang & Kirkham, (1996) em sorgo (23,7%).

Os mais altos teores de carotenóides encontrados no tratamento controle foram dos genótipos RB931011 e RB931013 (0,58 e 0,57  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF). Estes, genótipos juntamente com o CL001, apresentaram os maiores valores de clorofila *b* (0,54  $\text{mg.g}^{-1}$  MF). Os genótipos RB931011 e RB72910 apresentaram os maiores valores para essa variável nas condições de estresse hídrico severo (0,51  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF) (Tabela 1.5).

Os genótipos que mantiveram os teores de carotenóides sob deficiência hídrica apresentado pelo RB931011, RB72910 e CL003 pode ser indicativo de menor dano fotooxidativo proveniente do estresse abiótico, assim como observado por Gonçalves (2008) e Zhang & Kirkham, (1996) em cana-de-açúcar e sorgo, pois tais pigmentos proporcionam fotoproteção dos vegetais (LARCHER, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2009).

#### 1.4 CONCLUSÕES

Dentre os genótipos estudados, a RB931011 e o CL003 apresentam capacidade de manter a hidratação foliar mantendo  $\Psi_{ws}$  mais elevados que as demais sob condições de estresse hídrico.

Horário de leitura, condição hídrica e genótipos interferem na eficiência quântica potencial, sendo que o período próximo ao meio-dia e sob estresse severo o clone CL001 é mais suscetível aos fatores fotooxidativos.

O estresse hídrico reduz a eficiência quântica efetiva, de forma pronunciada a sua intensidade, independente do genótipo.

Os pigmentos fotossintéticos são reduzidos sob restrições hídrica, entretanto o teores de carotenóides afetado pela seca nos genótipos RB931011 e RB72910 e CL003, indicando que os mesmos apresentam capacidade de evitar danos fotooxidativos ao aparato fotossintético.

## CAPÍTULO 2

### **Osmorreguladores e defesa oxidativa em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos à deficiência hídrica**

#### **2.1 INTRODUÇÃO**

O estresse hídrico é um fator que afeta negativamente a produção da cana-de-açúcar na região Nordeste. Nesse sentido, o desenvolvimento de variedades resistentes a seca assume particular importância no panorama de alterações climáticas, em que há perspectiva de aumento da temperatura e prolongamento das restrições hídricas, causando alterações em níveis fisiológicos e metabólicos (Bruce et al., 2002).

Uma das respostas a deficiência hídrica, comumente observadas, refere-se ao acúmulo de solutos orgânicos, tais como, proteínas, carboidratos, N- $\alpha$ -amino e prolina (BRAY, 1997). Estas respostas podem conduzir ao ajustamento osmótico e à manutenção de um status hídrico favorável para o metabolismo. Neste caso, os solutos são denominados osmorreguladores (INMAN-BAMBER & SMITH, 2005).

Dentre os osmorreguladores pode-se destacar a prolina que por sua vez, pode inibir a degradação acelerada das proteínas e diminuir o acúmulo de aminoácidos livres, além do mais, uma característica marcante na mudança do metabolismo das proteínas são mudanças na proporção dos aminoácidos e, freqüentemente, um aumento elevado na concentração de prolina (FUMIS & PEDRAS, 2002). No entanto, este soluto indicador e protetor do estresse hídrico, parece não ser um bom indicador de resposta ao estresse hídrico, conforme observado por Pinho & Ansel (1995) avaliando os teores de solutos osmoticamente ativos em folhas de milho e sorgo.

A nível celular, as proteínas podem ser danificadas, por falta de hidratação, o que proporciona aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) (CASTRILLO et al., 2001). Uma vez formadas, os EROs devem ser eliminadas o quanto antes possível para minimizar eventuais danos. Em particular, elas induzem peroxidação de lipídios que causa danos irreversíveis à integridade estrutural e funcional das membranas celulares (SAMARAS,1995). Por isto, a estabilidade das membranas celulares é extensamente usada como indicativo de tolerância de plantas ao estresse (BAJJI et al. 2002). Uma das formas de se avaliar o dano às membranas é através do acúmulo de aldeido malônico (MDA), sob condições de seca (BACELAR et al. 2006; MASIA 2003).

O mecanismo de detoxificação constitui a primeira linha de defesa contra os efeitos prejudiciais das EROs (GRATÃO et al., 2005), portanto as células das plantas são protegidas por um eficaz sistema antioxidante, incluindo sistemas não-enzimáticos (ascorbato, glutatona e o tocoferol etc.) e enzimáticos, estes formados pela enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (NOCTOR & FOYER, 1998).

Existem ainda lacunas do conhecimento sobre o comportamento destas enzimas em plantas cultivadas sob condições adversas. Alguns autores afirmam que sob condições de déficit hídrico, a SOD apresenta comportamento diverso podendo manter-se inalterada, aumentar ou diminuir sua atividade (WANG & HUANG, 2004). Vasconcelos et al. (2009) afirmam que em milho e soja o comportamento da CAT e APX são semelhantes, aumentam de acordo com a intensidade do estresse.

O estudo tem como objetivo avaliar o comportamento de osmorreguladores, peroxidação de lipídios e atividades das enzimas SOD, APX e CAT em folhas de seis genótipos de cana-de-açúcar sob níveis de déficit hídrico.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em casa-de-vegetação e no laboratório de Fisiologia Vegetal do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, localizado no município de Rio Largo (09°28' S, 35°49' W e 127 m de altitude), no período de 11/11/2008 a 07/04/2009. Foram utilizados seis genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) oriundos do Programa de Melhoramento Genético da Cultura da cana-de-açúcar (PMGCA/CECA/UFAL). Deste, três são variedades comerciais



(RB931011, RB931013 e RB72910) e três são materiais em processo de seleção, identificados nesse trabalho como CL001, CL002 e CL003. O experimento foi disposto em delineamento inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial, 6 (genótipos) x 3 (níveis de água), com quatro repetições. Através da curva de retenção de umidade do solo, obteve-se o ponto de murcha permanente (a -1,5 MPa) e a capacidade de campo (a -0,03 MPa), sendo os mesmos de 10,5 e 25% da massa seca do solo, respectivamente. Os níveis de água foram assim definidos: controle (80-100% da água disponível no solo AD); estresse moderado (40-60% AD); e estresse severo (0-20% AD).

O material vegetal utilizado para plantio consistiu de toletes com uma gema, previamente tratados com solução de hipoclorito de sódio a 0,1% (v/v) e com o fungicida Derosal 500 na dose de 100 mL/100 kg e semeados em caixas plásticas contendo substrato na proporção 2:2:1, solo:fibra de coco:torta de filtro, respectivamente. No dia 07/11/2008, aos dezenove dias após a semeadura, foram transplantadas duas plântulas para cada vaso plástico contendo 15 kg de solo, previamente destorroado e peneirado. Após o estabelecimento das plantas, aos 80 dias após o transplante, os vasos foram pesados diariamente com o auxílio de uma balança digital, para estabelecimento dos níveis de água de acordo com os tratamentos adotados.

Os dados meteorológicos foram registrados a cada 15 minutos, em uma estação meteorológica automática (Weather Station) modelo WS – GP1 (AT DELTA – T Devices, Cambridge – England), instalada no interior da casa-de-vegetação, ao longo do período de imposição dos tratamentos, os quais foram coletados e, posteriormente, transformados, para dados horários e calculados as médias diárias (Apêndices).

Na coleta final, aos 170 DAT, a folha +1 da planta principal foi coletado para determinação dos solutos orgânicos, MDA e atividade enzimática. Adotados todos os cuidados nos procedimentos de coleta, as folhas foram cortadas sem a nervura central e colocadas em papel alumínio, devidamente identificados, para em seguida serem congeladas em nitrogênio líquido e armazenada em ultra-freezer a -80 °C. Posteriormente, apenas para os solutos orgânicos, o material foi liofilizado para em seguida proceder às análises.

## **Determinação dos Teores dos Osmorreguladores**

### **Prolina livre**

Para determinação dos teores de prolina livre, com auxílio de uma balança analítica, pesou-se 100 mg de material vegetal liofilizado, macerado em almofariz com 8 mL de ácido sulfossalicílico a 3% , sendo a mistura deixada em repouso, com agitação a cada 15 minutos, por uma hora, à temperatura ambiente (25°C). Após esse período foi centrifugado à 3.000 x g por 5 minutos, em temperatura ambiente, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante (extrato) usado para determinação de prolina livre pelo método descrito por Bates et al. (1973). Para a reação, foram usados tubos de ensaio com tampas rosqueadas, nos quais foram adicionados 2 mL de cada extrato, 2 mL de ninhidrina ácida e 2 mL de ácido acético glacial, deixando-se a mistura em banho-maria à 100 °C por uma hora para desenvolvimento da cor. Logo em seguida, os tubos de ensaio foram colocados em banho de gelo por 10 minutos para cessar a reação. A extração do cromóforo foi feita pela adição de 2 mL de tolueno à mistura de reação, seguida de agitação vagarosa por 20 segundos. Após o repouso e formação da mistura bifásica, com uso de uma pipeta de Pasteur a fase superior foi retirada, para quantificação dos níveis de prolina livre. As leituras foram feitas através espectrofotômetro no comprimento de ondas de 520 nm, utilizando-se o tolueno usado como branco. Utilizou-se como padrão a prolina pura e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS. Cada repetição (amostra) foi representada por um extrato simples dosado em triplicata.

### **Carboidratos Solúveis**

Os carboidratos solúveis foram determinados a partir de amostras de 20 mg de tecido foliar liofilizado, macerados em almofariz com 2 mL de água destilada, mais 2 mL para lavar a mistura a 4 mL. A mistura permaneceu em repouso durante uma hora, sendo submetida a agitações a cada 15 minutos, posteriormente, à temperatura ambiente, foi centrifugada à 3.000 x g, por 15 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi colocado em micro tubos de 2 mL e levado novamente para centrífuga a 6.000 g x 10 minutos. O sobrenadante (extrato) foi utilizado para determinação do carboidratos solúveis pelo método descrito por Dubois et al. (1956).

Em tubos de ensaio, com tampas rosqueadas, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  extrato puro + 450  $\mu\text{L}$  de água deionizada + 500  $\mu\text{L}$  de fenol à 5% (agitando) + 2,5 mL de

ácido sulfúrico concentrado. Em seguida a mistura foi agitada vagarosamente por 20 segundos, logo após permanecendo em repouso por 20 minutos, para o resfriamento e fixação da cor, em banho de gelo. As leituras de absorvâncias para carboidratos solúveis foram realizadas em 490 nm, sendo usado como branco a mistura de 500 µL de água deionizada + 500µL de fenol a 5% + 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Utilizou-se como padrão glicose anidra, e sendo os resultados foram expressos em µmol g<sup>-1</sup> MS. Cada repetição (amostra) foi representada por um extrato dosado em triplicata.

### **N-α-aminossolúveis e proteínas solúveis**

Para a determinação dos teores e N-α-aminossolúveis e proteínas solúveis, amostras de 20 mg do tecido foliar liofilizado foram maceradas em almofariz, homogeneizadas em banho de gelo, com 2 mL (1mL para macerar + 1 mL para lavar o almofariz) de tampão Na-K-fosfato 0,01 M, pH 7,6, contendo NaCl 0,1 M, e mantidas durante uma hora a 4 °C, sob agitação periódica (a cada 15 minutos). Decorrido este período, os homogenatos foram centrifugados 3.000 x g por 5 minutos, à temperatura de 4 °C, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante usado para determinação de N-α-aminossolúvel. Para determinação do osmorregulador, tomou-se uma fração de 1 mL do sobrenadante de cada amostra, separadamente, e adicionou-se uma alíquota de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e, após uma hora de repouso as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos, à temperatura de 4 °C, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante (extrato) usados para a determinação.

Para determinação do N-α-aminossolúvel, toma-se uma fração de 1 mL do sobrenadante de cada amostra, separadamente, e adiciona-se uma alíquota de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v) e agitar para homogeneizar. Após 1 h de repouso, as amostras deverão ser centrifugadas a 12.000 x g por 5 min, à temperatura de 4°C, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante (extrato) usado para determinação de N-α-aminossolúvel. Em tubos de ensaio com tampa rosqueada, deverão ser adicionados 0,5 mL do extrato; 0,25 mL de tampão citrato de sódio a 0,2 M e pH 5; 0,1 mL de ninhidrina a 5%, em metilcelosolve a 100%; e 0,5 mL de KCN a 0,2 mM em metilcelosolve a 100%. Em seguida, os tubos deverão ser deixados em banho-maria a 100°C, por 20 min.

Após resfriamento dos tubos em banho de gelo, aproximadamente 10 min, adiciona-se aos mesmos 3,65 mL de etanol a 60% para fixar a cor desenvolvida (violeta), totalizando 5 mL ou, caso tenha ficado muito diluído e com leituras baixas de

absorbâncias, eleva-se para 2mL (adicionando apenas 650 $\mu$ L de etanol 60%). Como “branco” um tubo de ensaio contendo 500 $\mu$ L (sendo 250 $\mu$ L de tampão extração+250 $\mu$ L TCA 10%), 250 $\mu$ L de tampão citrato, 500 $\mu$ L de KCN e 100 $\mu$ L de ninhidrina 5% + volume de etanol 60%. Os teores de N- $\alpha$ -aminossolúveis serão estimados pelas leituras de absorbância a 570 nm. Como padrão utiliza-se a glicina ou um pool de aminoácidos, sendo os resultados expressos em  $\mu$ mol g<sup>-1</sup> MS. Cada repetição (amostra) deverá ser representada por um extrato simples dosado em triplicata.

Para determinação dos teores de proteínas solúveis foi usada uma fração de 0,1 mL do sobrenadante descrito anteriormente, não tratado com ácido tricloroacético a 10%, na qual se adicionou 1 mL do reagente *coomassie brilliant blue* (BRADFORD, 1976). Este reagente foi preparado dissolvendo-se 100 mg de *coomassie brilliant blue* G-250 (Sigma Chemical Company) em 50 mL de álcool etílico a 95%, seguindo-se da adição de 100 mL de ácido fosfórico à 85%. A solução teve seu volume final completado para 1000 mL com água destilada. As proteínas solúveis foram, então, determinadas pelas medidas de absorbância em 595 nm, utilizando-se como branco a mistura de 0,1 mL do tampão de extração (Na-K-fosfato 0,01 M, pH 7,6, contendo NaCl a 0,1 M) e 1 mL do reagente do *Coomassie*. Como padrão foi utilizado albumina sérica bovina (BSA, Sigma Chemical Company) e os resultados foram expressos em mg g<sup>-1</sup> MS. Cada repetição (amostra) foi representada por um extrato simples dosado em triplicata.

## **Enzimas antioxidantes**

### **Superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada de acordo com método descrito por Giannopolitis e Reis (1977) com algumas modificações. O extrato vegetal foi obtido a partir de 100 mg de tecido vegetal fresco, macerado em 2 mL do meio de extração. O meio de extração foi preparado com Tampão Fosfato de Potássio (TFK) 100 mM pH 7,8; EDTA à 0,1 mM; DTT a 1 mM;  $\beta$ -mercaptoenol 10 mM; Triton X 100 à 0,1%; PVPP a 30% (p/p), completando-se o volume com água deionizada.

Após a centrifugação a 15000 g por 15 minuto a 4°C, foi retirada uma alíquota de 30  $\mu$ L, a qual foi colocada no meio de reação. Sendo este preparado com TFK à 52,5 mM pH 7,8; EDTA à 0,0001 mM; Cloreto de Azul de Nitroblutetrazólio (NBT) (Sigma

Chimical Company) à 0,075 mM; Metionina a 13 mM (Sigma Chimical company) e Riboflavina à 0,002 mM, completando-se o volume com água deionizada. Os tubos contendo o meio de reação foram colocados em uma câmara escura com luz fluorescente a 15 watts por 10 minutos, para ocorrência da reação. Após esse período, transferiu-se o volume total para a cubeta de 3,0 mL e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 560 nm. A determinação da atividade da SOD é dada pelo fato da enzima inibir a fotoredução do Cloreto de Azul de Nitroblutetrazólio (NBT) na presença de luz, e a reação é paralisada com o apagar da luz. Deste modo, observou-se a formação da formazana azul utilizando o meio de reação sem adição do extrato vegetal por 10 minutos. Com isso, as unidades SOD foram calculadas pela seguinte fórmula.

$$\text{Unidade SOD} = [(\text{ABS } 560 \text{ formazana Azul} / \text{ABS } 560 \text{ da amostra vegetal})^{-1}]$$

E os valores expressos em unidade de SOD  $\text{mg}^{-1}$  de proteínas

#### **Ascorbato peroxidase (APX)**

A atividade da APX foi determinada segundo metodologia adotada por Nakano e Asada (1981), com algumas modificações. O extrato foi obtido a partir de 20 mg de material foliar fresco, macerado em 2 mL do meio de extração. Este, por sua vez, foi preparado com Tampão Fosfato de Potássio (TFK) 50 mM, pH 7,5; EDTA à 2 mM; Ascorbato de Sódio à 20 mM; Triton X 100 à 0,1%; PVPP à 30% (p/p) completando-se com água deionizada.

Após a centrifugação a 15000 g durante 15 minutos, a 4 °C, foi retirada uma alíquota de 25  $\mu\text{L}$  e colocada no meio de reação. Sendo este preparado com TFK à 50 mM pH 7,5;  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,1 mM; Ascorbato de Sódio a 0,5 mM, completado-se o volume com água deionizada para 1 mL. Os reagentes do meio de reação foram colocados a 25 °C, em banho-maria, exceto o extrato que ficou no gelo à 4 °C.

A reação foi iniciada após a adição do extrato vegetal na cubeta de quartzo, como o meio de reação. As leituras de absorbância foram realizadas a 290 nm, por um minuto, observando decréscimo na concentração do ascorbato. Foi utilizado um coeficiente de extinção do ascorbato de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  à 290 nm para realização dos cálculos e, posteriormente, os valores foram expressos em unidades de APX  $\text{mg}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  proteína.

### **Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada segundo metodologia adotada por Havir et al., (1987), com algumas modificações. O extrato foi obtido a partir de 20 mg de material foliar fresco, macerado em 2 mL do meio de extração. Este por sua vez foi preparado com Tampão Fosfato de Potássio (TFK) 50 mM, pH 7,5; EDTA a 2 mM; Ascorbato de Sódio a 20 mM; Triton X 100 a 0,1%; PVPP a 30% (p/p) completando-se com água deionizada.

Após a centrifugação à 15000 g, por 15 minutos, à 4 °C, foi retirada uma alíquota de 15 µL e colocada no meio de reação, preparado da seguinte forma: TFK à 50 mM pH 7,5; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 12,5 mM completando o volume com água deionizada para 1 mL. A reação iniciou-se após a adição do extrato vegetal na cubeta de quartzo com o meio de reação. As leituras foram realizadas na absorvância de 240 nm, durante um minuto, observando-se o decréscimo da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Foi adotado um coeficiente de extinção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 36 mM<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup> a 240 nm para os cálculos. Os valores foram expressos em unidade de CAT mg<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de proteína.

### **Peroxidação de Lipídeos**

A peroxidação de lipídeos foi determinada pelo teor de substâncias reativas ao Acido 2-Tiobarbitúrico (TBA) e expresso em equivalentes de Aldeído Malônico, MDA (CAKMAK & HORST, 1991). A extração foi realizada com 100 mg de matéria fresca da folha +1, macerada em almofariz, com 2 mL de Acido Tricloroacético a 0,1% (p/v) e o homogenato foi centrifugado a 15000 g, por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado em alíquotas de 500 µL e, em seguida, adicionado a 1,5 mL de TBA a 0,5% (preparado em ácido tricloroacético a 20%). Posteriormente colocados em tubos de vidros rosqueados e, agitados, incubados a 90 °C, por 20 minutos. A reação foi paralisada em banho de gelo e a mistura clarificada por centrifugação a 13.000 g, por 8 minutos, a 4 °C. As leituras de absorvância das amostras foram realizadas a 534 nm (efetiva e específica) e 600 nm (inespecífica descontada). Os resultados foram expressos em nmol de MDA g<sup>-1</sup> de matéria fresca.

### 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os solutos orgânicos analisados apresentaram diferentes respostas aos fatores estudados. Para prolina livre observou-se efeito altamente significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F para todos os fatores estudados, enquanto que, os teores de N- $\alpha$ -aminosolúveis apresentaram efeito altamente significativo ao nível de 1% pelo teste F para genótipos (G) e condição hídrica (CH) e interação entre G e CH ao nível de 5% (Tabela 2.1). Diferentemente, os teores de proteínas solúveis, sofreram efeito significativo ao nível 5% de pelo teste F, para CH, e o efeito altamente significativo para ao nível de 1% para G x CH condição hídrica. Para os carboidratos solúveis houve efeito altamente significativo apenas para genótipos (Tabela 2.1).

Para os teores de N- $\alpha$ -aminosolúvel solúveis foram observou-se respostas diferentes entre os genótipos, porém em média, houve aumento de 25% nesta variável quando as plantas foram submetidas a estresse hídrico severo, em relação ao controle (Tabela 2.2). Os genótipos CL001 e RB931013 aumentaram a concentração deste soluto em suas folhas quando submetidos a estresse hídrico severo, enquanto os demais genótipos não apresentaram alterações significativas. Sendo a variedade RB931011 o que apresentou o maior acúmulo de N- $\alpha$ -aminosolúvel. Esse genótipo parece possuir mecanismos que evitam uma maior degradação dos seus componentes celulares e mantém suas atividades sem aumento de mobilização das suas reservas protéicas (CRUZ, 2006).

**Tabela 2.1** Valores de F obtidos da análise de variância para: carboidratos solúveis, N- $\alpha$ -aminosolúvel, proteínas solúveis e prolina livre em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60%) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio.

Fonte de variação	Solutos Orgânicos			
	N- $\alpha$ -amino solúveis ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	Proteínas Solúveis ( $\text{mg.g}^{-1}$ MF)	Prolina Livre ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	Carboidratos Solúveis ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)
<b>Genótipos (G)</b>	42,99**	27,02**	5,04**	6,32**
<b>Cond. hídrica (CH)</b>	45,14**	7,46*	204,57**	0,26 <sup>ns</sup>
<b>G x CH</b>	3,40*	6,01**	10,68**	2,23 <sup>ns</sup>
<b>CV (%)</b>	6,28	18,00	15,4	5,14

ns, \*\* e \* = não significativo, significativo a 1 e a 5% de probabilidade, respectivamente.

Para a concentração de proteína solúvel houve redução média de 16% para o estresse severo em relação ao controle (Tabela 2.2). Para esse osmorregulador, os genótipos apresentaram comportamentos diferentes, sendo que dois deles apresentaram reduções para o estresse severo, que foram os genótipos RB931011 e CL002, com reduções de 12,13 e 16,12%, respectivamente. Em estudos realizados por Gonçalves, (2008), em quatro variedades de cana-de-açúcar submetidas a déficit hídrico observou estabilidade das proteínas, onde atribui a características inerentes a cada genótipos. Por outro lado, Arias et al. (1996) encontraram redução de 54,1% no acúmulo de proteínas solúveis para o maior nível de déficit hídrico.

**Tabela 2.2** Teores de carboidratos solúveis, N- $\alpha$ -aminosolúvel, proteínas solúveis e prolina livre em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidas aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60%) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio.

Genótipos	Trat.	Solutos Orgânicos			
		N- $\alpha$ -amino solúveis ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	Proteínas Solúveis ( $\text{mg.g}^{-1}$ MF)	Prolina Livre ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	Carboidratos Solúveis ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)
RB931011	C	64,50 Aa	17,26 ABa	0,52 Ab	459,65 Aa
	EM	66,79 Aa	16,21 ABab	0,54 Ab	419,81 ABa
	ES	69,47 Aa	15,22 Bb	1,85 ABa	419,87 ABa
RB931013	C	50,35 BCb	14,50 Ca	0,38 Ab	419,87 ABa
	EM	54,05 Ab	15,68 ABa	0,45 Ab	404,09 Aa
	ES	68,02 ABa	14,68 BCa	1,15 CDa	418,28 ABa
RB72910	C	59,97 Aa	16,51 Ba	0,57 Ab	418,31 ABa
	EM	61,84 Aa	14,87 BCa	0,64 Ab	460,51 Aa
	ES	66,12 ABa	13,86 BCa	1,53 BCa	377,58 Ba
CL001	C	51,19 BCb	18,60 Aa	0,46 Ab	358,49 ABb
	EM	51,87 Bb	17,25 Aa	0,75 Ab	417,04 Ab
	ES	61,40 Ba	17,12 Aa	1,41 Ca	545,95 Aa
CL002	C	60,81 ABa	15,52 BCa	0,36 Ab	547,81 Aa
	EM	68,17 Aa	13,30 Cb	0,47 Ab	452,51 Aa
	ES	68,49 ABa	13,96 Cb	2,11 Aa	450,23 ABa
CL003	C	44,00 Ca	15,53 ABa	0,60 Aa	498,41 Aa
	EM	48,60 Ba	14,91 BCa	0,73 Aa	327,12 Aa
	ES	48,88 Ca	14,00 Ca	0,83 Ca	355,50 Ba
<b>Media Geral</b>		15,39	58,64	21,76	431,07

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, tanto para tratamentos dentro de genótipos (letras minúsculas), como para variedades dentro de tratamento (letras maiúsculas), não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



Esses valores, em média, inferiores aos encontrados por Gonçalves (2008) que trabalhando com cana-de-açúcar sob condições déficit hídrica observou uma degradação protéica de 16,3% na variedade RB72454. Segundo Pimentel (1999), esse fenômeno ocorreu possivelmente devido à degradação das proteínas sob as altas temperaturas, aliada ao estresse hídrico severo. De forma semelhante, Cruz (2006) estudando híbridos de milho submetidos à restrições hídricas observou um aumento no teor de aminoácidos solúveis quando comparando com o controle. Para a concentração de proteína solúvel apresentou com redução média de 16% para o estresse severo em relação ao controle (Tabela 2.2).

Sem restrição hídricas, o CL002 apresentou o maior acúmulo de proteínas solúveis, enquanto a menor concentração deste soluto foi observada na RB931013. Estes resultados corroboram aqueles encontrados por Gonçalves (2008), em estudos com déficit hídrico, em variedades de cana sob condições de estresse, em casa-de-vegetação.

Diferenças entre genótipos para o teor protéico também foram observadas por Arias et al. (1996) em cana-de-açúcar cultivada sob deficiência hídrica. Porém esta variável, não demonstrou importância na caracterização da deficiência das secas das variedades, corroborando com os estudos Almeida & Crócomo (1994), que não recomendam a utilização de tal soluto como ferramenta de seleção para seca, por apresentarem estabilidade entre os tratamentos.

Para a concentração de prolina livre foi observado incremento médio de 71% para o estresse severo, em relação ao controle (Tabela 2.2). Os CL001 e CL003 apresentaram as menores concentrações deste soluto, na condição de estresse severo. Já as maiores concentrações foram observadas nos genótipos CL002 e RB931011, representando incremento de 87,7 e 71,9%, respectivamente, em relação aos respectivos controles (Tabela 2.2). Este aumento nos níveis de prolina livre ocorreu, provavelmente, através do aumento da atividade e/ou concentração da enzima P-5CR e/ou diminuição da degradação mitocondrial desse aminoácido (MAIA et al., 2007).

Incrementos na concentração de prolina livre, também foram observados por Gonçalves (2008) em cana-de-açúcar submetida a condições de estresse hídrico, onde a variedade SP79-1011, considerada tolerante à seca, apresentou os maiores valores. Dentre os solutos orgânicos, a prolina livre talvez seja o primeiro a ter sua síntese e acúmulo mais pronunciados em função do estresse hídrico nas plantas. Nesse sentido, Cruz (2006), encontraram valores de aumento superior a quatro vezes a concentração de

prolina entre os tratamentos com e sem déficit hídrico. De forma semelhante, Arias et al. (1996) também observaram incremento de prolina em cana-de-açúcar em condições de campo, em três épocas de cultivo. Os autores observaram que nos três primeiros meses do experimento houve aumento da concentração de prolina livre, apresentando as maiores concentrações, em seguida houve redução, à medida que as plantas se desenvolviam.

De acordo com Maia et al (2007), as respostas ao estresse hídrico podem depender tanto da idade das plantas quanto das próprias variedades. Aos sete meses de cultivo, milho em condição de campo, tais autores observaram comportamento semelhante entre os genótipos, enquanto que aos nove, houve redução na síntese de prolina com a redução do conteúdo de água do solo. Nesse sentido, Pinho & Ansel (1995), observaram acúmulo pronunciado de prolina em milho e sorgo à medida que o potencial hídrico do solo decrescia, havendo diminuição de tal soluto com a reidratação das plantas. Ao contrário disso, com o decréscimo da disponibilidade hídrica do solo, Cruz (2006) não encontrou reduções significativas nos teores de prolina em milho.

A relação do aumento de prolina e resistência à seca em diferentes culturas encontra opiniões divergentes, pois alguns autores encontram relação direta entre a capacidade de acumular prolina e a tolerância seca, enquanto outros acreditam que este aminoácido pode ser indicativo do estágio de desenvolvimento e de variedades de maior suscetibilidade (PINHO & ANSE, 1995).

Os teores de carboidratos solúveis (Tabela 2.2) apresentaram diferença entre os regimes hídricos, com incremento médio de 23% para o estresse severo em relação ao controle. Sob condições de estresse severo, o CL001 foi o único que apresentou incremento significativo (23,8%) para o acúmulo deste soluto (Tabela 2.2), evidenciando, que o mesmo pode apresentar uma característica de resistência a condições adversas.

Maia et al. (2007), trabalhando com milho submetido à deficiência hídrica encontraram um incremento superior a 30% em relação ao tratamento controle. Esse maior acúmulo de açúcares deve ser causado pela aproximação da fase de maturação das plantas, quando a mesma necessitará de mais reservas (PIMENTEL, 1999) ou até mesmo de manter o nível de água nas folhas e induzir ajustamento osmótico na planta, visando um equilíbrio osmótico celular (MAIA et al.,2007).

Por outro lado, Gonçalves (2008) observou redução significativa de (28%) de carboidrato solúvel em variedades de cana-de-açúcar submetidas a estresse hídrico.

Considerando as variáveis relacionadas ao estresse oxidativo, observo-se efeito significativo, pelo teste F, dos fatores G e CH e sua interação sobre MAD e a atividade das enzimas CAT e APX. Para a atividade as SOD efeito isolado de G e CH (Tabela 2.3). Houve aumento na concentração de MDA (em média de 38,85%) quando as plantas foram submetidas a estresse hídrico, sendo os genótipos CL002, RB931011 e RB931013 os que apresentaram maiores incrementos (38,86%, 37,41% e 37,20%, respectivamente) em comparação ao controle (Figura 2.1 A e B).

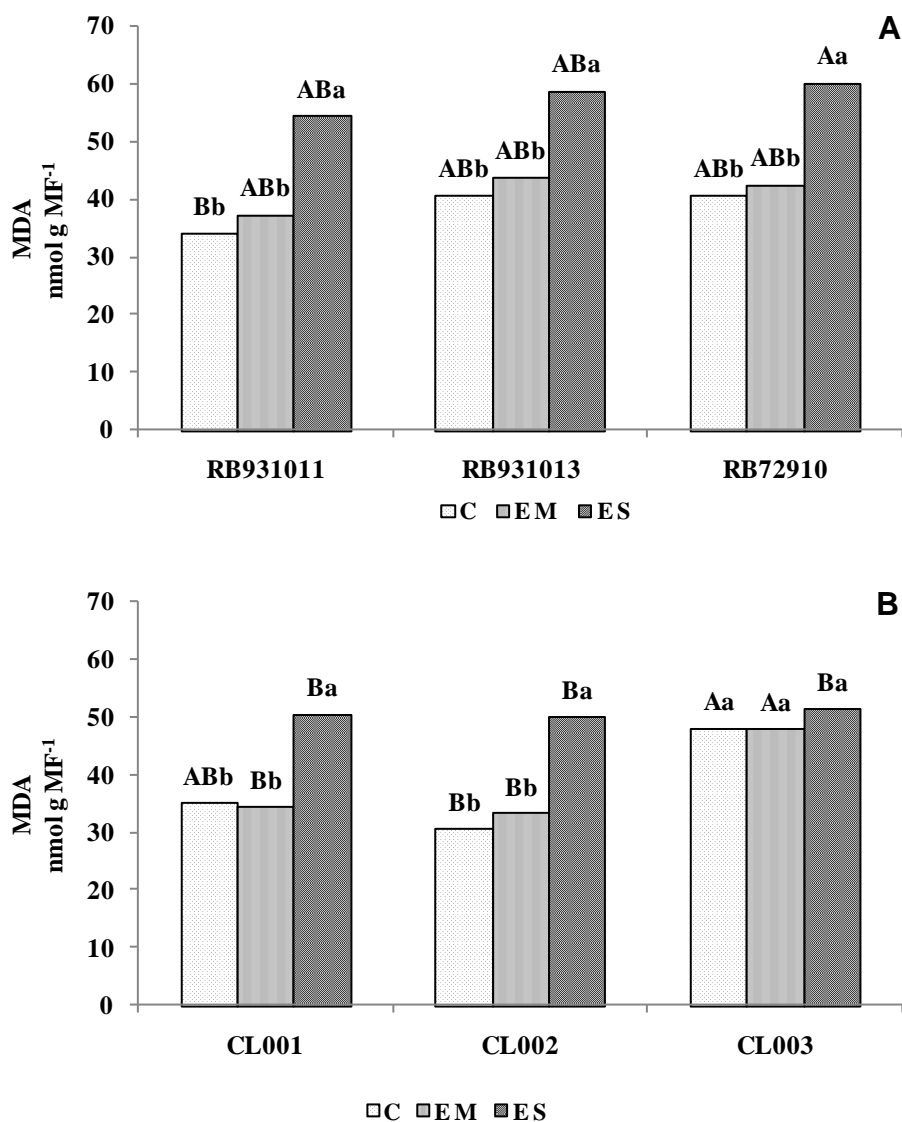
Considerando-se os genótipos na condição de controle, observou-se a maior concentração deste soluto no clone CL003. Dessa forma, estes resultados corroboram os encontrados em cana-de-açúcar por Chagas et al. (2007) e em alfafa por Wang et al. (2009) ambos sob condições de restrições hídricas.

De modo geral tem sido observado que a magnitude dos danos de membrana é diferente entre espécies ou genótipos e em resposta a intensidade e duração do estresse (ASADA et al., 1999). No presente trabalho, as concentrações foliares de MDA evidenciaram claramente que as plantas de cana-de-açúcar sofreram danos oxidativos aos lipídeos de membranas quando submetidos à seca. Segundo Costa (2009), os danos oxidativos em plantas irrigadas, estão ligados a lipídeos de membranas, enquanto de plantas estressadas a degradação de pigmentos fotossintéticos. Entretanto, a produção destas espécies EROs,  $^1\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sob condições de crescimento pode não ser limitante, pois são comumente reduzidas pelas atividades das enzimas que compõem o sistema de defesa oxidativa nas plantas (MITTLER, 2002).

**Tabela 2.3** Valores de F obtidos da análise variância aldeído malônico (MDA), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60%) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio.

Fonte de Variação	Análise Oxidativa			
	MDA	SOD	CAT	APX
<b>Genótipos (G)</b>	61,240**	16,409**	61,240**	248,039**
<b>Cond. Hídrica (CH)</b>	57,083**	42,409**	46,154**	51,618**
<b>G x CH</b>	10,983**	0,976 <sup>ns</sup>	2,952*	13,623**
<b>CV (%)</b>	16,15	6,62	9,90	6,62

ns, e \*\*, \* não significativo e significativo a 1 e a 5% de probabilidade.

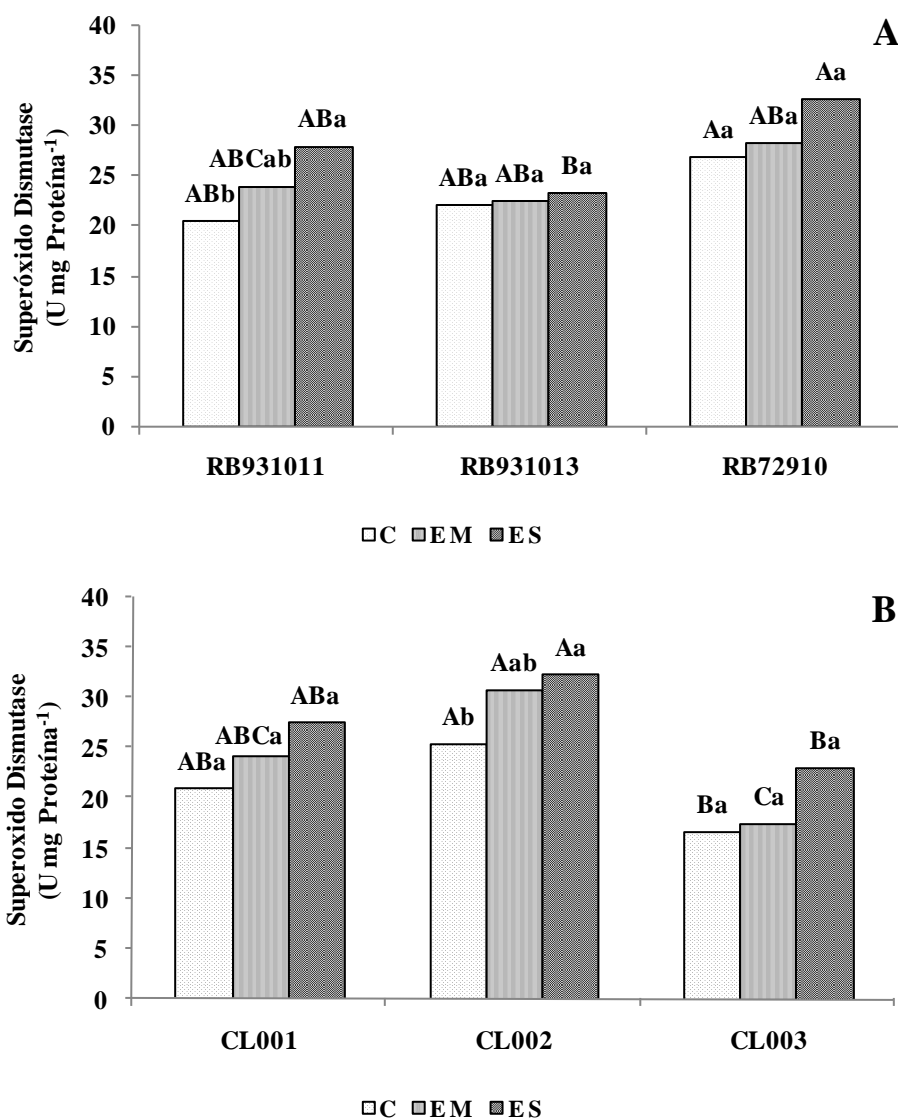


**Figura 2.1** Teor de aldeído malônico (MDA) em três variedades RB931011, RB931013 e RB72910 (A) e em três Clones CL001, CL002 e CL003 (B) de cana-de-açúcar submetidos aos níveis de estresse hídrico em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio C = controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), EM = estresse moderado (40 a 60% AD) e ES = estresse severo (0 a 20% AD). Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, tanto para tratamentos dentro de genótipos (letras minúsculas), como para variedades dentro de tratamento (letras maiúsculas), não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, APX e CAT) é geralmente incrementada para promover melhor eliminação dos EROs e promover uma maior proteção contra danos oxidativos (ASADA, 1999).

Em função dos níveis de estresse aplicados, observou-se um aumento médio na atividade da enzima SOD (26,50%). A atividade desta enzima apresentou

comportamento diversificado entre os genótipos, sendo o RB931011 e o CL002 os que apresentaram maior incremento na atividade da mesma enzima quando submetido a estresse hídrico severo (26,5 e 23,3%, respectivamente) (Figura 2.2 A e B).



**Figura 2.2** Atividade da superóxido dismutase (SOD) em três variedades RB931011, RB931013 e RB72910 (A) e em três Clones CL001, CL002 e CL003 (B) de cana-de-açúcar submetidos aos níveis de estresse hídrico em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio C = controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), EM = estresse moderado (40 a 60% AD) e ES = estresse severo (0 a 20% AD).

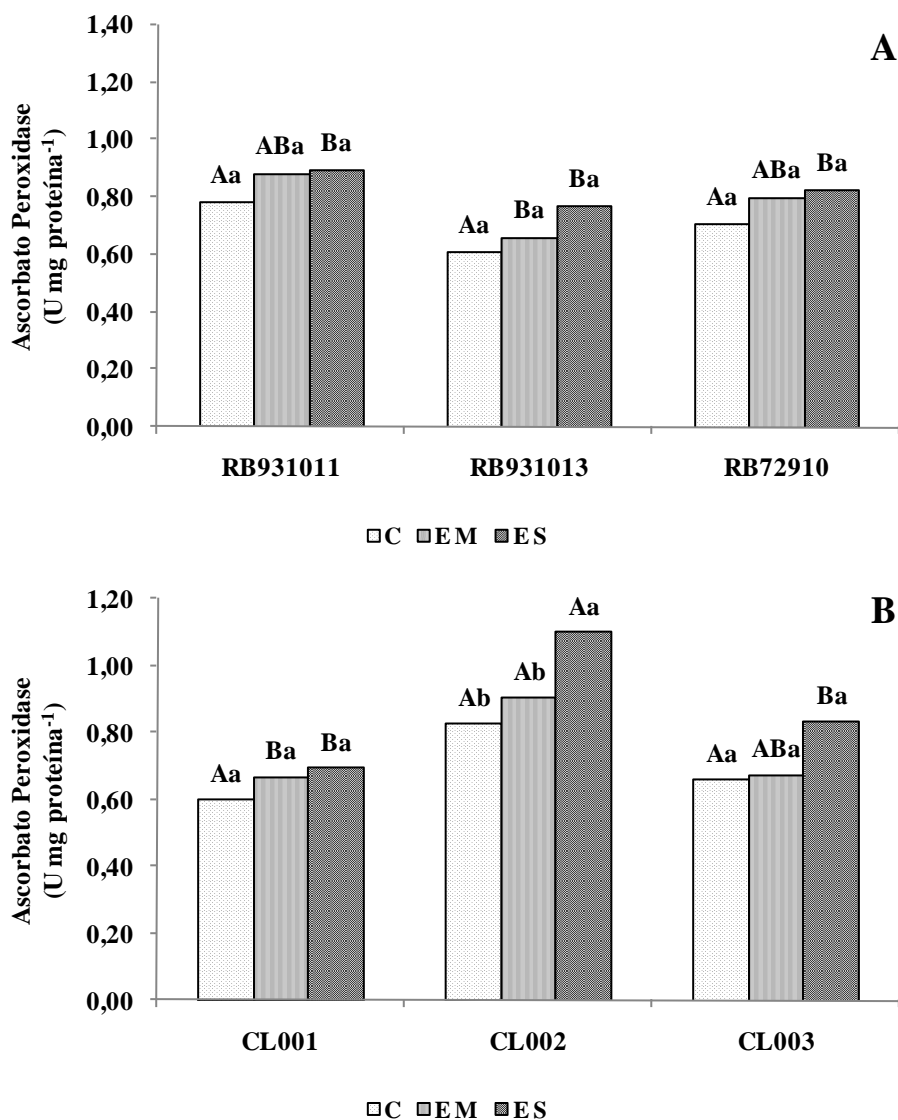
Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, tanto para tratamentos dentro de genótipos (letras minúsculas), como para variedades dentro de tratamento (letras maiúsculas), não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A variedade RB72910 apresentou maior atividade da SOD tanto para o controle (26,97 U SOD mg proteína<sup>-1</sup>), quanto para o estresse moderado (32,67 U SOD mg proteína<sup>-1</sup>) em relação aos demais genótipos. O que indica, possivelmente, que esse genótipo é dotado de um sistema de defesa oxidativo eficiente. Esse efeito tão expressivo na atividade da SOD é atribuído ao fato, de a enzima ser constantemente associada como a primeira linha de proteção a seca (ZHANG et al., 2005; GRATÃO et al., 2005).

Ao analisar o clone CL002 sob condições hídricas severa, observou um incremento de 21,27% em relação ao controle (Figura 2.2 B). Na atividade a enzima SOD esses valores foram superiores aos encontrados por Vasconcelos et al.,(2009) onde os autores trabalhando com milho observaram incremento de 16,79 % ao 42 DAT, e inferiores aos encontrados aos 60 após a aplicação dos tratamentos de restrições hídricas (DAT) encontraram um aumento de 45,37% entres os tratamentos.

Para a atividade da APX, notou-se um pequeno incremento para o estresse severo em relação ao controle (Figura 2.3 A e B). O genótipo CL002 foi o único que apresentou aumento significativo quando as plantas foram submetidas a deficiência hídrica severa, apresentando acréscimo de 30,23% em relação ao controle (Figura 2.3 B). Sem restrição hídrica as variedades RB931011 e RB72910 apresentaram maiores a atividades 0,79 e 0,71 U APX mg proteína<sup>-1</sup>) da enzima enquanto o CL001 foi o que apresentou a menor atividade (0,60 U APX mg proteína<sup>-1</sup>) (Figura 2.3 A).

O acréscimo na atividade da APX, foi semelhante aos relatados em milho por Vasconcelos et al.,(2009), onde os autores encontram um acréscimo de 28,03% aos 60 após a aplicação dos tratamentos de deficiência hídrica. A atividade da APX e da SOD, são fatores importantes para neutralização das EROs geradas pela exposição das plantas às condições adversas. Para evitar danos oxidativos, atividade da APX não deve ser apenas alta, mas suficientemente equilibrada, de forma que possa eliminar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado pela ação da SOD (ASADA et al.,1999).

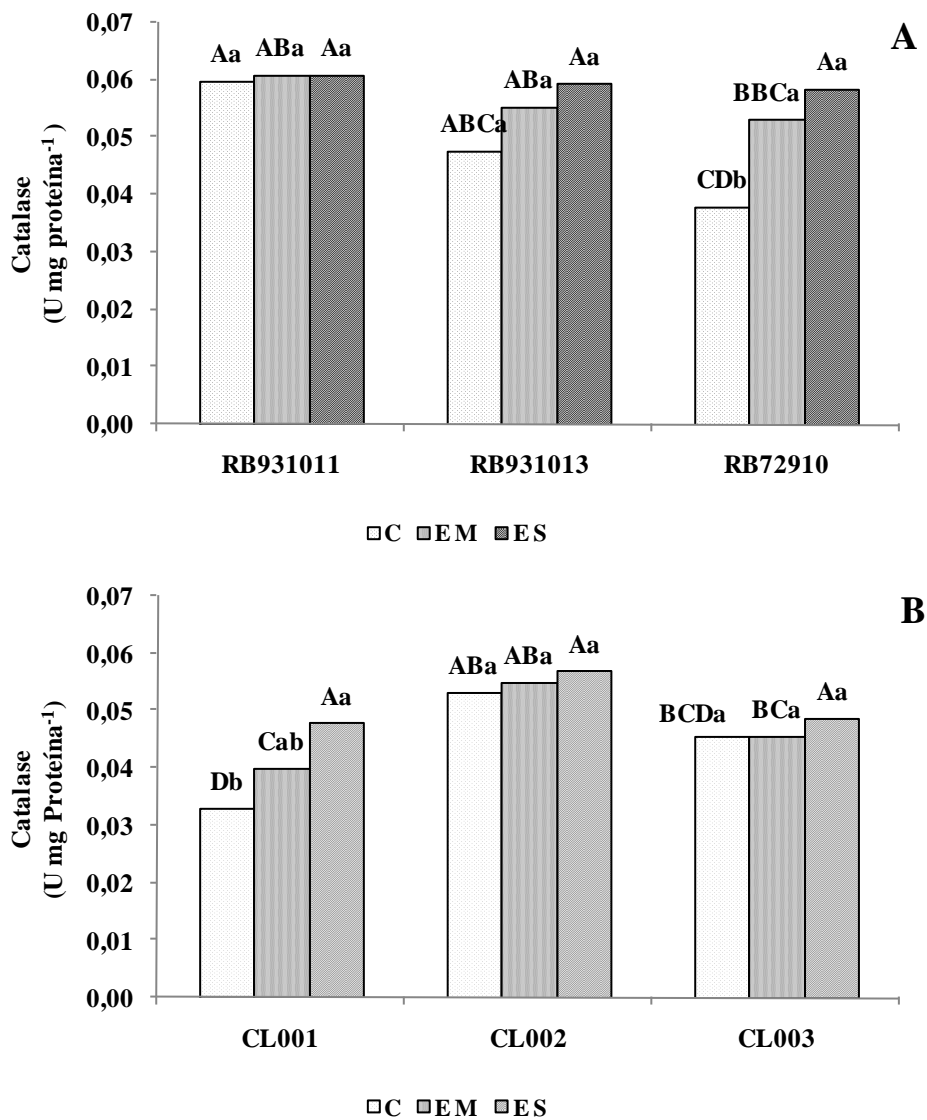


**Figura 2.3** Atividade da Ascorbato peróxidase (APX) em três variedades RB931011, RB931013 e RB72910 (A) e em três Clones CL001, CL002 e CL003 (B) de cana-de-açúcar submetidos aos níveis de estresse hídrico em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio C = controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), EM = estresse moderado (40 a 60% AD) e ES = estresse severo (0 a 20% AD).

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, tanto para tratamentos dentro de genótipos (letras minúsculas), como para variedades dentro de tratamento (letras maiúsculas), não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para a atividade da CAT verificou-se um aumento médio nos genótipos de 24,24% quando as plantas foram submetidas ao estresse severo (Figura 2.4). Notou-se

as maiores atividades da catalase nos tratamentos de maior restrição hídrica nos genótipos RB931011 e RB931013.



**Figura 2.4** Atividade da catalase (CAT) em três variedades RB931011, RB931013 e RB72910 (A) e em três Clones CL001, CL002 e CL003 (B) de cana-de-açúcar submetidos aos níveis de estresse hídrico em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio C = controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), EM = estresse moderado (40 a 60% AD) e ES = estresse severo (0 a 20% AD).

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, tanto para tratamentos dentro de genótipos (letras minúsculas), como para variedades dentro de tratamento (letras maiúsculas), não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.



O CL001 foi o único genótipo que apresentou aumento significativo (31,25%) na atividade da CAT quando as plantas foram submetidas à restrição hídrica severa (Figura 2.4). Com os elevados valores de atividade da SOD (figura 2.2), pela catálise de radicais peróxidos  $O_2^-$  a oxigênio molecular e  $H_2O_2$ , enzimas como a APX e CAT eliminam essas moléculas, embora que a última, por apresentar baixa afinidade pelos radicais de peróxido de hidrogênio, requeira altas concentrações de EROs (VASCONCELOS et al., 2009). Em alfafa a CAT demonstrou-se eficiente na eliminação  $H_2O_2$ , e inibiu a ação das EROs, assim protegendo assim as plantas de danos oxidativos causados por estresse salino (WANG et al., 2009).

A atividade da catalase do presente estudo foi inferior aos relatados por Vasconcelos et al. (2009), com restrição hídrica em milho, os quais encontraram redução de 45,8% em relação ao controle. Já aos 60 DAP os mesmos autores observaram um redução de apenas 6,9% da atividade desta enzima nas folhas das plantas de milho. Em adição, Costa et al. (2005), observaram em folhas de sorgo um aumento médio de 16,5%. Na atividade da catalase foram encontradas diferentes respostas ao estresse hídrico, aumentando, diminuindo ao ate mesmo se mantendo estável (VASCONCELOS et al. 2009).

Contudo, como as atividades das enzimas APX e CAT se mostraram estáveis em alguns dos genótipos de cana-de-açúcar sob déficit hídrico, pode-se inferir que o estresse hídrico desencadeou uma produção razoável de  $O_2^-$ . Assim, a detoxificação das plantas pode ser atribuída à atividade da SOD nos cloroplastos (MITTLER, 2002), ou como também com ação direta  $O_2^-$ , com o ascorbato e glutathiona reduzida (ASADA, 1999).

### 3.4 CONCLUSÕES

As plantas de cana-de-açúcar apresentaram incremento nos teores de N- $\alpha$ -amino solúveis e prolina livres e redução no teor de proteínas solúveis quando submetidas a deficiência hídrica, sendo estes efeitos mais pronunciados no genótipo RB931011, indicando que o mesmo apresenta maior capacidade de ajuste osmótico e proteção molecular, sob condições de estresse hídrico.

Não houve contribuição de carboidrato solúvel nos genótipos de cana-de-açúcar para ajuste osmótico, pois o déficit hídrico promoveu redução na concentração deste osmorregulador.

As plantas submetidas a deficiência hídrica sofrem danos oxidativos às membranas, e componentes lipídicos indicado pelo teor de MDA, sendo mais pronunciado no clone CL002 o qual apresenta respostas a este dano aumentando as atividades das enzimas SOD e APX.

## CAPÍTULO 3

### **Desenvolvimento inicial de seis genótipos de cana-de-açúcar sob condições de deficiência hídrica**

#### **3.1 INTRODUÇÃO**

Na atualidade, o Brasil é o maior produtor mundial, tanto de açúcar quanto de álcool anidro, para fins combustíveis o que o coloca em uma posição privilegiada para atender às necessidades de maiores exportações. O país apresenta duas regiões produtoras, com safras alternadas, podendo manter sua presença no mercado mundial ao longo de todo o ano (CONAB, 2010), pois conta com uma avançada tecnologia de produção de álcool anidro a partir da cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al. 2007). A cana-de-açúcar é uma planta perene da família Poaceae, do gênero *Saccharum*, sendo que os atuais cultivares são híbridos interespecíficos. É uma planta C<sub>4</sub> com alta capacidade fotossintética, especialmente nas condições tropicais, necessitando concentrações altas de CO<sub>2</sub> para seu metabolismo, apresentando maior desenvolvimento em regiões mais quentes.

O estudo de componentes como área foliar, altura, diâmetro de colmos e massa seca total em cultivares de cana-de-açúcar permite correlacioná-la com o seu potencial produtivo. O limbo foliar é responsável pela produção da maior parte dos carboidratos essenciais ao crescimento e desenvolvimento dos vegetais (HERMANN & CÂMARA, 1999). Benincasa (2003) relata que as folhas são os órgãos responsáveis por 90% da massa seca acumulada nas plantas, resultante da atividade fotossintética. Assim, períodos de estresse hídrico causam a diminuição da área foliar, devido à aceleração do processo de senescência das folhas verdes (INMAM-BAMBER, 2004) e estreitamento

do terço médio do limbo foliar, em razão da redução na expansão e divisão celular (TAIZ & ZEIGER, 2009).

A depender da severidade do estresse hídrico, o mesmo altera diversos processos como: captação da radiação, condutância estomática, transpiração, respiração e fotossíntese que em última instância determinam o rendimento da cultura, pois o total de água usado por uma cultura está inteiramente associado com a atividade fotossintética e produção de matéria seca (TOLLENAR & AGUILERA, 1992; QING et al., 2001). Oliveira et al. (2007) acrescentam que em condições de estresses ambientais, os genótipos sensíveis seriam mais prejudicados por reduzirem o número de perfilhos e o diâmetro do colmo influenciando em sua produção total de matéria seca. Oliveira et al. (2004), salienta ainda que pode haver redução no diâmetro devido ao alto custo de demanda energética no caso de possível correlação entre as duas variáveis.

Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o crescimento inicial de seis genótipos de cana-de-açúcar, cultivados em casa-de-vegetação, sob diferentes níveis de deficiência hídrica.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em casa-de-vegetação e no laboratório de Fisiologia Vegetal da Unidade Acadêmica do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, localizado no município de Rio Largo (09°28' S, 35°49' W e 127 m de altitude), no período de 11/11/2008 a 07/04/2009. Foram utilizados seis genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) oriundos do programa de melhoramento genético da cultura (PMGCA/CECA/UFAL). Deste, três são variedades comerciais (RB931011, RB931013 e RB72910) e três são materiais em processo de seleção, identificados nesse trabalho como (CL001, CL002 e CL003). O experimento foi disposto em delineamento inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial, 6 (genótipos) x 3 (níveis de água) e quatro repetições. Através da análise do solo através da curva de retenção de umidade, obteve-se o ponto de murcha permanente (a -1,5 MPa) e a capacidade de campo (a -0,03 MPa), sendo os mesmos de 10,5 e 25% da massa seca do solo, respectivamente. Os níveis foram assim definidos: controle (80-100% da água disponível no solo AD); estresse moderado (40-60% AD); e estresse severo (0-20% AD).

O material vegetal utilizado para plantio consistiu de toletes com uma gema, previamente tratados com solução de hipoclorito de sódio a 0,1% (v/v) e com o

fungicida Derosal 500 na dose de 100 mL/100 kg e semeados em caixas plásticas contendo substrato na proporção 2:2:1, solo:fibra de coco:torta de filtro, respectivamente. No dia 07/11/2008, aos dezenove dias após a semeadura, foram transplantadas duas plântulas para cada vaso plástico contendo 15 kg de solo, previamente destorroado e peneirado. Após o estabelecimento das plantas, aos 80 dias após o transplante, os vasos foram pesados diariamente com o auxílio de uma balança digital, para estabelecimento dos níveis de água de acordo com os tratamentos adotados.

Os dados meteorológicos foram registrados a cada 15 minutos, em uma estação meteorológica automática (Weather Station) modelo WS – GP1 (AT DELTA – T Devices, Cambridge – England) localizada na casa-de-vegetação, ao longo do período de imposição dos tratamentos, os quais foram coletados e posteriormente coletados e transformados, para dados horários e calculados as médias diárias (Apêndices).

As variáveis analisadas foram: área foliar (AF), diâmetro do colmo ( $\Phi_{\text{colmo}}$ ), altura de plantas ( $h_{\text{planta}}$ ), número de perfilhos (Unid), massa seca de folhas, massa seca de colmo mais bainha (C+B), massa seca parte aérea (PA), massa seca das raízes (R), relação raiz parte aérea (R/PA) e material seca total (Ms.Total).

A área foliar (AF) foi determinada semanalmente a partir dos 80 da, imposição dos tratamentos, contando-se o número de folhas verdes (folha totalmente expandida com no mínimo de 20% de área verde, contada a partir da folha +1), medido-se o comprimento e largura do terço médio do limbo na folha +3 da planta principal, com o auxílio de uma trena métrica. Procedeu-se o cálculo utilizando a fórmula proposta por Hermann e Câmara (1999):

$$AF = C \times L \times 0,75 \times (N+2),$$

C= é o comprimento do limbo da foliar,

L= é largura do terço médio da folha +3 e o 0,75 é fator de correção para a área foliar das gramíneas,

N= o número de folhas expandidas, com no mínimo 20% de área verde.

Os resultados de área foliar, após serem aplicadas as equações polinomiais de terceiro grau como descrito por Benincasa (2003) (Tabela 3.3), aplicou-se a derivada primeira para calcular o mínimo e máximo pico de crescimento.

Aos 170 DAT, na coleta final do experimento, foram determinados o diâmetro do colmo e altura de plantas com a ajuda de um paquímetro digital e de uma trena métrica e contou-se o número de perfilhos. Após a coleta, os colmos foram seccionados para melhor secagem, e as raízes peneiradas e lavadas em água corrente.

Posteriormente, o material vegetal, foi levado a estufa de circulação forçada de ar, a 65°C, até a secagem (folhas e raízes necessitam de 72 horas e colmo + bainha de 96 horas) até atingir o peso constante.

Os dados foram submetidos a análise de variância e, dependendo da variável, procedeu-se teste de médias (Tukey a 5% de probabilidade) ou análise de regressão.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve efeito altamente significativo pelo teste F, a nível de 1% de probabilidade, para número de perfilhos e área foliar dos fatores genótipo (G) e condição hídrica (CH) e sua interação. Para diâmetro notou-se efeito altamente significativo, a nível de 1%, de G e (CH) isoladamente pelo teste F. Para altura de plantas notou-se efeito altamente significativo a nível de 1% pelo teste F de (G) e (CH) e da interação G x CH a nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Tabela 3.1.

Em geral, houve redução do perfilhamento de acordo com a intensidade do estresse hídrico. Verificou-se respostas diferenciadas para os genótipos, sobretudo para o CL001 que, em condições de estresse severo apresentou o menor número de perfilhos quando comparado aos demais.

As variedades RB931011 e RB931013 apresentaram número de perfilhos semelhantes na condição de controle.

**Tabela 3.1** Valores de F obtidos da análise variância para altura de planta ( $h_{planta}$ ), diâmetro do colmo ( $\Phi_{colmo}$ ), Número de perfilhos (Unid) e área foliar (AF) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivadas em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio.

Fonte de Variação	Análise de Crescimento			
	Perfilhos(unid)	$\Phi_{colmo}$ (cm)	$h_{colmo}$ (cm)	AF(cm)
<b>Genótipos (G)</b>	61,240**	16,409**	61,240**	248,039**
<b>Cond. Hídrica (CH)</b>	57,083**	42,409**	46,154**	51,618**
<b>G x CH</b>	10,983**	0,976 <sup>ns</sup>	2,952*	13,623**
<b>CV (%)</b>	16,15	6,62	9,90	6,62

ns, \*\* e \* não significativo, significativo a 1 e 5% de probabilidade, pelo teste F.

Na condição de controle, o genótipo CL001 apresentou o maior número de perfilhos enquanto que o genótipo CL003 o menor número. A variedade RB72910 apresentou uma alta capacidade de perfilhamento, sem redução significativa devido a severidade do estresse, indicando apresentar uma tolerância à restrição hídrica (Tabela 3.2). Esse comportamento corrobora os encontrado por Oliveira et al. (2004), em variedades de cana-de-açúcar, sob níveis de irrigação em condições de campo.

Porém, Gonçalves (2008), trabalhando com níveis de estresse hídrico em casa-de-vegetação verificou respostas diferentes em quatro variedades de cana-de-açúcar, em que apresentaram o menor número de perfilhos de acordo com a intensidade do estresse. Da mesma forma, Oliveira et al. (2004), trabalhando em condições de campo com a variedade RB72454 aos 135 após o plantio encontraram valores de perfilhamento superiores.

**Tabela 3.2** Altura de planta ( $h_{\text{planta}}$ ), diâmetro do colmo ( $\Phi_{\text{colmo}}$ ), número de perfilhos (Unid) e área foliar (AF) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivadas em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio.

Genótipos	Trat.	Perfilhos (Unid)	$\Phi_{\text{colmo}}$ (cm)	$h_{\text{colmo}}$ (cm)	AF (cm <sup>2</sup> )
		Variedades	x Estresse	hidrico	
RB931011	C	2,75 BCa	1,79 Aa	104,25ABa	3007,53 ABa
	E M	2,25 Cab	1,74 ABab	83,45 Bb	2817,49 Aa
	ES	2,00Bb	1,60 Ab	79,750Ab	2733,53 Aa
RB931013	C	3,00BCa	1,85 Aa	71,48 Da	2590,05 Ba
	E M	2,75Ba	1,81 Aab	69,63 Ba	2474,03 Aa
	ES	1,00Cb	1,67 Ab	48,00 Bb	2392,87 Aa
RB72910	C	3,75 Ba	1,27 Ba	82,83 CDa	3147,60 ABa
	E M	3,75Aa	1,24 Ca	75,08 Ba	2659,98 Aa
	ES	3,25Aa	1,23 Ba	60,33 Bb	2626,80 Aa
CL001	C	4,75Aa	1,69 Aa	75,75 Da	2697,85 Ba
	E M	4,25 Aa	1,56 Ba	57,25 Cb	2431,72 Aa
	ES	2,65 Bb	1,54Aa	54,80 Bb	2241,85 Aa
CL002	C	2,75BCa	1,73Aa	91,13 Ca	2924,80 ABa
	E M	1,00 Db	1,69ABab	81,20 Ba	2763,74 Aab
	ES	1,00 Cb	1,55Ab	61,60 Bb	2339,63 Ab
CL003	C	2,25Ca	1,67 Aa	112,83 Aa	3397,66 Aa
	E M	1,75 Dab	1,64 ABa	108,68 Aa	3042,12 Aab
	ES	1,25 BCb	1,53 Aa	81,33 Ab	2578,98 Ab
<b>Media Geral</b>		2,53	1,59	77,75	2322,15

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, tanto para tratamentos dentro de genótipos (letras minúsculas), como para variedades dentro de tratamento (letras maiúsculas), não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Para diâmetro de colmos, as variedades RB931011 e RB9391013 foram as que apresentaram os maiores valores no tratamento controle, sendo a primeira, aquela que apresentou a maior redução no diâmetro do colmo (10,5%) quando submetido ao estresse severo, comportando-se como o mais sensível quando comparado aos outros, para essa variável. Outros genótipos como a RB72910 e os clones CL001, CL003 não apresentaram reduções significativas no diâmetro do colmo com a severidade dos níveis de deficiência hídrica (Tabela 3.2).

Resultados semelhantes foram observados por Gonçalves (2008), o qual testou níveis de déficit hídrico em quatro variedades de cana-de-açúcar, em casa-de-vegetação, observando que as variedades SP79-1011 e RB98710 não apresentaram reduções significativas no diâmetro do colmo. Nesse sentido, Oliveira et al. (2004) relataram que, ao analisar o ciclo completo de plantas de cana-de-açúcar, nem sempre a variedade que apresenta maior capacidade de perfilhamento, será mais produtiva no final da safra.

Quando se avaliou altura de colmos, as plantas apresentaram reduções médias de 25%, com o aumento da deficiência hídrica. Os genótipos RB72910, CL001, CL003 se comportaram de modo semelhante com reduções de 27,2, 27,6 e 27,9 %, respectivamente. A variedade RB931011 sofreu a menor redução (23,5%) (Tabela 3.2). Com a severidade da deficiência hídrica, as maiores reduções (32,9 e 32,4%) foram para os RB931013 e CL002, respectivamente, de modo que, o primeiro apresentou a menor altura para o estresse severo, aos 170 DAT.

Decréscimos na altura também foram observados por Árias et. al., (1996), em cana-de-açúcar, onde os mesmos encontraram reduções de 30% em plantas em níveis de déficit hídrico de 80 à 20% da capacidade de campo, tendo o primeiro como controle e o segundo como estresse severo. Assim, os genótipos RB72910 que não apresentaram reduções significativas para o número de perfilhos, poderiam investir maior quantidade de suas energias metabólicas para crescimento de colmos e produção total (Olivera et.al., 2004) (Tabela 3.2).

Sob condições de déficit hídrico houve na área foliar das plantas de aproximadamente, com redução média próximos a 25% para a deficiência hídrica mais severa em comparação ao controle (Tabela 3.2). Mesmo não apresentando diferença estatística entre os níveis de água, as variedades RB931013 e RB72910 foram as que apresentaram os menores valores médios de área foliar. Durante o estudo, observou-se também, que as plantas da variedade RB72910 apresentaram folhas mais numerosas,



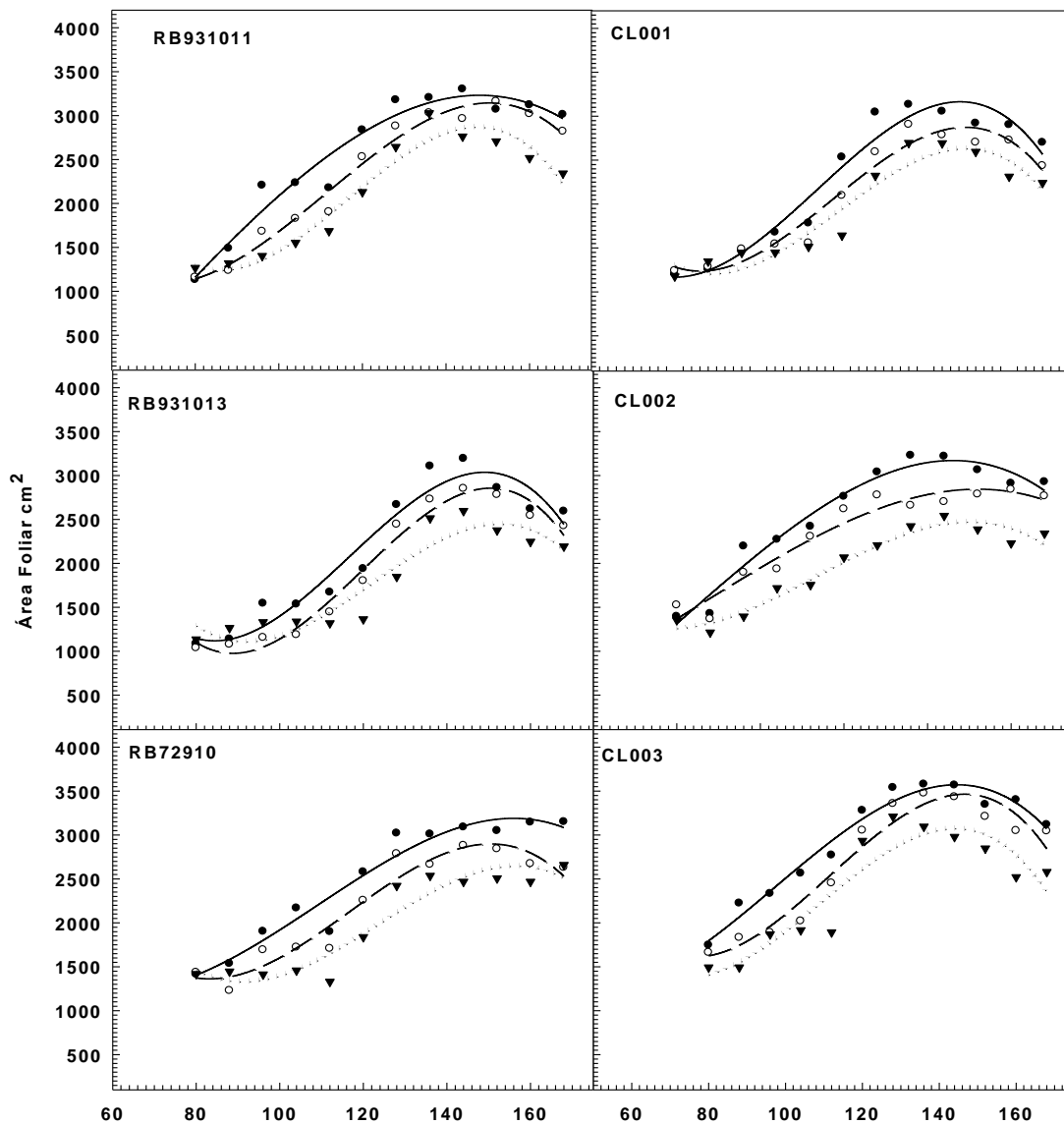
porém com limbo mais estreito e curto, em comparação aos demais genótipos (dados não mostrados).

Estatisticamente os clones CL002 e CL003 foram os que apresentaram as maiores reduções no valor médio de área foliar aos 170 DAT (20,1 e 24,1%), sob condições de deficiência hídrica severa. Nessas condições CL002 foi o que apresentou o menor número de perfilhos, o que possivelmente resultou em maior investimento de recurso, em altura de colmos e área foliar (OLIVEIRA et al., 2004).

De acordo com o estudo do desenvolvimento da área foliar no período de 80 a 170 DAT, (Figura 3.1) em função dos tratamentos impostos, calculados a partir da derivada primeira das equações polinomiais cúbicas, apresentadas na Tabela 3.3, os genótipos apresentaram comportamentos diferenciados. O tratamento controle e estresse moderado apresentaram as maiores médias para área foliar. O clone CL003 foi aquele que apresentou os maiores valores de área foliar no tratamento controle aos 144 DAT, e para o estresse moderado aos 156 dias.

Da mesma forma observou-se a menor área foliar para o clone CL001 aos 147 DAT tanto para o tratamento controle quanto para o estresse moderado. Para o estresse severo a variedade RB931011 e o clone CL002 apresentaram a maior e menor área foliar aos 148 dias.

Esses valores corroboram aqueles obtidos por Oliveira et al. (2004), trabalhando com níveis de irrigação, em três variedades de cana-de-açúcar, sob condições de campo, quando comparado ao controle, que observaram ainda, que nesta época essa cultura é capaz de translocar seus fotossimilatos para produção de novos perfilhos, reduzindo assim, a capacidade de crescimento do seu limbo foliar. Já Gonçalves, (2008) estudando déficit hídrico em quatro variedades de cana-de-açúcar encontrou valores superiores para o tratamento controle.



**Figura 3.1** Estudos de desenvolvimento da área foliar, em cm<sup>2</sup>, de seis genótipos de cana-de-açúcar de 80 a 170 DAT submetidos aos tratamentos: — controle (80 a 100% AD), estresse moderado, - - - (40 a 60% AD) e estresse severo, ····· (0 a 20% AD) cultivados em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio.

Todos os genótipos apresentaram uma alta taxa de senescência foliar devido provavelmente, ao aumento da taxa de etileno nas folhas, em respostas a deficiência hídrica (TAIZ & ZEIGER, 2009). Além das limitações causadas as planta pelo espaço onde foram cultivadas, durante o período de estudo, o que agravou o efeito do estresse hídrico, pois segundo INMAN-BAMBER (2004) as temperaturas elevadas em períodos de estresse hídrico causam a diminuição da área foliar, pois aceleram o processo de senescência das folhas verdes.

**Tabela 3.3** Equações de regressão e coeficientes de determinação para área foliar (AF) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivadas em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio.

Genótipos	Trat.	Equações cúbicas	R <sup>2</sup>	N. Sig (%)
<b>RB931011</b>	<b>C</b>	AF= -0,0024x <sup>3</sup> + 0,4679x <sup>2</sup> + 21,537x - 2311,4	R <sup>2</sup> =0,949	P<0,0001
	<b>EM</b>	AF= -0,0086x <sup>3</sup> + 2,8573x <sup>2</sup> - 278,49x + 9516,2	R <sup>2</sup> =0,977	P<0,0001
	<b>Es</b>	AF= -0,0138x <sup>3</sup> + 4,8452x <sup>2</sup> - 525,44x + 19408	R <sup>2</sup> =0,949	P<0,0001
<b>RB931013</b>	<b>C</b>	AF= -0,0192x <sup>3</sup> + 6,7141x <sup>2</sup> - 731,83x + 26621	R <sup>2</sup> =0,946	P<0,0001
	<b>EM</b>	AF= -0,0196x <sup>3</sup> + 7,0052x <sup>2</sup> - 783,46x + 29042	R <sup>2</sup> =0,981	p< 0,0001
	<b>Es</b>	AF= -0,0135x <sup>3</sup> + 4,923x <sup>2</sup> - 563,88x + 21826	R <sup>2</sup> = 0,875	p< 0,0005
<b>RB72910</b>	<b>C</b>	AF= -0,0052x <sup>3</sup> + 1,7038x <sup>2</sup> - 154,55x + 5526,5	R <sup>2</sup> = 0,944	p< 0,0001
	<b>EM</b>	AF= -0,0101x <sup>3</sup> + 3,5366x <sup>2</sup> - 378,9x + 14218	R <sup>2</sup> = 0,949	p< 0,0001
	<b>Es</b>	AF= -0,0104x <sup>3</sup> + 3,8385x <sup>2</sup> - 440,49x + 17463	R <sup>2</sup> = 0,882	p< 0,0002
<b>CL001</b>	<b>C</b>	AF= -0,0126x <sup>3</sup> + 4,2989x <sup>2</sup> - 446,76x + 15824	R <sup>2</sup> = 0,954	p< 0,0001
	<b>EM</b>	AF= -0,0128x <sup>3</sup> + 4,5197x <sup>2</sup> - 493,93x + 18419	R <sup>2</sup> = 0,954	p< 0,0001
	<b>Es</b>	AF= -0,0127x <sup>3</sup> + 4,5431x <sup>2</sup> - 506x + 19222	R <sup>2</sup> = 0,915	p< 0,0001
<b>CL002</b>	<b>C</b>	AF= -0,0033x <sup>3</sup> + 0,801x <sup>2</sup> - 23,159x - 273,47	R <sup>2</sup> = 0,961	p< 0,0001
	<b>EM</b>	AF= -0,0023x <sup>3</sup> + 0,6001x <sup>2</sup> - 22,817x + 532,22	R <sup>2</sup> = 0,942	p< 0,0001
	<b>Es</b>	AF= -0,0066x <sup>3</sup> +2,2000x <sup>2</sup> -226,33x+8543,4	R <sup>2</sup> = 0,955	p< 0,0001
<b>CL003</b>	<b>C</b>	AF= -0,0057x <sup>3</sup> + 1,6564x <sup>2</sup> - 123,51x + 3976	R <sup>2</sup> = 0,959	p< 0,0001
	<b>EM</b>	AF= -0,0117x <sup>3</sup> + 3,9397x <sup>2</sup> - 399,7x + 14396	R <sup>2</sup> = 0,932	p< 0,0001
	<b>Es</b>	AF= -0,0099x <sup>3</sup> + 3,2405x <sup>2</sup> - 316,99x + 11107	R <sup>2</sup> = 0,859	p< 0,0009

Considerando-se a produção de massa seca, foram observadas diferentes respostas ao déficit hídrico entre os genótipos. Para massa seca foliar houve efeito altamente significativo de genótipos e condição hídrica a nível de 1% de probabilidade, pelo teste F, e interação significativa entre os fatores a nível de 5%. Para as variáveis colmo+bainha (C+B), massa seca da parte aérea (PA), massa seca das raízes (MsR) e MStotal houve efeito altamente significativo de todos os fatores estudados e de sua interação a nível de 1% de probabilidade, pelo teste F. A relação entre a massa seca da raiz e da parte aérea (R/PA) apresentou efeito altamente significativo de genótipos e da interação x genótipos condição hídrica a nível de 1% de probabilidade pelo teste F e condição hídrica, a nível de 5% de probabilidade, pelo teste F (Tabela 3.4).

As plantas submetidas a níveis reduzidos de água disponível (AD), apresentaram diferentes patamares de redução na produção de matéria seca, diferindo tanto do controle quanto entre os genótipos (Tabela 3.5).

Assim, os genótipos CL002 e CL003 apresentaram a maior massa seca foliar no tratamento controle, entretanto o primeiro apresentou a maior redução nesse variável quando submetido deficiência hídrica severa (32,02%). Além de apresentar a menor massa seca foliar para o estresse severo, as variedades RB931013 e RB72910 apresentaram reduções na massa foliar de mesma ordem para o estresse moderado (25,03 e 28,59%, respectivamente).

**Tabela 3.4** Valores de F obtidos da análise de variância para produção de matéria em folhas, colmos + bainhas (C+B), e parte aérea (PA), e massa seca de raízes (MsR), relação raiz/parte aérea (R/PA) e matéria seca total (MS.Total) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivadas em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio.

Fonte de Variação	Massa seca (g)					
	Folha	C + B	PA	MsR	R/PA	Ms.Total
<b>Genótipos (G)</b>	153,58**	346,05**	354,58**	198,59**	7,54**	433,07**
<b>Cond. hídrica (CH)</b>	30,46**	144,87**	97,48**	73,58**	2,35*	128,79**
<b>G x CH</b>	8,88*	14,23**	11,44**	14,15**	2,94**	16,73**
<b>CV (%)</b>	5,50	7,35	5,54	6,27	6,39	4,79

ns, \*\* e \* não significativo, significativo a 1 e 5% de probabilidade, pelo teste F.

Por outro lado, os genótipos RB931911 e CL001 apresentaram comportamentos semelhantes para o controle, em contrapartida, o segundo apresentou uma redução de 24,29% para o estresse severo em relação ao controle (Tabela 3.5). Superiores a esses, Gonçalves (2008) estudando cana-de-açúcar sob condições de restrições hídricas moderadas encontrou redução na massa seca foliar de 39,5% para a variedade RB72454.

Reduções na matéria seca de folhas também foram observadas por Galbiatti et al. (2004), que encontraram decréscimo de 28,5% entre o tratamento controle e o tratamento que não recebeu irrigação, durante a fase de crescimento vegetativo, em milho.

Quanto à matéria seca do C+B, notou-se diferença significativa, entre os níveis de água pelo teste Tukey, com reduções superiores a 40,0%. Observou-se, que quando bem suprida (tratamento controle) a variedade RB931011 apresentou o rendimento mais elevado em comparação às demais (Tabela 3.5). Nas variedades essa variável é de fundamental importância para o setor da agro-indústria açucareira. Analisando as respostas na, nota-se que os genótipos RB931011, RB931013 e CL003 apresentaram comportamentos semelhantes quando comparado com o tratamento controle, apresentando respectivas reduções de 40,20, 40,25 e 48,20 %, nos C+B sendo que, o primeiro apresentou a menor redução para o estresse moderado (12,34%).

De forma diferente o RB72910 não apresentou diferença significativa para o estresse moderado com relação ao controle. Contudo, os CL002 e CL001 se comportaram de maneira semelhantes apresentando a maior (53,03%) e a menor (32,7%) redução no estresse severo quando comparado ao controle, respectivamente. Resultados diferentes, em condições de campo, foram obtidos por Silva et al. (2007), os quais encontraram redução na matéria seca de colmos + bainhas de até 20,9% quando comparado ao controle, em oito variedades de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica.

Da mesma forma, Robertson et al. (1999), estudando a fisiologia e produtividade de cana-de-açúcar submetida a deficiência hídrica, em três experimentos no início e no meio do ciclo da cultura em condições de campo, encontraram redução média na matéria seca de colmos superior a 30%.

**Tabela 3.5** Produção de massa seca em folhas, colmos + bainhas (C+B), e parte aérea (PA), e massa seca de raízes (MsR), relação raiz/parte aérea (R/PA) e matéria seca total (Ms.total) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivadas em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio.

Genótipos	Trat.	Massa seca (g)					
		Folha (g)	C + B	PA	MsR	R/PA	Ms.Total
RB931011	Cont	28,89 ABa	61,40 Aa	90,29 Aa	31,78 Aa	0,35 Bb	122,07 Aa
	Est.M	25,97 Cb	41,89 Ab	67,86 Ab	28,89 ABb	0,40 Aa	95,75 Ab
	Est.S	23,42 Bc	36,72 Ac	60,14 Ac	25,11 Ab	0,42 ABa	85,25 Ac
RB931013	Cont	26,76 Ba	31,58 Ca	58,34 Ca	21,58 Ba	0,37 ABa	79,92 Ca
	Est.M	25,25 Ca	26,42 Cb	51,67 Bb	19,69 Cb	0,38 Aa	71,36 Ba
	Est.S	20,06 Cb	18,87 CDc	38,92 BCc	14,64 Cc	0,38 Ba	53,56 Cb
RB72910	Cont	30,92 Aa	32,26 Ca	63,18 Ca	23,67 Ba	0,37 ABa	86,85 Ba
	Est.M	30,74 Aa	32,01 Ba	62,75 Aa	23,13 ABb	0,37 Aa	85,88 Aa
	Est.S	21,95 BCc	16,69 Db	37,22 Cb	16,59 BCc	0,38 Aa	53,81 Cb
CL001	Cont	27,54 Ba	30,40 Ca	57,91 Ca	21,88 Ba	0,38 ABb	79,79 Ca
	Est.M	27,30 BCa	27,08 Ca	54,39 Ba	21,75 Ca	0,40 Aab	76,14 Ba
	Est.S	20,82 BCb	21,67 BCb	42,50 BCb	18,40 Bb	0,43 Aa	60,90 BCb
CL002	Cont	31,26 Aa	51,06 Ba	82,33 Ba	28,55 Aa	0,35 Aa	110,88 Ba
	Est.M	29,18 ABa	37,70 Ab	66,88 Ab	24,05 Bb	0,36 Aa	90,93 Ab
	Est.S	21,25 BCb	23,99 BCc	45,47 Bc	17,69 BCc	0,39 Ba	63,16 Bc
CL003	Cont	31,72 Aa	49,23 Ba	80,94 Ba	31,32 Aa	0,39 ABa	112,26 Ba
	Est.M	30,62 Aa	39,89 Ab	70,52 Ab	29,20 Aa	0,41 Aa	99,72 Ab
	Est.S	29,33 Aa	25,50 Bc	54,84 Ac	23,04 Ab	0,42 ABa	77,88 Ac
<b>Media Geral</b>		26,94	33,57	60,34	25,50	0,42	86,04

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, tanto para tratamentos dentro de genótipos (letras minúsculas), como para variedades dentro de tratamento (letras maiúsculas), não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Ao analisar a massa seca da parte aérea (PA=Folhas+C+B), observou-se ocorrência de reduções significativas superiores a 40%, nas plantas submetidas ao estresse severo quando comparado ao controle, sendo essa redução inferior a encontrada por Gonçalves, (2008) em cana (52,6%), e superior a de Inman-Bamber (2004) (18,1%) e Robertson et al. (1999) (25%) que encontraram reduções na biomassa final de cana-de-açúcar submetida a estresse hídrico. Com exceção de Gonçalves (2008), os demais autores trabalharam em condições de campo o que explica as menores reduções.

A variedade RB931011 foi a que apresentou a maior produção de massa seca da parte aérea tanto para o controle, quanto para o estresse severo, indicando que essa variedade mesmo sob deficiência hídrica severa se destaca dos demais.

O CL002 apresentou a maior redução da massa seca da parte aérea para o estresse severo quando comparado ao controle (44,70%), demonstrando evidências de uma maior suscetibilidade desse genótipo à seca. Já os genótipos RB72910 e CL003 apresentaram comportamento semelhante com reduções de 30,90 e 32,25 %, respectivamente e o clone CL001 foi aquele que a menor redução (26,61%) entre os tratamentos, com a diminuição da disponibilidade hídrica.

Nable et al., (1999) afirmaram que os efeitos do estresse hídrico em curto período de tempo, podem ser reversíveis ou não, interferindo, talvez, em perdas de rendimento. Em contrapartida, Santos & Carlesso (1998) e Robertson et al. (1999), relatam que a ocorrência de déficit hídrico quando a cultura da cana-de-açúcar está estabilizada pode proporcionar impactos deletérios no rendimento final, pois afeta o desenvolvimento das estruturas vegetativas das plantas.

Os genótipos RB931013 e CL002 foram os que apresentaram maior sensibilidade ao déficit hídrico, com as reduções de 32,20 e 38,00% no estresse severo em relação ao controle para massa seca da parte aérea.

Quando submetidos ao tratamento controle, os RB931011 e o CL003 comportaram-se de modo semelhante quanto ao acúmulo de massa seca de raízes, esses genótipos apresentaram o mesmo comportamento na produção da massa seca da PA. Os genótipos RB72910 e CL001 apresentaram valores de massa seca de raiz semelhantes para o tratamento controle, com reduções de 29,91 e 15,90%, respectivamente, para o estresse severo.

Silva et al. (2005) em estudos sobre sistema radicular de cana-de-açúcar sob condições de campo, afirmaram que algumas variedades apresentam uma quantidade significativa de raízes em camadas mais profundas do solo, seja na linha de plantio ou em distâncias de 30 cm da mesma. Esses autores afirmaram que o aprofundamento das raízes, como mecanismo de tolerância a seca, é de grande importância para os solos da região Nordeste, fazendo com que estas variedades, possivelmente, se diferenciem de outras plantadas na região. Assim, a limitação da exploração do solo devido ao cultivo em vasos plásticos, como realizado neste trabalho, pode ter interferido nestes genótipos, os quais não conseguiram expressar todo o seu potencial, tanto na parte aérea quanto no sistema radicular, sobretudo em condições de estresse hídrico severo.

Para a relação raiz / parte aérea observou-se aumento médio de 20% no estresse severo, quando comparado ao controle. Os genótipos RB931011 e CL001 apresentaram comportamento semelhante para esta variável, foram os únicos que apresentaram

diferenças significativas, com incremento de 20,0 e 13,16% respectivamente (Tabela 3.5). Essas reduções foram inferiores as 24,1% encontradas por GONÇALVES (2008) estudando variedades de cana-de-açúcar sob restrição hídrica severa. Em virtude dos dados de massa seca do sistema radicular na tabela 3.5, mostras que tais genótipos pode esta vinculado a menor inibição do sistema radicular, pois foi verificado diferença significativa na massa seca das raízes entre os tratamentos, em função da disponibilidade hídrica do solo.

Para massa seca total observou-se efeito significativo, com reduções superiores a 40% para o estresse severo em relação ao controle (Tabela 3.5). Os genótipos CL002 e RB72910 foram aqueles que apresentaram as maiores reduções na massa seca total, com reduções de 43,03 e 38,04% respectivamente, sendo que o primeiro apresentou a maior redução para o estresse moderado que, possivelmente, foi influenciada pela redução da massa seca da parte aérea e de raiz, quando comparado com o controle. Notou-se também, que os genótipos RB931011, RB931013 e o CL003 apresentaram comportamentos semelhantes com reduções de 28,84, 32,98 e 30,62% para o estresse severo quando comparado ao controle, com o primeiro apresentando a maior massa seca total, influenciada pela PA, tanto para o estresse severo quanto para o controle quando comparado aos demais.

O clone CL001 foi aquele que apresentou a menor redução de (23,67%) na massa seca total com o aumento restrição hídrica quando comparado ao controle, essa redução pode ter sido influenciada pelas reduções mais acentuadas nas variáveis de massa seca foliar, da parte aérea e raiz.



### 3.4 CONCLUSÕES

Á exceção da variedade RB 72910, as plantas de cana-de-açúcar, sob deficiência hídrica severa, apresentam reduções no número de perfilhos, diâmetro de colmos, altura de plantas e área foliar, sendo estas mais pronunciadas no clone CL002, o qual mostra-se mais suscetível ao estresse imposto.

A variedade RB72910, sob deficiência hídrica, apresenta menor redução na massa seca da parte aérea mostrando-se mais tolerante à seca.

Dentre os clones, o CL001, quando submetido à deficiência hídrica severa, apresenta-se mais tolerante à seca por apresentar menor taxa de redução de massa seca de folhas, colmo + bainha, massa seca da parte aérea e massa seca total.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, C., C.M. STIRLING, and S.P. LONG. Genotypic variation within Zea mays for susceptibility to and rate of recovery from chillinduced photoinhibition of photosynthesis. **Physiologia Plantarum**, 106:429–436. 1999.

ALMEIDA, M. DE; CRÓCOMO, O. J. Caracterização bioquímica de cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*): isoenzimas, proteína solúvel e valor brix. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 3, p. 422-429, 1994.

ARGENTA, G. et al. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 2, p. 158-167, 2001.

ARIAS, M. I. B.; DELGADO, E. O.; CARMENATE, R. V. **Cambios fisiológicos de la caña de azúcar ante el déficit hídrico**. 1. ed. México: Universidad Autónoma Chapingo, 1996. 135 p.

ARTLIP, T.S.; WISNIEWSKI, M.E. Induction of proteins in response to biotic and abiotic stresses. In: PESSARAKLI, M. (Ed.) **Handbook of plant and crop physiology**. New York: Marcel Dekker, 2002. p.657-679.

BATES, L. S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BERGONCI, J. I. et al. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1531-1540, 2000.

BIANCHI, C. A. M. et al. Ajuste osmótico em milho cultivado em diferentes sistemas de manejo de solo e disponibilidade hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 645-651, 2005.

BOHNERT, H. J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**, v. 78, n. 1, p. 237-260, 1999

BRAY, E. A. Plant responses to water deficit. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 48-54, 1997.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUCE, W.B., EDMEADES, G.O., BARKER, T.C. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. **Journal of Experimental Botany** 53 (366): 13-25, 2002.

CAKMAK, I.; HORST, J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (Glycine Max). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991.

CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. DE L.; WILLADINO, L.G.; CAVALCANTE, U.M.T. (eds.). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife: UFRPE, 2005. cap. 2 , p. 95-104.

CAMPOSTRINI, E, Fluorescência da clorofila a, considerações teóricas e aplicações praticas, Disponível em [http://WWW.unef.br/Uenf/Downloads/CENTRO\\_CCTA\\_1629\\_1112121492.pdf](http://WWW.unef.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf). Acesso em 20 de mar.2009.

CASTRILLO, M. et al. Responses of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase, protein content, and stomatal conductance to water deficit in maize, tomato, and bean. **Photosynthetica**, v.39, p.221-226, 2001

CHAGAS R.M et al., Photochemical damage and comparative performance of superoxidedismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 90 (2008) 181–188.

CHAVES, M.M.; MAROCO, J.P.; PEREIRA, J.S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology** v.30, p.239-264, 2003.

COCKING, E. C.; YEMM, E. W. Estimation of aminoacids by ninhydrin. **Biochemical Journal**, v. 58, p. 12-13, 1954.

COLOM M. R.; VAZZANA C. Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought-sensitive weeping lovegrass plants. **Environmental and Experimental Botany**, 49:135-144. 2003

CONAB-. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar**, segundo levantamento, setembro/2010, 16p.

COSTA, J. R. ; PINHO, J. L N & PARRY, M. M. Produção de matéria seca de híbridos de milho sob diferentes níveis de estresse hídricos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n.5, p.443–450, 2008.

CRUZ, R. F. D. DA. **Indução e recuperação do stress hídrico em variedades portuguesas de milho**. 2006. 182 p. Dissertação Mestrado-Universidade do Minho, Portugal, 2006.

DANIELIS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. **Sugarcane improvement through breeding**. New York: Elsevier, 1987. 84p.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FAO. **Food production and security**. 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/topic1.htm#brazil>>. Acesso em: 20 mar. 2008.

FAUCONNIER, R.; BASSEREAU, D. **La caña de azúcar: técnicas agrícolas y producciones tropicales**. Barcelona: Blume, 1975. 433 p.

FUMIS, T. DE F.; PEDRAS, J. F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 449-453, 2002.

GALBIATTI, J. A. et al. Efeito de diferentes períodos de irrigação no desenvolvimento, produção e qualidade de sementes na cultura do milho (*Zea mays* L.). **Engenharia Agrícola**, v. 24, n. 2, p. 301-308, 2004

GHEYI, H. R. Problema de salinidade na agricultura irrigada. In: OLIVEIRA, T. S.; ASSIS JÚNIOR, R.N.; ROMERO, R.E.; SILVA, J.R.C. (Eds.). **Agricultura, sustentabilidade e o semi-árido**. Fortaleza, CE: UFC, 2000. p. 329-346.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

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

GONÇALVES, E. R. **Fotossíntese, osmorregulação e crescimento inicial de quatro variedades de cana-de-açúcar submetida à deficiência hídrica**. 2008. 66p. Dissertação de Mestrado- UFAL, Brasil, 2008.

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

HASEGAWA, P. M. et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biological**, v. 51, p. 463–499, 2000.

HENDRY, G. A. F.; GRIME, J. P. **Methods in comparative plant ecology** - a laboratory manual. 1 ed. London: Chapman & Hall, 1993, 252 p.

HERMANN, E.R. & G.M.S. CÂMARA. Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar. **Revista da STAB**, 17: 32-34. 1999.

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.

INMAN-BAMBER, N.G. Sugarcane water stress critere for irrigation and drying off. **Field Crops Research**, 8107-122. 2004

KARPINSKI, S. et al., Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 275-294, 2002.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, SP: RiMa, 2004. 531 p.

LAWLOR, D.W. Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: s tomata vs. metabolism and the role of ATP. **Annals of Botany** v.89, p.871-885, 2002.

LITERATO, M. A. R et al., Leaf water potential, gas exchange and chlorophyll a fluorescence in cariquara seedlings (*Minquartia guianensis* Aubl.) under water stress and recovery. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18(2):315-323, 2006

LONG SP, et al., Damage to photosynthesis during chilling and freezing and its significance to the photosynthetic productivity of field crops. In: **Baltscheffsky M (ed) Current Research in Photosynthesis**, Vol. IV. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 835–842. 1990

MAAS, E. V.; HOFFMAN, G. J. Crop salt tolerance - current assessment. **Journal of Irrigation and Drainage Division**, v. 103, p. 115-134, 1977.

MAIA, P. S. P., et al. Conteúdo relativo de água, teor de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de duas cultivares de milho submetidas a estresse hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 918-920, jul. 2007.

MARKWELL J, et al., Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**. 46:467-472. 1995.

MASIA, A. Physiological effects of oxidative stress in relation to ethylene in post-harvest produce. In: Hodges DM (ed) Post-harvest oxidative stress in horticultural crops. **Food Products Press**. New York, pp 165–197, 2003.

MATSUOKA, S. **Relatório anual de programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar**. Araras: UFSCar, CCA, DBV, 2000. 39p.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence – A practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

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

MOLINARI, H.B.C. et al., Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (Citrus sinensis Osb. x Poncirus trifoliata L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v.167, p.1375-1381, 2004.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 239–250, 2002.

NABLE, R. O.; ROBERTSON, M. J.; BERTHELSEN, S. Response of shoot growth and transpiration to soil drying in sugarcane. **Plant and Soil**, v. 207, p. 59-65, 1999

NÓBREGAS, J.C.M. & DORNELAS, M.C. Biotecnologia e melhoramento da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E. et al., **Atualização em produção em cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livros Ceres, 2006. P39-56.

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

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

O'NEIL P.M.; SHANAHAN J. F.; SCHEPERS J. S. Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. **Crop Science**, 46: 681-687.2006

OLIVEIRA, R. A. DE. et al. Crescimento e desenvolvimento de três cultivares de cana-de-açúcar, em cana-planta, no Estado do Paraná. **Scientia Agraria**, v. 5, n. 1-2, p. 87-94, 2004.

OLIVEIRA, R. A. et al., Área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 37(2): 71-76, jun. 2007

PIMENTEL. C. **A relação da planta com a água**. -Seropédica, RJ: Edur, 2004. 191p.

PIMENTEL, C. Relações hídricas em dois híbridos de milho sob dois ciclos de deficiência hídrica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 11, p. 2021-2027, 1999.

PINHEIRO, H. A. et al., Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clone of coffeea canephora subjected to long-term drought. **Plant Science**, v.167, p.1307-1314, 2004.

PINHO, J. L. N. DE.; ANSEL, D. Evolução do teor de prolina em cultivares de milheto (*Pennisetum americanum* L.) e sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] em resposta ao estresse hídrico. **Ciência Agronômica**, v. 26, n. 1-2, p. 1-9, 1995.



PRISCO, J. T. Alguns aspectos da fisiologia do “stress” salino. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, p. 85-94, 1980.

QING, Z. M.; JING, L.G.; KAI, C.R. Photosynthesis characteristics in eleven cultivars of sugarcane and their responses to water stress during the elongation stage. **Proc. ISSCT** 24:642-643.2001

ROBERTSON, M. J. et al. Physiology and productivity of sugarcane with early and mid-season water deficit. **Field Crops Research**, v. 64, p. 211-227, 1999.

RODRIGUES, J.D. Fisiologia da cana-de-açúcar. 1995. Disponível em: <<http://www.residenciaagronomica.ufpr.br/bibliografia/MATURAD.pdf>>. Acesso em: 20 mar 2008.

SAMARAS. Y., et al., Proline accumulation during water deficit. In: Smirnov N, ed. Environment and plant metabolism. **Flexibility and acclimation**. Oxford: Bios Scientific Publishers. 1995.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R.; Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n. 3, p. 287-294, 1998.

SCHOLES, J. D.; HORTON, P. Photosynthesis and chlorophyll fluorescence: simultaneous measurements. In: HENDRY, G. A. F.; GRIME, J. P. (Ed.). **Methods in comparative plant ecology** - a laboratory manual. London: Chapman & Hall, 1993. p.130-135.

SIDDIQUE, M. R. B.; HAMID, A.; ISLAM, M. S. Drought stress effects on water relation of wheat. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 45, p. 31-39, 2000.

SILVA, J. V. et al. Distribuição do sistema radicular em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 10., 2005, Recife. **Anais...** Recife: DataAgros, 2005. 1 CD-ROM.

SILVA, M. DE A. et al. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 3, p. 193-201, 2007.

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

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009, 843 p.

TERAUCHI, T. & MATSUOKA, M. Ideal characteristics for the early growth of sugarcane. **Japanese Journal of Crop Science**, 69: 286-292. 2000.

TOLLENAR M, AGUILERA A (1992) Radiation use efficiency of an old and new maize hybrid. **Agronomy Journal**. 84:536-541

VASCONCELOS, A. C. F. et al., Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. **Scientia Agrícola. (Piracicaba, Braz.)**, v.66, n.3, p.395-402, May/June 2009.

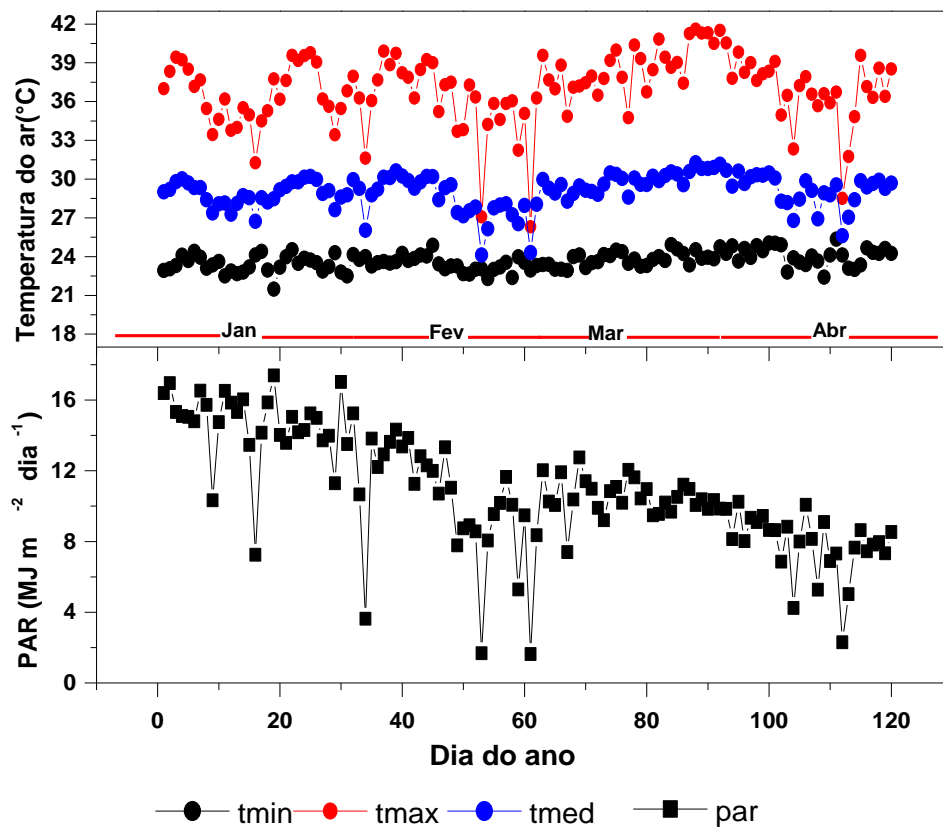
VASCONCELOS, A. C. M. **Desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea de socas de cana-de-açúcar sob dois sistemas de colheita: crua mecanizada e queimada manual**. 2002. 140 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002

WANG; W-B et al., Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. **Plant Physiology and Biochemistry** 47, 570–577, 2009.

ZHANG, J.; KIRKHAM, M. B. Lipid peroxidation in sorghum and sunflower seedlings as affected by ascorbic acid, benzoic acid, and propyl gallate. **Journal of Plant Physiology**, v. 149, p. 489-493, 1996.

ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.

## **APÊNDICES**



**APÊNDICE A** Dados diários de temperatura mínima, máxima e média, em °C, e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) observados na casa de vegetação, durante o período de imposição dos tratamentos.

**APÊNDICE B-** Reduções no potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) da antemanhã (A) e ao meio-dia (B) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivados em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio em vasos.

		$\Psi_w$ 6h (MPa)		
Genótipos		Controle	Estresse Moderado	Estresse Severo
<b>Horário 1</b> <b>5 as 6hs</b> <b>antemanhã</b>	<b>RB931011</b>	-0,12	-0,14 (16,32%)*	-0,16 (26,53%)*
	<b>RB931013</b>	-0,12	-0,18 (44,89%)*	-0,21 (69,38%)*
	<b>RB72910</b>	-0,12	-0,15 (25,00%)*	-0,18 (50,00%)*
	<b>CL001</b>	-0,12	-0,17 (43,75%)*	-0,22 (66,66%)*
	<b>CL002</b>	-0,15	-0,21 (41,66%)*	-0,24 (60,00%)*
	<b>CL003</b>	-0,11	-0,12 (4,34%)*	-0,14 (23,91%)*
		$\Psi_w$ 12 h (MPa)		
Genótipos		Controle	Estresse Moderado	Estresse Severo
<b>Horário 2</b> <b>Meio-dia</b>	<b>RB931011</b>	-0,65	-1,05 (36,36%)*	-1,07 (38,31%)*
	<b>RB931013</b>	-0,65	-0,87 (32,56%)*	-1,05 (57,85%)*
	<b>RB72910</b>	-0,65	-1,06 (64,59%)*	-1,20 (57,85%)*
	<b>CL001</b>	-0,65	-0,96 (49,61%)*	-1,21 (87,74%)*
	<b>CL002</b>	-0,74	-0,93 (24,74%)*	-1,36 (82,27%)*
	<b>CL003</b>	-0,64	-0,66 (3,11%)*	-1,06 (65,36%)*

\* Reduções entre os tratamentos de maior restrição hídrica em relação ao controle

**APÊNDICE C** Tabela de redução para os teores de clorofila a (Chl *a*), clorofila b (Chl *b*), clorofila total (Chl *Total*), relação clorofila *a/b* (Chl*a* / Chl*b*) e carotenóides em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo – AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivadas em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio.

Genótipos	Trat.	Pigmentos Fotossintéticos				
		Chl <i>a</i> (mg.g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>b</i> (mg.g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>Total</i> (mg.g <sup>-1</sup> MF)	Chl <i>a/Chl b</i>	Carotenóides (μmol.g <sup>-1</sup> MF)
RB931011	C	1,85Aa	0,54Aa	2,39Aa	3,43Aa	0,58Aa
	EM	1,56Ab (15,65%)*	0,53Aa	2,09Ab (12,46%)*	3,00ABb (12,47%)*	0,56Aa
	ES	1,36Abc (26,64%)*	0,53Aa	1,88Abc (21,15%)*	2,58Ac (24,82%)*	0,51Aa
RB931013	C	1,64Ba	0,54Aa	2,19ABa	3,04Aa	0,57Ba
	EM	1,53Aba	0,54Aa	2,05ABa	2,94ABa	0,48Aa (15,88%)*
	ES	1,51Aa	0,52Aa	2,05Aa	2,79Aa	0,43BCb (27,79%)*
RB72910	C	1,58Ba	0,53Aa	2,07BCa	3,28Aa	0,55Aba
	EM	1,37Ca (13,25%)*	0,49Bab (8,13%)*	1,90Ca (8,06%)*	3,17Aa	0,51Aa
	ES	1,28ABb (18,87%)*	0,41Ab (22,35%)*	1,7ABb (18,06%)*	2,60Aa	0,51Aa
CL001	C	1,36Aa	0,54Aa	1,9Ca	2,56Aa	0,48Ba
	EM	1,31Ba	0,53Aa	1,84BCab (3,17%)*	2,52Bab (16,60%)*	0,39Bab (37,73%)*
	ES	1,20Ca	0,48Aa	1,68Ab (11,40%)*	2,51Ab (18,63%)*	0,38Cb (38,81%)*
CL002	C	1,46ABa	0,46Aa	1,92Ca	3,15Aa	0,53Aba
	EM	1,35Ca	0,46ABa	1,81BCa	2,96ABa	0,44BCa (16,60%)*
	ES	1,32Ba	0,45Aa	1,77Aa	2,91Aa	0,43ABb (18,63%)*
CL003	C	1,52ABa	0,52Aa	2,02BCa	2,99ABa	0,48Aa
	EM	1,46ABCb (3,94%)*	0,51ABa	1,97Aba (3,33%)*	2,85ABa	0,48Aa
	ES	1,52Bb (15,26%)*	0,48Aa	1,77Ab (13,24%)*	2,69Aa	0,48BCa
CV (%)		7,10	9,54	6,10	10,80	8,64

\* Reduções entre os tratamentos de maior restrição hídrica em relação ao controle

**APÊDICE D** Tabela de redução para teores de carboidratos solúveis, N- $\alpha$ -aminosolúvel, proteínas solúveis e prolina livre em seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60%) e estresse severo (0 a 20% AD), cultivados em casa-de-vegetação, aos 170 dias após o plantio.

Genótipos	Trat.	Solutos Orgânicos			
		N- $\alpha$ -amino solúveis ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	Proteínas Solúveis ( $\text{mg.g}^{-1}$ MF)	Prolina Livre ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)	Carboidratos Solúveis ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS)
RB931011	C	64,50 Aa	17,26 ABa	0,52 Ab	459,65 Aa
	EM	66,79 Aa	16,21 ABab (6,11%)*	0,54 Ab (41,47%)*	419,81 ABa
	ES	69,47 Aa	15,22 Bb (11,83%)*	1,85 Aba (82,79%)*	419,87 ABa
RB931013	C	50,35 BCb	14,50 Ca	0,38 Ab	419,87 ABa
	EM	54,05 Ab (3,85%)*	15,68 ABa	0,45 Ab (16,11%)*	404,09 Aa
	ES	68,02 Aba (11,83%)*	14,68 BCa	1,15 CDa (67,03%)*	418,28 ABa
RB72910	C	59,97 Aa	16,51 Ba	0,57 Ab	418,31 ABa
	EM	61,84 Aa	14,87 BCa	0,64 Ab (11,32%)*	460,51 Aa
	ES	66,12 ABa	13,86 BCa	1,53 BCa (62,96%)*	377,58 Ba
CL001	C	51,19 BCb	18,60 Aa	0,46 Ab	358,49 ABb
	EM	51,87 Bb(15,52%)*	17,25 Aa	0,75 Ab (11,32%)*	417,04 Ab (23,87%)*
	ES	61,40 Ba (16,63%)*	17,12 Aa	1,41 Ca (67,43%)*	545,95 Aa (23,61%)*
CL002	C	60,81 ABa	15,52 BCa	0,36 Ab	547,81 Aa
	EM	68,17 Aa	13,30 Cb (2,5%)*	0,47 Ab (22,87%)*	452,51 Aa
	ES	68,49 ABa	13,96 Cb (16,29%)*	2,11 Aa (82,77%)*	450,23 ABa
CL003	C	44,00 Ca	15,53 ABa	0,60 Aa	498,41 Aa
	EM	48,60 Ba	14,91 BCa	0,73 Aa	327,12 Aa
	ES	48,88 Ca	14,00 Ca	0,83 Ca	355,50 Ba
<b>Media Geral</b>		15,39	58,64	21,76	431,07

\* Reduções entre os tratamentos de maior restrição hídrica em relação ao controle



**APÊNDICE E** Tabela de redução de altura de planta ( $h_{\text{planta}}$ ), diâmetro do colmo ( $\Phi_{\text{colmo}}$ ), número de perfilhos (Unid) e área foliar (AF) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivadas em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio.

Genótipos	Trat.	Perfilhos (Unid)	$\Phi_{\text{colmo}}$	$h_{\text{colmo}}$	AF
		Variedades	(cm) x Estresse hídrico	(cm)	(cm <sup>2</sup> )
RB931011	C	2,75 BCa	1,79 Aa	104,25ABa	3007,53ABa
	E M	2,25 Cab (11,11%)*	1,74 ABab (8,05%)*	83,45 Bb (14,34%)*	2817,49Aa
	ES	2,00Bb (27,27%)*	1,60 Ab (10,61%)*	79,750Ab (23,50%)*	2733,53Aa
RB931013	C	3,00BCa	1,85 Aa	71,48 Da	2590,05Ba
	E M	2,75Ba (63,64%)*	1,81 Aab (7,73%)*	69,63 Ba (31,06%)*	2474,03Aa
	ES	1,00Cb (66,67%)*	1,67 Ab (9,73%)*	48,00 Bb (32,85%)*	2392,87Aa
RB72910	C	3,75 Ba	1,27 Ba	82,83CDa	3147,60ABa
	E M	3,75Aa	1,24 Ca	75,08 Ba (19,65%)*	2659,98Aa
	ES	3,25Aa	1,23 Ba	60,33 Bb (27,16%)*	2626,80Aa
CL001	C	4,75Aa	1,69 Aa	75,75Da	2697,85Ba
	E M	4,25 Aa (37,65%)*	1,56 Ba	57,250Cb (4,28%)*	2431,72Aa
	ES	2,65 Bb(41,21%)*	1,54Aa	54,80 Bb (27,66%)*	2241,85Aa
CL002	C	2,75BCa	1,73Aa	91,13 Ca	2924,80ABa
	E M	1,00 Db	1,69ABab (8,28%)*	81,20Ba (24,14%)*	2763,74Aab (15,35%)*
	ES	1,00 Cb (63,61%)*	1,55Ab (10,25%)*	61,60 Bb(32,40%)*	2339,63Ab (20,01%)*
CL003	C	2,25Ca	1,67 Aa	112,83 Aa	3397,66Aa
	E M	1,75 Dab (28,57%)*	1,64 ABa	108,68 Aa (25,17%)*	3042,12Aab (15,22%)*
	ES	1,25 BCb (44,44%)*	1,53 Aa	81,33 Ab (27,92%)*	2578,98Ab (24,10%)*
<b>Media Geral</b>		2,53	1,59	77,75	2322,15

\* Reduções entre os tratamentos de maior restrição hídrica em relação ao controle

**APÊNICE F** Tabela de redução da produção de massa seca em folhas, colmos + bainhas (C+B), e parte aérea (PA), e massa seca de raízes (MsR), relação raiz/parte aérea (R/PA) e matéria seca total (Ms.total) de seis genótipos de cana-de-açúcar submetidos aos tratamentos controle (80 a 100% da Água Disponível do solo - AD), estresse moderado (40 a 60% AD) e estresse severo (0 a 20% AD) cultivadas em casa-de-vegetação aos 170 dias após o plantio.

Genótipos	Trat.	Massa seca (g)					Ms.Total
		Folha (g)	C + B	PA	MsR	R/PA	
<b>RB931011</b>	<b>Cont</b>	28,89ABa	61,40Aa	90,29Aa	31,78Aa	0,35Bb	122,07Aa
	<b>Est.M</b>	25,97Cb (9,82%)*	41,89Ab (12,34%)*	67,86Ab (11,38%)*	28,89ABb (6,62%)*	0,40Aa (5,12%)**	95,75Ab (10,97%)*
	<b>Est.S</b>	23,42Bc (18,93%)*	36,72Ac (40,20%)*	60,14Ac (33,39%)*	25,11Ab (20,99%)*	0,42Aba (18,42%)**	85,25Ac (30,16%)*
<b>RB931013</b>	<b>Cont</b>	26,76Ba	31,58Ca	58,34Ca	21,58Ba	0,37ABa	79,92Ca
	<b>Est.M</b>	25,25Ca (20,55%)*	26,42Cb (28,58%)*	51,67Bb (24,68%)*	19,69Cb (25,63%)*	0,38Aa	71,36Ba (24,94%)*
	<b>Est.S</b>	20,06Cb (25,04%)*	18,87CDc (40,25%)*	38,92BCc (33,29%)*	14,64Cc (36,32%)*	0,38Ba	53,56Cb (32,98%)*
<b>RB72910</b>	<b>Cont</b>	30,92Aa	32,26Ca	63,18Ca	23,67Ba	0,37ABa	86,85Ba
	<b>Est.M</b>	30,74Aa (28,59%)*	32,01Ba (32,24%)*	62,75Aa (30,45%)*	23,13ABb (29,94%)*	0,37Aa	85,88Aa (37,34%)*
	<b>Est.S</b>	21,95BCc (29,01%)*	16,69Db (32,77%)*	37,22Cb (30,93%)*	16,59BCc (40,42%)*	0,38Aa	53,81Cb (37,07%)*
<b>CL001</b>	<b>Cont</b>	27,54Ba	30,40Ca	57,91Ca	21,88Ba	0,38ABb	79,79Ca
	<b>Est.M</b>	27,30BCa (23,74%)*	27,08Ca (19,98%)*	54,39Ba (21,86%)*	21,75Ca (15,39%)*	0,40Aab (8,28%)**	76,14Ba (20,02%)*
	<b>Est.S</b>	20,82BCb (24,40%)*	21,67BCb (28,72%)*	42,50BCb (26,61%)*	18,40Bb (15,90%)*	0,43Aa (14,64%)**	60,90BCb (23,67%)*
<b>CL002</b>	<b>Cont</b>	31,26Aa	51,06Ba	82,33Ba	28,55Aa	0,35Aa	110,88Ba
	<b>Est.M</b>	29,18Aba (27,18%)*	37,70Ab (36,37%)*	66,88Ab (32,01%)*	24,05Bb (33,58%)*	0,36Aa	90,93Ab (30,54%)*
	<b>Est.S</b>	21,25BCb (32,02%)*	23,99BCc (53,02%)*	45,47Bc (44,77%)*	17,69BCc (48,93%)*	0,39Ba	63,16Bc (43,04%)*
<b>CL003</b>	<b>Cont</b>	31,72Aa	49,23Ba	80,94Ba	31,32Aa	0,39ABa	112,26Ba
	<b>Est.M</b>	30,62Aa	39,89Ab (36,07%)*	70,52Ab (22,23%)*	29,20Aa (21,64%)*	0,41Aa	99,72Ab (21,90%)*
	<b>Est.S</b>	29,33Aa	25,50Bc (48,20%)*	54,84Ac (32,25%)*	23,04Ab (26,44%)*	0,42ABa	77,88Ac (30,63%)*
<b>Media Geral</b>		26,94	33,57	60,34	25,50	0,423	86,04

\* Reduções entre os tratamentos de maior restrição hídrica em relação ao controle

\*\* Aumento entre os tratamentos de maior e menor restrição hídrica em relação ao controle