



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
ÁREA: PRODUÇÃO VEGETAL



SEBASTIÃO DE OLIVEIRA MAIA JÚNIOR

TESE DE DOUTORADO

**TOLERÂNCIA DE CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR AO DÉFICIT HÍDRICO:  
RELAÇÕES HÍDRICAS, TROCAS GASOSAS, FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA  
E METABOLISMO ANTIOXIDANTE**

Rio Largo - AL  
2017

SEBASTIÃO DE OLIVEIRA MAIA JÚNIOR

**TOLERÂNCIA DE CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR AO DÉFICIT HÍDRICO:  
RELAÇÕES HÍDRICAS, TROCAS GASOSAS, FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA  
E METABOLISMO ANTIOXIDANTE**

Tese apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia: Produção Vegetal, CECA/UFAL, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Laurício Endres  
Co-orientador: Prof. Dr. José Vieira Silva

Rio Largo - AL  
2017

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

- M217t Maia Junior, Sebastião de Oliveira.  
Tolerância de cultivares de cana-de-açúcar ao déficit hídrico :  
relações hídricas, trocas gasosas, fluorescência da clorofila e metabolismo  
antioxidante / Sebastião de Oliveira Maia Junior – 2017.  
165 f. : il.
- Orientador: Laurício Endres.  
Coorientador: José Vieira Silva.  
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas.  
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Produção  
vegetal. Rio Largo, 2017.
- Inclui bibliografia.  
Apêndices: 161-165.
1. cana-de-açúcar. 2. Fotossíntese. 3. Clorofila. 4. Estresse hídrico.  
I. Título.

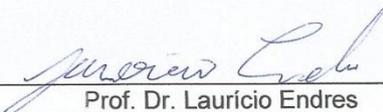
CDU: 633. 61

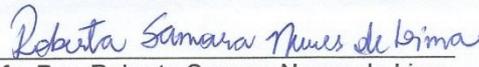
## TERMO DE APROVAÇÃO

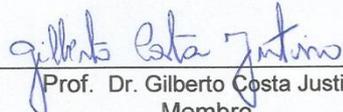
SEBASTIÃO DE OLIVEIRA MAIA JÚNIOR  
(Matrícula 14140075)

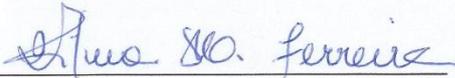
**“Tolerância de cultivares de cana-de-açúcar ao déficit hídrico: relações hídricas, trocas gasosas, fluorescência da clorofila e metabolismo antioxidante”**

Tese apresentada e avaliada pela banca examinadora em vinte e três de outubro de 2017, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Produção Vegetal) da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias da UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Laurício Endres  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Roberta Samara Nunes de Lima  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gilberto Costa Justino  
Membro

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Vilma Marques Ferreira  
Membro

Rio Largo - AL  
Outubro-2017

*Aos meus queridos pais, Sebastião de Oliveira e Maria Barrêto;  
irmãos, Francisco das Chagas e Maria José;  
sobrinhas, Érica Vanessa, Emily Vitória e Isabela, por todo carinho, apoio e incentivo;  
A minha amada noiva Jailma, por todo amor e companheirismo;  
A todos os tios e primos;*

*Enfim, a toda minha Família, fonte de apoio e inspiração para seguir em frente.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro e infinitamente a Deus pela dádiva da vida, e por me instruir e proteger sempre. Creio confiantemente que “Forças Divinas” me ajudaram a superar as dificuldades enfrentadas durante essa temporada!

Aos meus pais, por serem a base do início e a força da continuação de toda minha trajetória, e por todas as lições de vida. Sou-vos grato além dessas palavras.

Aos meus irmãos, por acreditarem na minha determinação. Isso me encorajou o suficiente para enfrentar essa árdua, porém gratificante jornada.

Às minhas sobrinhas, por expressarem na inocência, uma alegria verdadeira nos nossos reencontros.

À Universidade Federal de Alagoas, pela realização do sonho em me tornar Doutor em Agronomia.

A Coordenação de pessoal de Ensino Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal, pelo suprimento físico e logístico, proporcionando-me a satisfação de realizar o que “sonhei” para o Doutorado.

Ao orientador Prof. Dr. Laurício Endres, pela oportunidade concedida, apoio, paciência e ensinamentos. Suas constantes cobranças foram fundamentais para o meu crescimento, sem dúvidas!

Ao co-orientador Prof. Dr. José Vieira Silva, pela atenção, dedicação, compreensão e ensinamentos. Pela convivência desde a fase inicial de experimentos!

Ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (PMGCA) pelo apoio logístico. Em particular ao prof. Geraldo Veríssimo, prof. João Messias, Carlos Assis, Edmundo, Edleuza e Seu Ciço.

À minha noiva Jailma, por toda paciência, carinho e compreensão, além das incontestáveis ajudas nas avaliações dos experimentos. Sempre juntos!

Ao IC João Antônio, pela colaboração na implantação e condução dos primeiros experimentos.

Aos demais colaboradores que muito me ajudaram no decorrer dos experimentos e análises laboratoriais, Karolyne Priscila, Vicente, Julhyanne Christiny, July Moura, Andrea, André, Adenilton, Rafael, Joyce, Japa. Enfim, a todos que colaboraram, sintam-se agradecidos.

A pós-doc Claudiana Moura, por todas as discussões científicas e apoio dispensado.

A técnica do laboratório de Fisiologia Vegetal, Isabela Cardoso, pelas inestimáveis contribuições nas análises bioquímicas, e por todo auxílio prestado até em experimentos, saindo da sua função.

Aos colegas e companheiros do Laboratório de Fisiologia Vegetal por compartilharem comigo momentos de descontração e labuta, Poly, João, Vicente, Karol, Nelson, Thiago, Isabela, Juliana, D. Fátima, Diliani, Jailma, Claudiana, Paulo, Jayne, Lila, Carol, Artur, Jhuly, Juliany, Andrea, André, Rafael, Adenilton, Alex, Joyce, Rui e Elenilton. Enfim, a todos!

Aos companheiros do Campus de Arapiraca, Clebson, Claudjane, Roberta e Rodolfo pelas experiências compartilhadas e “figurinhas trocadas” sobre o IRGA.

Aos amigos de morada, Baiano, Aldair e Luciene, pelo tempo de convívio no decorrer dessa jornada. Ao Baiano e Aldair, também pela ajuda em coleta de dados!

Aos colegas mestrandos e doutorandos que compartilharam comigo bons momentos durante o curso das disciplinas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia do CECA/UFAL, em especial àqueles com quem tive a honra de cursar disciplinas.

Aos funcionários da Pós-graduação, Geraldo Lima, Maxwel, Gustavo e Marcos. Em especial a Gustavo, pelas caronas, e por toda prestatividade e gentileza!

A Micheline e Karol, pelas constantes e divertidas caronas em partes do trajeto ao CECA.

As “meninas da limpeza” dona Ciça, Carla, Simone e Elizabeth, pela manutenção da limpeza no laboratório e sala de estudos.

Ao Sr. Agnésio pela prontidão em acatar as solicitações requeridas, como transporte de solo e equipamentos.

Aos grandes amigos conquistados durante a graduação e a Pós-graduação, e a todos que participaram de forma direta ou indireta da minha vida no CECA/UFAL.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

**Muito Obrigado!**

*“... Não é sobre chegar no topo do mundo  
e saber que venceu,  
é sobre escalar e sentir  
que o caminho te fortaleceu ...”  
(Ana Vilela)*

## ESTRUTURA DA TESE

A tese foi organizada em cinco capítulos. O primeiro capítulo corresponde à introdução geral, e a revisão bibliográfica dos diferentes temas que abrangem esse estudo. O segundo corresponde a primeira parte do experimento I, intitulado “O aumento da espessura da folha, e a manutenção da largura das folhas e das trocas gasosas são indicadores de tolerância à seca em cana-de-açúcar no segundo ciclo” no qual objetivou-se discriminar seis cultivares de cana-de-açúcar quanto a tolerância à seca no segundo ciclo de cultivo, levando em consideração as características biométricas, fisiológicas e a produção de massa seca. O terceiro corresponde a segunda parte do experimento I, intitulado “Um eficiente sistema antioxidante está associado a menor fotoinibição da fotossíntese e maior tolerância à seca de cana-de-açúcar” no qual objetivou-se discriminar seis cultivares de cana-de-açúcar quanto a tolerância à seca no segundo ciclo de cultivo, levando em consideração os pigmentos fotossintéticos e o sistema antioxidante. Os resultados do experimento I serviram de referência para o experimento II sendo ampliados os estudos com as duas cultivares contrastantes na tolerância à seca (a mais e a menos tolerante). O quarto capítulo corresponde ao experimento II intitulado “O acúmulo de osmoprotetores minimiza os efeitos da seca auxiliando na recuperação da eficiência fotoquímica e transporte de elétrons em cana-de-açúcar” no qual objetivou-se compreender a atuação dos osmoprotetores prolina e glicina betaína sobre o aparato fotoquímico das cultivares de cana-de-açúcar contrastantes à seca. O quinto capítulo corresponde ao experimento III intitulado “A aplicação foliar de glicina betaína em cana-de-açúcar minimiza os danos causados pelo déficit hídrico nas trocas gasosas, eficiência fotoquímica e relações hídricas” no qual objetivou-se avaliar o efeito exógeno do osmoprotetor glicina betaína sobre os mecanismos fisiológicos da cultivar tolerante à seca.

## RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica devido à sua utilização como fonte de matéria-prima para a indústria alimentícia e energética, sendo o Brasil o maior produtor mundial. No entanto, a ocorrência de secas sazonais tem sido um dos principais fatores que limitam a produção e longevidade dos canaviais. Nesse sentido, esse estudo se propôs a investigar os efeitos do déficit hídrico em cana-de-açúcar, com os seguintes objetivos: i) discriminar diferentes cultivares de cana-de-açúcar na tolerância à seca, por meio de avaliações fisiológicas, biométricas e bioquímicas; ii) compreender o papel de osmoprotetores sobre a maquinaria fotossintética de cultivares de cana-de-açúcar contrastantes na tolerância à seca; e iii) avaliar os efeitos exógenos do osmoprotetor glicina betaína sobre o aparato fotossintético da cultivar de cana-de-açúcar mais tolerante à seca, quando submetida ao déficit hídrico. Para tanto, três experimentos foram sequencialmente realizados. O experimento I foi realizado em vasos de 170 L dispostos a céu aberto. Os tratamentos consistiram de seis cultivares de cana-de-açúcar e três tratamentos hídricos. As cultivares foram: RB72910, RB99382, RB72454, RB92579, RB855536 e RB931011, e os tratamentos hídricos foram: controle - 80 a 100% de água disponível (AD); estresse hídrico moderado - 40 a 60% (AD) e estresse hídrico severo - 0 a 20% (AD). A cultivar RB92579 foi mais tolerante ao estresse, com menos alterações nas características fisiológicas e biométricas, maior atividade enzimática, além de baixa degradação dos pigmentos fotossintéticos, peroxidação de lipídeos e redução da biomassa. De outra maneira, a RB72454 foi a mais sensível, com maior redução das trocas gasosas, da produção de biomassa, da eficiência fotoquímica, além de baixa atividade enzimática, e aumento da degradação dos pigmentos e da peroxidação de lipídeos. O experimento II foi realizado em casa de vegetação. As cultivares contrastantes à seca, RB92579 e RB72454 foram submetidas a déficit hídrico, com a suspensão da irrigação. Quando as plantas atingiram o estresse máximo, foram reidratadas. A cultivar RB92579 teve menor redução da taxa de transporte de elétrons e da eficiência efetiva do PSII. Além disso, aumentou a concentração de prolina e glicina betaína sob estresse hídrico, mantendo essa concentração na reidratação ainda maior que o controle. Enquanto a RB72454 teve maior redução da taxa de transporte de elétrons e da eficiência efetiva do PSII com aumento do *quenching* não fotoquímico, além de pouco e nenhum aumento na concentração de prolina e glicina betaína, respectivamente, sob déficit hídrico. O experimento III foi realizado em casa de vegetação. A cultivar mais tolerante à seca, RB92579, foi submetida à aplicação foliar de glicina betaína (sem, com uma, e com duas aplicações). Posteriormente, as plantas foram submetidas a déficit hídrico, com a suspensão da irrigação, e quando atingiram o estresse máximo, foram reidratadas. A aplicação foliar de glicina betaína ajudou na manutenção das trocas gasosas, da eficiência fotoquímica do PSII, da condição de água nos tecidos, e da eficiência de carboxilação. Além disso, aumentou a eficiência no uso da água, e diminuiu o excesso de energia e a fotoinibição. A glicina betaína atenua os efeitos causados pelo déficit hídrico na fisiologia da cana-de-açúcar, além de auxiliar na recuperação.

**Palavras-chave:** Cana-de-açúcar. Estresse hídrico. Trocas gasosas. Clorofilas. Enzimas antioxidantes. Osmoproteção. Fotossistema II. Recuperação.

## ABSTRACT

The sugarcane is a crop of great economic importance due to its use as a source of raw material for the food industry and energy, Brazil is the world's largest producer. However, the occurrence of seasonal droughts has been one of the main factors limiting sugarcane production and longevity. Thus, this study proposed to investigate the effects of drought in sugarcane, with the following objectives: i) to discriminate different sugarcane cultivars in drought tolerance by means of physiological, biometric and biochemical evaluations; ii) to understand the role of osmoprotectants on the photosynthetic machinery of contrasting sugarcane cultivars in drought tolerance; e iii) to evaluate the exogenous effects of osmoprotector glycine betaine on the photosynthetic apparatus of the sugarcane cultivar more tolerant to drought when submitted to water deficit. For this, three experiments were sequentially performed. The experiment I was performed in pots 170 L disposed the open sky. The treatments consisted of six cultivars of sugarcane and three treatments of water. The cultivars were: RB72910, RB99382, RB72454, RB92579, RB855536 and RB931011, and the water treatments were: control - 80 to 100% water available (AW); moderate water stress - 40 a 60% (AW) and severe water stress - 0 a 20% (AW). The cultivar RB92579 was more drought tolerant, with less changes in physiological and biometric characteristics, higher enzymatic activity, besides low degradation of photosynthetic pigments, lipid peroxidation and biomass reduction. Other way, the RB72454 was the more sensitive, with higher reduction of gas exchanges, of biomass production, of photochemical efficiency, besides low enzymatic activity, and increased degradation of pigments and lipid peroxidation. The experiment II was performed in greenhouse. The cultivars contrasting to drought, RB92579 and RB72454 were submitted to drought stress, with to suspension of irrigation. When the plants reached maximum drought stress, were rehydrated. The cultivar RB92579 had less reduction of electron transport rate and of effective efficiency PSII. Furthermore, increased the proline concentration and glycine betaine under drought stress, maintaining this concentration in rehydration even higher than the control. While the RB72454 had higher reduction of electron transport rate and of effective efficiency PSII with increased of quenching non fotochemistry, besides little and any increased in the concentration of proline and glycine betaine, respectively, under drought stress. The experiment III was performed in greenhouse. The cultivar more drought tolerant, RB92579, was submitted to foliar application of glycine betaine (without, with one, and two applications). Subsequently, the plants were submitted to drought stress, with the suspension of irrigation, and when reached maximum drought stress, were rehydrated. The foliar application of glycine betaine helped in the maintenance of gas exchanges, of photochemical efficiency PSII, of water condition in tissues, and of carboxylation efficiency. Furthermore, increased the water use efficiency, and decreased the excess of energy and the photoinhibition. Glycine betaine attenuate the effects caused by drought stress in the physiology of sugarcane, also helping in the recovery.

**Keywords:** Sugarcane. Drought stress. Gas exchange. Chlorophylls. Antioxidant enzymes. Osmoprotection. Photosystem II. Recovery.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- Figura 1. Esquema simplificado dos efeitos, respostas e recuperação do estresse hídrico nas plantas. Adaptado de Boaretto et al. (2014), Chen et al. (2016) e Ullah et al. (2017). .....6
- Figura 2. Via biosintética da glicina betaína (ASHRAF; FOOLAD, 2007).....21
- Figura 3. Esquema simplificado dos mecanismos e papéis protetores, diretos e indiretos da glicina betaína exógena em plantas cultivadas. ....23

### CAPÍTULO II

- Figura 1. Umidade do solo com cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao estresse hídrico no segundo ciclo (A), pluviometria (B), temperatura média do ar (C) e umidade relativa média do ar (D) durante o período experimental. ....47
- Figura 2. Potencial hídrico da folha (A e B), teor relativo de água (C e D), déficit de pressão de vapor folha-ar (E) e temperatura foliar (F), em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse moderado e estresse severo.....51
- Figura 3. Condutância estomática (A), transpiração (B), concentração interna de CO<sub>2</sub> (C), fotossíntese (D), eficiência de carboxilação (E) e eficiência intrínseca no uso de água (F e G), em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo. ....52
- Figura 4. Eficiência fotoquímica primária do fotossistema II - Fv/Fo (A) e conteúdo estimado de clorofila - SPAD (B) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo. ....54
- Figura 5. Altura de plantas (A), número (B), largura (C) e comprimento de folhas (D), área foliar (E) e área foliar específica (F) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo. ....56
- Figura 6. Diâmetro de colmos (A e B) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo. ....57
- Figura 7. Massa seca de folhas (A), de colmos (B) e da parte aérea (C) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo. ....58

Figura 8. Análise de componentes principais das avaliações fisiológicas (A e B) e biométricas (C e D) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo..... 59

### CAPÍTULO III

Figura 1. Umidade do solo com cultivares de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos hídricos no segundo ciclo de cultivo (A), pluviometria (B), temperatura média do ar (C) e umidade relativa média do ar (D) durante o período experimental..... 73

Figura 2. Teores de pigmentos fotossintéticos: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C), razão clorofila *a/b* (D), carotenoides (E) e eficiência fotoquímica máxima do PSII – Fv/Fm (F) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo..... 80

Figura 3. Atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (A), ascorbato peroxidase (B) e catalase (C); conteúdo de peróxido de hidrogênio - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D) e conteúdo de malondialdeído - MDA (E) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo. .... 83

### CAPÍTULO IV

Figura 1. Temperaturas máxima, média e mínima do ar, umidade relativa média do ar (A), radiação média incidente e déficit de pressão de vapor do ar (B) durante o período de estresse hídrico e reidratação. .... 98

Figura 2. Monitoramento do teor de umidade no solo (%) durante o período dos tratamentos hídricos: controle, estresse e reidratação. As barras verticais indicam o erro padrão da média. .... 99

Figura 3. Taxa de transporte de elétrons - ETR (A), *quenching* não fotoquímico - qN (B), *quenching* fotoquímico - qP (C) e eficiência fotoquímica efetiva do PSII - ΦPSII (D) de duas cultivares de cana-de-açúcar em diferentes dias após tratamentos hídricos. DAE: dias após estresse; DAR: dias após reidratação. As linhas verticais indicam o erro padrão da média. . 103

Figura 4. Eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm) de duas cultivares de cana-de-açúcar em diferentes dias após tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico e reidratação. As linhas verticais indicam o erro padrão da média. .... 105

Figura 5. Concentrações de prolina (A) e glicina betaína (B) em duas cultivares de cana-de-açúcar sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico e reidratação. As linhas verticais indicam o erro padrão da média. .... 106

### CAPÍTULO V

- Figura 1. Temperaturas máxima, média e mínima do ar, umidade relativa média do ar (A), radiação média incidente e déficit de pressão de vapor do ar (B) durante o período de estresse hídrico e reidratação. .... 122
- Figura 2. Monitoramento do teor de umidade no solo (%) nos diferentes dias após os tratamentos hídricos: controle, estresse e reidratação. As barras verticais indicam o erro padrão da média. .... 123
- Figura 3. Condutância estomática -  $g_s$  (A); transpiração -  $E$  (B); fotossíntese -  $A$  (C); eficiência de carboxilação -  $EiC$  (D); e eficiência no uso da água -  $EUA$  (E) em cana-de-açúcar com aplicação foliar de glicina betaína, e submetida a déficit hídrico e reidratação. . 127
- Figura 4. Eficiência fotoquímica máxima do PSII -  $F_v/F_m$ , ao amanhecer (A) e ao meio-dia (B), eficiência fotoquímica efetiva do PSII -  $\Phi_{PSII}$  (C), excesso relativo de energia no PSII - EXC (D), e fotoinibição -  $Fot$  (E) em cana-de-açúcar com aplicação foliar de glicina betaína, e submetida a déficit hídrico e reidratação. .... 129
- Figura 5. Potencial hídrico da folha ao amanhecer (A) e ao meio-dia (B), e teor relativo de água na folha (C) em cana-de-açúcar com aplicação foliar de glicina betaína, e submetida a déficit hídrico e reidratação. .... 130
- Figura 6. Variância explicada por cada fator do componente principal, durante o estresse hídrico (A) e a reidratação (B). PC1-PC3: do primeiro ao terceiro componente principal. .... 132
- Figura 7. Análise de componentes principais (PCA) das respostas fisiológicas em cana-de-açúcar com aplicação foliar de glicina betaína. PC1 e PC2 representam a projeção das variáveis e a distribuição dos tratamentos durante o estresse hídrico (A, B) e a reidratação (C, D). PC1-PC2: o primeiro e segundo componente principal. Parâmetros de fluorescência da clorofila ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{PSII}$ , EXC, Fotoinibição), de trocas gasosas ( $g_s$ ,  $E$ ,  $A$ ,  $EiC$ ,  $EUA$ ) e de relações hídricas ( $\Psi_w$ , TRA). .... 133

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

- Tabela 1. Propriedades químicas e físicas do solo utilizado no experimento. ....46
- Tabela 2. Resumo da análise de variância das variáveis fisiológicas: potencial hídrico da folha ( $\Psi_w$ ), temperatura da folha ( $T_f$ ), déficit de pressão de vapor  $_{\text{folha-ar}}$  ( $DPV_{\text{folha-ar}}$ ), teor relativo de água na folha (TRA), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), concentração interna de  $CO_2$  ( $C_i$ ), fotossíntese ( $A$ ), eficiência de carboxilação ( $E_iC$ ), eficiência intrínseca no uso da água ( $E_iUA$ ), eficiência fotoquímica primária do fotosistema II ( $F_v/F_o$ ) e índice SPAD em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse moderado e estresse severo. .... 50
- Tabela 3. Resumo da análise de variância das variáveis biométricas: altura de plantas (AP), número de folhas (NF), comprimento da folha (CF), largura da folha (LF), área foliar (AF), área foliar específica (AFE), diâmetro do colmo (DC), massa seca de folhas (MSF), massa seca do colmo (MSC) e massa seca da parte aérea (MSPA) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo. .... 55

### CAPÍTULO III

- Tabela 1. Propriedades químicas e físicas do solo utilizado no experimento. .... 72
- Tabela 2. Resumo da análise de variância de parâmetros fisiológicos em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo. .... 78
- Tabela 3. Correlação de Pearson entre clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), clorofila total (Chl *t*), razão clorofila *a/b* (Chl *a/b*), carotenoides (Carot), eficiência fotoquímica máxima do Fotosistema II ( $F_v/F_m$ ), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e teor de malondialdeído (MDA) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: Controle (C), Estresse hídrico moderado (EM) e Estresse hídrico severo (ES). .... 82

### CAPÍTULO IV

- Tabela 1. Caracterização físico-química do solo utilizado no experimento. .... 98
- Tabela 2. Valores médios e  $R^2$  obtidos pela curva de ajuste da análise de regressão para a taxa de transporte de elétrons (ETR), o *quenching* não fotoquímico ( $q_N$ ), o *quenching* fotoquímico ( $q_P$ ) e a eficiência fotoquímica efetiva do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) de duas cultivares de cana-de-açúcar em diferentes dias após tratamentos hídricos. .... 102

Tabela 3. Resumo da análise de variância da eficiência fotoquímica máxima do PSII e osmoprotetores em cultivares de cana-de-açúcar sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico e reidratação. .... 104

Tabela 4. Coeficientes de correlação de Pearson entre prolina (Pro), glicina betaína (GB), eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm), taxa de transporte de elétrons (ETR), *quenching* não fotoquímico (qN), *quenching* fotoquímico (qP) e eficiência fotoquímica efetiva do PSII ( $\Phi$ PSII) de duas cultivares de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico e reidratação. .... 107

## **CAPÍTULO V**

Tabela 1. Caracterização físico-química do solo utilizado no experimento. .... 121

Tabela 2. Resumo da análise de variância dos parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila e relações hídricas em cana-de-açúcar com aplicação foliar de glicina betaína, e submetida a déficit hídrico e reidratação. .... 126

Tabela 3. Coeficientes de correlação entre as variáveis: condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), fotossíntese ( $A$ ), eficiência de carboxilação ( $E_iC$ ), eficiência no uso da água ( $EUA$ ), eficiência fotoquímica máxima do PSII ao meio-dia (Fv/Fm), eficiência fotoquímica efetiva do PSII ( $\Phi$ PSII), excesso de energia no PSII (EXC), fotoinibição (Fot), potencial hídrico da folha ao meio-dia ( $\Psi_w$ ) e teor relativo de água (TRA) nos diferentes tratamentos hídricos: Controle (C), estresse hídrico (E) e reidratação (R). .... 131

**LISTA DE APÊNDICES**

APÊNDICE 1. Vista parcial da cana-planta aos 120 dias após o plantio, com detalhe à esquerda de quebra-vento instalado, Rio Largo-AL, 2014.....	142
APÊNDICE 2. Caracterização das plantas de cana-de-açúcar aos 90 dias após a implantação dos tratamentos hídricos no experimento I: controle (A), estresse hídrico moderado (B) e estresse hídrico severo (C), Rio Largo-AL, 2015.....	143
APÊNDICE 3. Avaliação do potencial hídrico da folha, com detalhe da exudação de água na extremidade do corte (A); extração de discos foliares para obtenção do teor relativo de água (B), mensuração das trocas gasosas com o analisador de gas por infravermelho – IRGA, com detalhe da folha inserida na câmara (C), avaliação do índice relativo de clorofila com o clorofilômetro SPAD-502 (D), clipe foliar específico, para relaxamento do PSII e posterior medida da eficiência fotoquímica (E), medidas da largura e comprimento da folha+3 (F e G), medida da altura da planta (H) e leitura da umidade do solo com a sonda PR2 - Delta T Devices (I), Rio Largo-AL, 2015. ....	144
APÊNDICE 4. Extração da folha+1 para as análises bioquímicas: corte da folha (A), seleção da parte mediana (B), posterior embalagem em papel alumínio (C) e acondicionamento em caixa térmica com nitrogênio líquido (D), Rio Largo-AL, 2015. ....	145
APÊNDICE 5. Vista parcial do experimento II com as plantas de cana-de-açúcar aos 90 dias após o plantio (A) e detalhe da câmara 2030-B acoplada na folha para avaliação da curva de luz (B), Rio Largo-AL, 2016. ....	145
APÊNDICE 6. Vista parcial do experimento III com as plantas de cana-de-açúcar aos 65 dias após o plantio (A), plantio dos rebolos por vaso (B), aplicação foliar de glicina betaína (C) e vaso caracterizando o déficit hídrico (D), Rio Largo-AL, 2017. ....	146

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>Sigla/símbolo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Unidade</b>
A	Taxa fotossintética	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete	
$^3\text{Chl}^*$	Clorofilas no estado tripleto	
AF	Área foliar	$\text{cm}^2 \text{planta}^{-1}$
AFE	Área foliar específica	$\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$
AP	Altura de planta	cm
APX	Ascorbato peroxidase	U mg proteína <sup>-1</sup>
ATP	Adenosina trifosfato	
C	Tratamento Controle (irrigação adequada)	
C3	Metabolismo fotossintético que tem como primeiro produto estável da fotossíntese, um composto de 3 carbonos	
C4	Metabolismo fotossintético que tem como primeiro produto estável da fotossíntese, um composto de 4 carbonos	
CAD	Capacidade de água disponível no solo	%
Carot	Carotenoides	$\text{nmol g}^{-1} \text{MF}$
CAT	Catalase	U mg proteína <sup>-1</sup>
Chl <i>a</i>	Clorofila a	$\text{mg g}^{-1} \text{MF}$
Chl <i>a/b</i>	Razão clorofila a/clorofila b	
Chl <i>b</i>	Clorofila b	$\text{mg g}^{-1} \text{MF}$
Chl <i>t</i>	Clorofila total	$\text{mg g}^{-1} \text{MF}$
C <sub>i</sub>	Concentração intracelular de CO <sub>2</sub>	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	
DPV <sub>folha-ar</sub>	Déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar	KPa
<i>E</i>	Transpiração	$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
EM	Estresse hídrico moderado	
ERO	Espécie reativa de oxigênio	
ES	Estresse hídrico severo	
ETR	Taxa de transporte de elétrons	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
EXC	Excesso relativo de energia no PSII	Unidade relativa
F <sub>m</sub>	Fluorescência máxima	Unidade relativa
F <sub>o</sub>	Fluorescência inicial ou basal	Unidade relativa
F <sub>ot</sub>	Fotoinibição	%
F <sub>v</sub>	Fluorescência variável	Unidade relativa
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	Eficiência fotoquímica máxima do PSII	Unidade relativa
F <sub>v</sub> /F <sub>o</sub>	Eficiência primária do PSII	Unidade relativa

GB	Glicina betaína	$\mu\text{mol g}^{-1}$ MS (endógena); mM (exógena)
<i>g<sub>s</sub></i>	Condutância estomática	$\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio	$\mu\text{mol g}^{-1}$ MF
IRGA	(infrared gas analyzer) analisador de gás por infravermelho	
MDA	Ácido malondialdeído	$\text{nmol g}^{-1}$ MF
MSC	Massa seca de colmo	$\text{g planta}^{-1}$
MSF	Massa seca de folha	$\text{g planta}^{-1}$
MSPA	Massa seca da parte aérea	$\text{g planta}^{-1}$
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Íon superóxido	
OH <sup>*</sup>	Radical hidroxila	
P5C	$\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato	
PAM	(Portable Chlorophyll Fluorometer); Fluorômetro portátil de clorofila	
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa	$\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$
Pro	Prolina	$\mu\text{mol g}^{-1}$ MS
PSII	Fotossistema II	
QA	Quinona A	
qN	<i>quenching</i> não fotoquímico	Unidade relativa
qP	<i>quenching</i> fotoquímico	Unidade relativa
SOD	Superóxido dismutase	U mg proteína <sup>-1</sup>
SPAD	(Soil Plant Analysis Development); indica o índice relativo de clorofila	Unidade relativa
TRA	Teor relativo de água	%
ΦPSII	Eficiência fotoquímica efetiva do PSII	Unidade relativa
Ψ <sub>w</sub>	Potencial hídrico da folha	MPa
<i>EiUA</i>	Eficiência intrínseca no uso da água	$\mu\text{mol mol}^{-1}$
<i>EUA</i>	Eficiência instantânea no uso da água	$\mu\text{mol mmol}^{-1}$
<i>EiC</i>	Eficiência instantânea de carboxilação	$\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$
W	Tratamento hídrico	

## SUMÁRIO

RESUMO _____	x
ABSTRACT _____	xi
CAPÍTULO I _____	1
1 INTRODUÇÃO GERAL _____	1
2 OBJETIVOS _____	3
3 REVISÃO DE LITERATURA _____	3
3.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	3
3.1.1 Aspectos gerais e importância econômica .....	3
3.2 Características das cultivares utilizadas.....	4
3.3 Estresse por déficit hídrico.....	5
3.4 Mecanismos biométricos, fisiológicos e bioquímicos em plantas sob déficit hídrico.....	6
3.4.1 Crescimento e produção de biomassa .....	6
3.4.2 Potencial hídrico da folha .....	8
3.4.3 Teor relativo de água na folha .....	9
3.4.4 Trocas gasosas .....	9
3.4.5 Pigmentos fotossintetizantes .....	13
3.4.6 Fluorescência da clorofila .....	15
3.4.7 Ajustamento osmótico e osmoprotetores .....	19
3.4.7.1 Prolina .....	19
3.4.7.2 Glicina betaína.....	21
3.4.7.3 Aplicação exógena de glicina betaína nas plantas .....	22
3.5 Estresse oxidativo: estresse secundário .....	23
3.5.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs) .....	24
3.5.1.1 Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	25
3.5.2 Peroxidação lipídica por acúmulo de malondialdeído (MDA).....	26
3.5.3 Sistema antioxidante .....	27

3.5.3.1 Enzima superóxido dismutase (SOD) .....	28
3.5.3.2 Enzima ascorbato peroxidase (APX) .....	29
3.5.3.3 Enzima catalase (CAT) .....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31
CAPÍTULO II .....	43
RESUMO .....	43
1 INTRODUÇÃO .....	43
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	45
3 RESULTADOS .....	49
4 DISCUSSÃO .....	59
5 CONCLUSÕES .....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
CAPÍTULO III .....	69
RESUMO .....	69
1 INTRODUÇÃO .....	69
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	71
3 RESULTADOS .....	76
4 DISCUSSÃO .....	84
5 CONCLUSÕES .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89
CAPÍTULO IV .....	94
RESUMO .....	94
1 INTRODUÇÃO .....	94
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	96
3 RESULTADOS .....	101
4 DISCUSSÃO .....	107

5 CONCLUSÕES _____	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	112
CAPÍTULO V _____	118
RESUMO _____	118
1 INTRODUÇÃO _____	118
2 MATERIAL E MÉTODOS _____	120
3 RESULTADOS _____	125
4 DISCUSSÃO _____	133
5 CONCLUSÕES _____	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	137
APÊNDICES _____	142

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* spp.) é cultivada em mais de 120 países, sendo o Brasil o maior produtor mundial, que detém mais de um terço da cana cultivada mundialmente, com perspectiva de aumento da produção, e conseqüentemente, de açúcar e etanol. Além do Brasil, destacam-se na produção de cana-de-açúcar os países Índia, China, Paquistão, México, Tailândia, Colômbia, Austrália, Indonésia, Estados Unidos, África do Sul e Filipinas (SANTOS, 2015). Além da produção açucareira, a cana-de-açúcar vem se destacando como uma cultura altamente bioenergética, devido, principalmente, à sua capacidade de produção de biomassa (SILVA et al., 2007; BARBOSA et al., 2015).

O Brasil tem atualmente, uma área plantada com cana-de-açúcar de aproximadamente 8.838,5 mil hectares, distribuídas em todos Estados produtores conforme suas características climáticas. O Estado de São Paulo é o maior produtor com 4558,4 mil ha de área plantada, seguido por Goiás com 939,7, Minas Gerais com 841,7, Paraná com 624,6, Mato Grosso do Sul com 646,3, Alagoas com 301,7 e Pernambuco com 259,5 mil ha (CONAB, 2017).

Nesse contexto, mesmo com todo crescimento da produção na maioria das regiões brasileiras, especialmente a região Nordeste, esta cultura depara-se com alguns fatores limitantes para o cultivo. Entre eles, destaca-se a deficiência hídrica ocasionada tanto pela distribuição irregular, quanto pela ocorrência cada vez mais frequente de secas sazonais. Isso tem tornado o aumento de produtividade um fator bastante limitante, e assim, para garantir a sustentabilidade da produção, é essencial o entendimento das respostas das plantas às condições estressantes (SILVA et al., 2011; DIAS et al., 2012; VIEIRA et al., 2014).

A deficiência hídrica é um fator de estresse que promove a alteração de vários aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos nas plantas (SILVA et al., 2008; MACHADO et al., 2009; MEDEIROS et al., 2013; BOARETTO et al., 2014). A restrição de água no solo é, talvez, a limitação mais comum para o crescimento das plantas, constituindo o maior fator seletivo na evolução destes organismos. Assim, a capacidade de superar condições de déficit hídrico é determinante na distribuição natural das espécies e na produtividade dos cultivos (LARCHER, 2006). Desta maneira, a compreensão de mecanismos de tolerância à seca é importante para a seleção de plantas adaptadas a ambientes com déficit hídrico (SILVA et al., 2007; GRAÇA et al., 2010; SALES et al., 2013).

Uma alternativa para eliminar os prováveis efeitos causados pelo déficit hídrico seria o uso da irrigação que eleva significativamente a produtividade da cultura (DANTAS NETO et

al., 2006; GAVA et al., 2012). Entretanto, na atualidade, essa prática pode se apresentar como um evento desvantajoso devido às mudanças climáticas ocorrentes, com tendência cada vez maior à escassez dos recursos hídricos, inclusive, em áreas onde antes não era registrada tal ocorrência.

As áreas de produção com a cultura da cana-de-açúcar se expandiram para zonas marginais, principalmente com relação à disponibilidade hídrica. Desta maneira, uma forma de resolver essa problemática seria o plantio de cultivares tolerantes à seca, visto que a escolha da cultivar é um dos componentes de produção mais simples de ser substituído e aceito pelos produtores, por não implicar em aumento nos custos de produção (SHIGAKI et al., 2004; CHEN et al., 2016). Para tanto, a necessidade de novas cultivares e a seleção destas com relação aos mecanismos de tolerância à deficiência hídrica é extremamente importante, fazendo com que os programas de melhoramento da cana-de-açúcar busquem além dos ganhos em produção, cultivares que tolerem e sejam eficientes quando inseridas nesses novos sistemas produtivos (SILVA et al., 2007; 2011).

Nesse sentido, uma alternativa plausível para as regiões passíveis de deficiência hídrica, seria o uso de cultivares mais adaptadas ou tolerantes à seca. A seleção de materiais tolerantes e sensíveis à deficiência hídrica pode ser feita por técnicas que avaliem os efeitos biométricos, fisiológicos e bioquímicos provocados pelo estresse hídrico (SILVA et al., 2011; GUAN et al., 2015; CHEN et al., 2016). Desta maneira, a identificação de ferramentas que auxiliem na seleção precoce de materiais tolerantes pode facilitar o processo de melhoramento da cultura.

Algumas características biométricas são descritas na seleção de cultivares de cana-de-açúcar. Por exemplo, variações na altura da planta, no número de folhas, na largura e espessura foliar podem indicar tolerância ou sensibilidade ao déficit hídrico (SILVA et al., 2008; 2012; TRUJILLO et al., 2013). O déficit hídrico pode promover alterações do potencial hídrico foliar, índice SPAD (VIEIRA et al., 2014; Silva et al 2011), do teor relativo de água (SILVA et al., 2013; CANAVAR et al., 2014), da eficiência fotoquímica máxima e efetiva do fotossistema II (COLOM; VAZZANA, 2003; SILVA et al., 2007), do transporte de elétrons (SALES et al., 2013; ABID et al., 2016), dos *quenchings* fotoquímico e não-fotoquímico (LIU et al., 2012), das trocas gasosas (GRAÇA et al., 2010; Medeiros et al., 2013), e dos pigmentos fotossintéticos (SANTOS et al., 2014; CHEN et al., 2016). O déficit hídrico também pode aumentar a produção de prolina (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014), glicina betaína (ABBAS et al., 2014; ANJUM et al., 2017), e peroxidação de lipídeos (SIDDIQUI et al., 2015; CHEN et al., 2016), além de ativar o sistema de defesa antioxidante através das

enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase (CIA et al., 2012; BOARETTO et al., 2014; SIDDIQUI et al., 2015; ANJUM et al., 2017).

Além dos estudos de marcadores fisiológicos e bioquímicos na identificação de cultivares mais tolerantes à seca, o uso de atenuadores a esse estresse também tem sido cada vez mais explorado, como a aplicação foliar de glicina betaína. Este osmoprotetor pode minimizar os efeitos negativos do déficit hídrico, além de auxiliar na recuperação (ANJUM et al., 2012; CHA-UM et al., 2013). Essa prática tem respondido de maneira bastante promissora em diferentes culturas sob condições de seca (ANJUM et al., 2012; CHA-UM et al., 2013; GUPTA; THIND, 2015). No entanto, ainda não existem relatos na cultura da cana-de-açúcar.

## **2 OBJETIVOS**

- Avaliar a tolerância de cultivares de cana-de-açúcar ao déficit hídrico, através de caracterizações biométricas, fisiológicas, antioxidantes e osmoprotetoras;
- Avaliar a atuação exógena de glicina betaína no aumento da tolerância ao déficit hídrico em cana-de-açúcar.

## **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 A cultura da cana-de-açúcar**

#### **3.1.1 Aspectos gerais e importância econômica**

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, da classe Monocotiledônea, Família *Poaceae*, pertencente ao gênero *Saccharum*, e está entre as espécies de maior rendimento fotossintético da família *Poaceae*, apresentando elevada eficiência na utilização do CO<sub>2</sub>, além de alta adaptabilidade às condições de luminosidade e temperaturas elevadas (SEGATO et al. 2006). Uma das características que permitem a cana-de-açúcar produzir em diferentes ambientes deve-se ao fato de ser uma planta C<sub>4</sub>, pois têm elevadas taxas fotossintéticas e alta eficiência na conversão de energia luminosa em energia química, sob condições tropicais. Estas plantas apresentam alto ponto de compensação luminoso e, em temperaturas entre 30 e 40°C possuem alto desempenho fotossintético, quando comparadas com plantas C<sub>3</sub>, necessitando de menores concentrações de gás carbônico, devido aos mecanismos da planta que têm a função de concentração de CO<sub>2</sub> (TAIZ; ZEIGER, 2013). Dessa forma, a cultura é muito efetiva para a produção de biomassa, sendo seu uso, principalmente, para a produção de açúcar e biocombustível (SILVA et al., 2014; BARBOSA et al., 2015).

O caule é do tipo colmo, material de maior interesse econômico, pois é nele que a planta acumula a sacarose, a matéria-prima essencial da cultura. É normalmente de porte ereto, com a presença de nós e entrenós distintos, e bastante importantes na diferenciação de uma espécie e cultivar para outra, isso porque apresentam diversas formas: cilíndricas, carretel, conoidal, obconoidal, tumescente ou barril. O nó ou região nodal é a parte da cana onde se inserem as folhas e onde estão localizadas as gemas, formando o anel de crescimento (MOZAMBANI et al., 2006).

As folhas da cana-de-açúcar são ligadas ao colmo nas regiões nodulares em duas fileiras de forma oposta e alternada. Apresentam-se do tipo lanceolada e são compostas por: lâmina foliar, bainha e colar. A sua disposição na planta pode variar de uma cultivar para outra, em ereta e rígida, ou flácida e arqueada, com ou sem pilosidade. Possui lâmina serrilhada em formato alongado, e nas regiões intermediárias de ligação das folhas com o colmo, demonstram a presença de uma lígula membranosa (MOZAMBANI et al., 2006).

A cana-de-açúcar desenvolve-se em forma de touceira, com a formação de perfilhos. A intensidade do perfilhamento é importante para a produtividade do cultivo e a estrutura da touceira pode ser composta por colmos eretos, semi-eretos e decumbentes, características que são determinadas por aspectos genéticos (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008). O desenvolvimento dos perfilhos é mais rápido a partir do segundo ciclo devido ao sistema radicular já estar estabelecido, enquanto na cana-planta o sistema radicular vai se desenvolver. Além disso, podem ser influenciados por fatores ambientais como temperatura, luz e condição hídrica do solo, bem como por fatores endógenos como o estágio fenológico e as características de cada cultivar (ALMEIDA et al., 2008).

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância socioeconômica e ambiental para o país, sendo cultivada por pequenos, médios e grandes produtores, que geram milhares de empregos diretos e indiretos. O Brasil encontra-se na posição de maior produtor e exportador mundial de açúcar. A previsão para a produção de cana-de-açúcar na safra 2017/2018 deverá atingir 647,6 milhões de toneladas, gerando uma estimativa total de produção de açúcar de 38,70 milhões de toneladas enquanto a geração de etanol é estimada em 26,45 bilhões de litros (CONAB, 2017).

### **3.2 Características das cultivares utilizadas**

A RB72910 é classificada pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar/RIDESA como tolerante ao déficit hídrico, baseado em dados de produtividade em campo experimental, enquanto a RB99382 apresenta perfilhamento e brotação de socaria regulares. A RB72454 apresenta diâmetro do colmo bem desenvolvido, baixa exigência em

fertilidade, e sensibilidade ao déficit hídrico (ENDRES et al., 2010; RIDESA, 2010). A RB855536 apresenta alta produtividade e ótima brotação de socaria quando cultivada sem restrição hídrica (RIDESA, 2010). A RB92579 apresenta alta brotação de socaria, alta produtividade e tolerância ao déficit hídrico (ENDRES et al., 2010; RIDESA, 2010). Já a RB931011 apresenta rápido crescimento, alta estatura, bom desenvolvimento da socaria e tolerância à salinidade (RIDESA, 2010; MEDEIROS et al., 2015).

### **3.3 Estresse por déficit hídrico**

O termo déficit hídrico geralmente é definido como um fator externo, que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta, podendo ocorrer tanto por falta quanto por excesso de água. Por falta ou déficit, pode ser definido como todo o conteúdo de água de um tecido ou célula que está abaixo do conteúdo de água existente, quando está totalmente hidratada, sendo seus efeitos sentidos em todas as partes da planta. No entanto, esses efeitos podem variar de acordo com a duração e a intensidade do estresse (TAIZ; ZEIGER, 2013; GUAN et al., 2015), como pode ser visto na Figura 1.

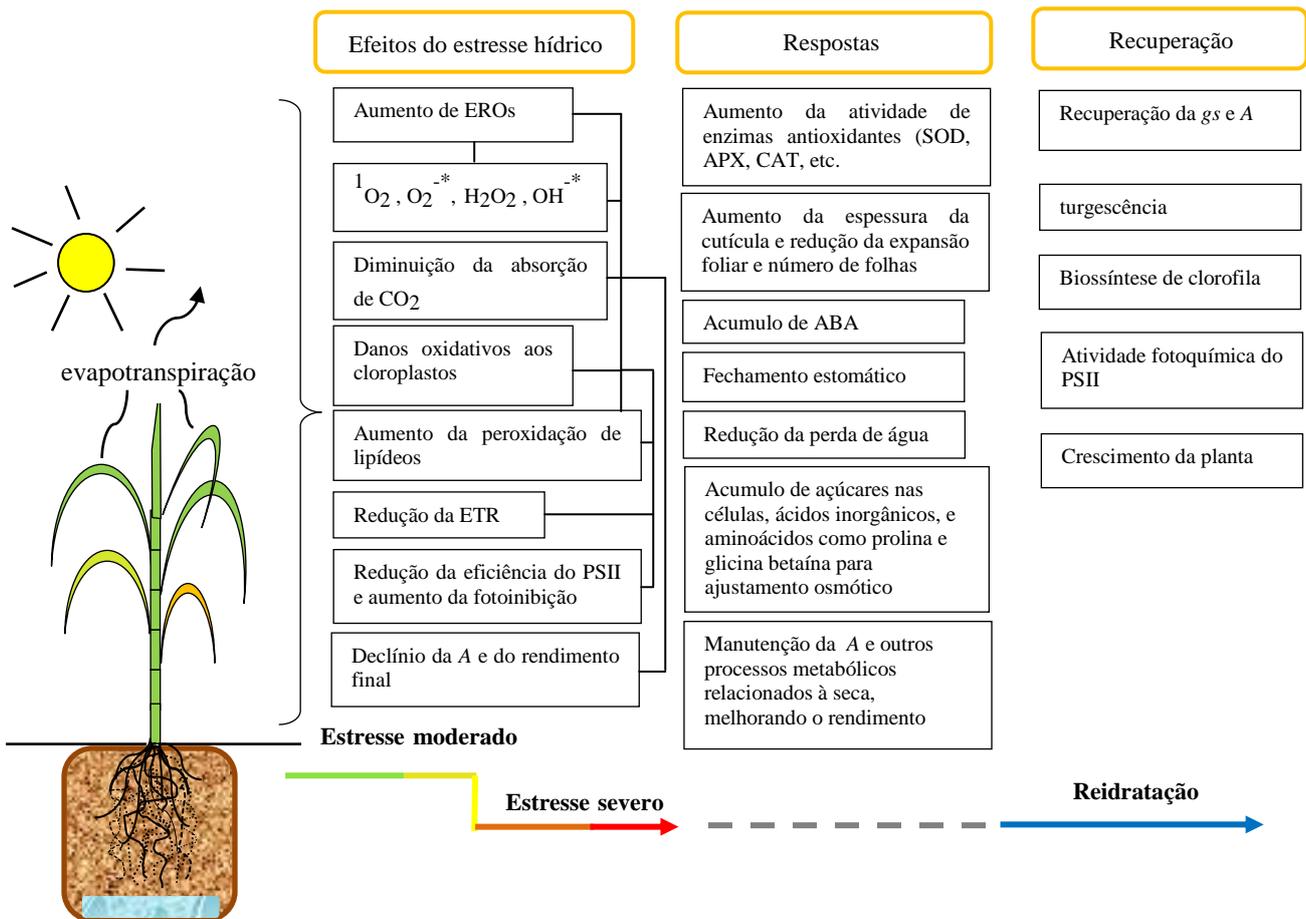
Nos vegetais, a tolerância à falta de água pode ocorrer em maior ou menor intensidade, a depender da espécie, da cultivar, do órgão e tipo de célula. Desta forma, as plantas podem apresentar tolerância quando sobrevivem às adversidades, ou suscetibilidade quando sofrem redução em seu crescimento, podendo chegar à morte a depender da intensidade do estresse ao qual a planta é submetida (LARCHER, 2006; FAROOQ et al., 2009; ANJUM et al., 2016).

Os mecanismos de resistência ao déficit hídrico podem ser divididos em escape, retardo e tolerância. No escape, as plantas adotam uma estratégia de “fuga”, na qual apresentam rápido desenvolvimento fenológico e alto grau de plasticidade, sendo capazes de completar seu ciclo de vida antes que a falta de água torne-se severa o bastante para provocar danos fisiológicos. O retardo ou prevenção da desidratação corresponde à manutenção do turgor e volume celular, tanto pela absorção de água por um sistema radicular abundante quanto pela redução da perda por intermédio do fechamento estomático ou por vias não estomáticas como a via cuticular. E a tolerância à seca é um mecanismo que permite à planta manter o metabolismo, mesmo com a redução do potencial hídrico dos tecidos, devido principalmente ao acúmulo de solutos osmoprotetores (QUEIROZ et al., 2008; TAIZ; ZEIGER, 2013). A tolerância constitui um dos mecanismos de resistência à seca (CHEN et al., 2016).

O fluxo de água do solo até a planta, e desta até a atmosfera é diretamente dependente das condições hídricas do solo e da condução de água pelos diferentes órgãos da planta até as folhas (LARCHER, 2006). Sendo assim, a tolerância das plantas ao estresse hídrico se

manifesta geralmente de quatro formas: (i) limitação no crescimento, (ii) adaptações morfológicas, (iii) adaptações fisiológicas, e (iv) alterações metabólicas (PINCELLI, 2010).

**Figura 1.** Esquema simplificado dos efeitos, respostas e recuperação do estresse hídrico nas plantas. Adaptado de Boaretto et al. (2014), Chen et al. (2016) e Ullah et al. (2017).



Nota: É importante destacar que esses mecanismos: efeitos, respostas e recuperação são intimamente dependentes da intensidade do estresse hídrico.

### 3.4 Mecanismos biométricos, fisiológicos e bioquímicos em plantas sob déficit hídrico

#### 3.4.1 Crescimento e produção de biomassa

O estresse por escassez de água afeta o crescimento e o desenvolvimento das plantas, podendo variar entre as espécies (GUAN et al., 2015; CHEN et al., 2016). Em cana-de-açúcar, o déficit hídrico promove restrições na divisão celular, no número de folhas verdes, na área foliar, na taxa de alongação das folhas e dos colmos, na emissão de novos perfilhos, e no

acúmulo de matéria seca, refletindo assim, no rendimento final da cultura (IANMAN-BAMBER; SMITH 2005; VIEIRA et al., 2014). Isso confirma a importância de avaliações biométricas na seleção e caracterização para o melhoramento de cultivares de cana-de-açúcar, uma vez que as expressões de tolerância podem variar de acordo com a resposta da cultivar utilizada (IANMAN-BAMBER; SMITH, 2005; MACHADO et al., 2009; GAVA et al., 2012).

Entre as principais modificações biométricas durante a adaptação da cana-de-açúcar à deficiência hídrica destacam-se a altura de plantas, o número e diâmetro de colmos, o número de folhas verdes, e a área foliar (SILVA et al., 2008; MACHADO et al., 2009). Em diferentes cultivares de cana-de-açúcar, a deficiência hídrica promoveu reduções no comprimento e na largura da folha+3, no número de folhas verdes e na área foliar (PINCELLI; SILVA, 2012). Esses autores concluíram que apenas o número de folhas e a área foliar foram apontadas como características indicadoras de estresse hídrico, uma vez que o comprimento e a largura foliar mesmo variando entre cultivares, não seguiram um padrão que pudesse ser relacionado com um nível de tolerância ao estresse.

Por outro lado, a área foliar é extremamente sensível às condições hídricas do solo (SMIT; SINGELS, 2006). A redução da área foliar em situações de estresse hídrico acarreta em diminuição da transpiração e da fotossíntese, o que afeta negativamente o processo fotossintético e a produção de biomassa (MACHADO et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010). Sendo assim, esta característica pode ser utilizada como critério de tolerância à seca. A redução na expansão foliar é uma das primeiras respostas decorrente do estresse hídrico, em que uma menor área foliar transpira menos, conservando assim, suprimento adequado de água no solo por mais tempo (GONÇALVES et al., 2010; TAIZ; ZEIGER 2013). Em cultivares de cana-de-açúcar mais tolerantes à deficiência hídrica ocorre pouca redução na área foliar (PINCELLI; SILVA, 2012).

Na fase de desenvolvimento inicial da cultura o crescimento da área foliar é pequeno. No entanto, depois dessa fase as folhas crescem rapidamente até atingir um valor máximo, a partir do qual permanece praticamente constante ou pode diminuir em condições desfavoráveis, como de déficit hídrico (IANMAN-BAMBER; SMITH, 2005; PINCELLI; SILVA, 2012). Em condições de déficit hídrico, principalmente acentuado, ocorre a senescência prematura das folhas, o que ocasiona redução da superfície do limbo e verticalização foliar, limitando a interceptação da luminosidade (VIEIRA et al., 2014). Sendo assim, quanto menor for a interceptação da luz pelo dossel, menor será o acúmulo de biomassa e de fotoassimilados, que serão posteriormente convertidos em carboidratos,

armazenados nos colmos e utilizados no crescimento das plantas (HEERDEN et al., 2010; BARBOSA et al., 2015). Contudo, a diminuição da área foliar exposta à radiação solar pode ser uma resposta precoce ao déficit hídrico, na tentativa de reduzir a transpiração e, assim, garantir o suprimento de água por períodos mais longos de restrição hídrica (PIMENTEL, 2004; GONÇALVES et al., 2010).

Além da expansão foliar, outra característica sensível à restrição hídrica é o alongamento das raízes por ser também dependente do turgor celular, é afetado logo no início do estresse (TAIZ; ZEIGER, 2013). De fato, o primeiro órgão das plantas que detecta a falta de água é o sistema radicular (CARVALHO, 2008; ENDRES et al., 2010), que consequentemente por sinalização do ácido abscísico alcança a parte aérea promovendo outras alterações, como nas trocas gasosas (MACHADO et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010; MEDEIROS et al., 2013).

### **3.4.2 Potencial hídrico da folha**

O potencial hídrico da folha, cujos gradientes dirigem os fluxos da água no sistema solo-planta-atmosfera, decresce na presença de déficit hídrico. Embora haja variação ao longo do dia, esse parâmetro descreve o estado hídrico da folha, e tem sido muito utilizado em estudos das relações hídricas de plantas, sobretudo quando são submetidas a déficit hídrico (BERGONCI et al., 2000).

Todo processo vital da planta é afetado pelo declínio do potencial hídrico. Inicialmente, há perda de turgescência celular, seguido pela redução na divisão e expansão celular, síntese de proteínas, condutância estomática e fotossíntese. Como reflexo dessas interferências, o crescimento e o rendimento produtivo das plantas são efetivamente reduzidos, embora isso possa variar entre espécies e cultivares da mesma espécie (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em plantas de trigo o potencial hídrico foliar reduziu de acordo com a intensidade do estresse e se relacionou fortemente com o fechamento dos estômatos (ZIVCAK et al., 2013). Já, em milho o potencial hídrico da folha variou entre diferentes cultivares submetidas ao déficit hídrico, indicando um bom parâmetro para seleção das cultivares mais tolerantes, visto a relação encontrada com a resistência à seca (CHEN et al., 2016).

O potencial hídrico da folha também foi eficiente na seleção de cultivares de arroz mais tolerantes à seca, visto que as cultivares mais sensíveis reduzem bastante o  $\Psi_w$  com o prolongamento do estresse, em relação às mais tolerantes (PUTEH et al., 2013). Em cana-de-açúcar sob déficit hídrico nas diferentes fases vegetativas, a cultivar mais tolerante ao déficit hídrico manteve o  $\Psi_w$  na fase de crescimento inicial, alterando-se apenas nas fases de

crescimento máximo e de maturação, enquanto a cultivar sensível diminuiu o  $\Psi_w$  em todas as fases vegetativas (MACHADO et al., 2009). Esses autores associaram a manutenção do  $\Psi_w$  com a tolerância à seca, pela manutenção no crescimento em altura e na produção de matéria seca de colmo. Portanto, pode ser indicado na seleção de cultivares de cana-de-açúcar na tolerância à deficiência hídrica (SILVA et al., 2007; 2013; MACHADO et al., 2009).

### **3.4.3 Teor relativo de água na folha**

O teor relativo de água na folha (TRA) é definido como a quantidade de água de um tecido comparada com a quantidade máxima que ele poderá reter em um dado momento (TAIZ; ZEIGER, 2013). Dessa maneira, o TRA é considerado como a variação de massa de água do tecido, que, por sua vez, decorre da variação de massa de água da célula e, conseqüentemente, da variação do volume celular entre a turgescência e a perda desta (ANGELOCCI, 2002). Nesse sentido, a redução no teor relativo de água das folhas é considerado como um bom indicador das condições hídricas em plantas sob estresse hídrico, uma vez que mudanças cruciais no equilíbrio da água levam a danos celulares. Essas mudanças paralisam o crescimento podendo causar até a morte das plantas (ZHANG et al., 2014).

O TRA foi um bom indicador de tolerância ao déficit hídrico em cultivares de cana-de-açúcar, o qual foi mantido nas cultivares mais tolerantes quando estressadas (SILVA et al., 2013). Esses autores, observaram que sob déficit hídrico de 15 dias, a cultivar mais tolerante teve o TRA de 83,5%, enquanto a mais sensível foi de 62,4%. Semelhantemente, cultivares de cana-de-açúcar sensíveis tiveram o TRA inferior as cultivares tolerantes, aos três dias após a suspensão hídrica, e esta diferença persistiu ao longo de 20 dias sob estresse (CIA et al., 2012).

Em plantas de trigo sob déficit hídrico o TRA decresceu com o prolongamento da deficiência hídrica, distintamente entre cultivares, com menor redução nas tolerantes ao estresse, e forte redução nas cultivares sensíveis (CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012). O mesmo ocorreu em cultivares de feijão-fava (SIDDIQUI et al., 2015), cevada (OUKARROUM et al., 2007) e girassol (CANAVAR et al., 2014) sob déficit hídrico.

### **3.4.4 Trocas gasosas**

Plantas sob condição déficit hídrico alteram rapidamente as trocas gasosas, em que o fechamento estomático é a primeira resposta a essa condição (MACHADO et al., 2009; MEDEIROS et al., 2013; GUAN et al., 2015). Geralmente, o fechamento dos estômatos é um

processo diretamente induzido pelas condições hídricas, tanto do solo quanto das folhas (ZIVCAK et al., 2013). A indução do fechamento estomático também pode ocorrer devido a fatores como o déficit de pressão de vapor, diferenças entre folhas de sol ou de sombra e entre estômatos das superfícies abaxial e adaxial. O estômato também responde ao vento, em parte devido aos efeitos sobre a camada limítrofe da folha, e a consequente variação da transpiração (ANGELOCCI, 2002; MACHADO et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010; SILVA et al., 2013). Além disso, os estômatos também respondem a compostos osmoprotetores (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em condições de déficit hídrico, plantas menos tolerantes à seca, com pouca capacidade de ajustamento osmótico, fecham os estômatos numa tentativa de restringir a perda de água pela transpiração (MEDEIROS et al., 2013; GUAN et al., 2015). Esse processo é uma das primeiras estratégias para evitar a desidratação, em que a planta com os estômatos fechados consegue minimizar a perda de água (MACHADO et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010). Contudo, o fechamento estomático compromete a assimilação fotossintética do carbono, podendo afetar o crescimento e a produtividade das culturas (FAROOQ et al., 2009; SILVA et al., 2012; 2015). A limitação da condutância estomática com o estresse hídrico resulta na diminuição da concentração intracelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), indicando que a condutância estomática é um fator importante na fotossíntese. No entanto, se o estresse tornar-se muito intenso o  $C_i$  aumenta consideravelmente, passando a indicar que fatores não-estomáticos também exercem influência no processo fotossintético (LAWOR; CORNIC, 2002; ZIVCAK et al., 2013).

Em cana-de-açúcar a condutância estomática diminuiu entre 94 e 99% nas cultivares sensíveis à seca, quando submetidas a 15 dias de déficit hídrico (SILVA et al., 2013). Em estudos com diferentes cultivares de cana-de-açúcar e capim-elefante foi observado que a redução da condutância estomática promoveu concomitantemente redução na transpiração durante o período de estresse (ARAÚJO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010). Essa relação direta entre condutância estomática e transpiração é esperada, visto que o fluxo de vapor d'água para a atmosfera diminui à medida que ocorre o fechamento dos estômatos (GONÇALVES et al., 2010; GUAN et al., 2015).

A condutância estomática também reduziu em plantas de trigo sob deficiência hídrica. Essa redução foi proporcional ao prolongamento do estresse, principalmente, nas cultivares mais sensíveis à seca (XIANG et al., 2013; GUAN et al., 2015). De maneira semelhante, a condutância estomática diminuiu em plantas de milho sob déficit hídrico de dez dias, nos três horários avaliados, manhã, meio-dia e tarde. Já em sorgo, nas mesmas condições de estresse, a

redução foi observada apenas ao meio-dia, enquanto nos demais horários as plantas dessa espécie não sofreram limitação na abertura estomática (HASAN et al., 2017).

As plantas sob condições hídricas adequadas absorvem grande quantidade de água, mas perdem em torno de 97% através da transpiração, e qualquer alteração no fluxo de água solo-planta-atmosfera prejudica a produção da cultura (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim, o fechamento estomático é, comumente, a estratégia mais utilizada pelas plantas para diminuir a transpiração e manter a turgescência durante as horas mais quentes do dia (GUAN et al., 2015). A transpiração também pode sofrer influência de outros fatores, tais como a reduzida área foliar em decorrência do estresse hídrico e a camada limítrofe que envolve as folhas (GONÇALVES et al., 2010).

Em plantas jovens de cana-de-açúcar, a transpiração teve maior redução na cultivar sensível, 98% após quatro dias de estresse hídrico, e menor na cultivar tolerante com redução de 93% após oito dias de estresse (MEDEIROS et al., 2013). De maneira semelhante, a transpiração reduziu em cultivares de cana-de-açúcar tanto na tolerante quanto na sensível ao déficit hídrico, em diferentes fases de cultivo. Contudo, a cultivar sensível teve drástica redução na fase de crescimento inicial, o que refletiu na redução da biomassa no final do ciclo (MACHADO et al., 2009).

A transpiração também reduziu nos diversos horários avaliados durante um dia em plantas de trigo sob déficit hídrico de 40% da capacidade de campo, de maneira mais expressiva nas cultivares sensíveis (GUAN et al., 2015). Já em outras espécies como milho e sorgo submetidas à deficiência hídrica de dez dias, a transpiração diminuiu nos diferentes horários em que as plantas foram avaliadas, manhã, meio-dia e tarde. Essas reduções da transpiração indicam que durante o dia as plantas estressadas reduzem significativamente a perda de água em relação às plantas não estressadas (HASAN et al., 2017). A redução da transpiração pode atuar como uma estratégia para aumentar a eficiência no uso da água que, no entanto, depende ainda de outros fatores como, a taxa fotossintética, a área foliar e a espessura da folha, além do déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar,  $DPV_{\text{folha-ar}}$  (SILVA et al., 2013; CANAVAR et al., 2014; HASAN et al., 2017). Em cana-de-açúcar, o aumento do  $DPV_{\text{folha-ar}}$  teve correlação negativa com a eficiência no uso da água e a transpiração (ENDRES et al., 2010; SILVA et al., 2013).

A transpiração é o principal mecanismo envolvido na regulação da temperatura das folhas. Quando a transpiração é reduzida, a folha perde a capacidade de resfriamento e aumenta sua temperatura, uma vez que continua recebendo luz (ARAÚJO et al., 2010; SARAIVA et al., 2014). A perda de vapor de água realizada na transpiração contribui para

dissipação de calor, controlando as condições térmicas da planta, que podem em altas temperaturas no ambiente ou em deficiência hídrica, causar danos irreversíveis à planta (VIEIRA et al., 2014; SARAIVA et al., 2014). Assim, pode-se inferir que esse parâmetro é importante na seleção de materiais tolerantes à seca (TRENTIN et al., 2011; SILVA et al., 2013; MEDEIROS et al., 2013).

Em condições adequadas de umidade no solo, a temperatura foliar em cana-de-açúcar foi semelhante à temperatura ambiente, enquanto que, em condições de déficit hídrico foi superior 6,35°C (VIEIRA et al., 2014). Isso sugere que a transpiração favorece com o resfriamento das folhas, pois à medida que ela aumenta, reduz a temperatura da folha devido à dissipação de energia na forma de calor latente, tornando-a menor que a temperatura do ar (TRENTIN et al., 2011; SARAIVA et al., 2014).

A taxa fotossintética em plantas estressadas é comprometida com o fechamento estomático devido à redução no influxo de CO<sub>2</sub>. No entanto, esse comprometimento depende da intensidade e duração do estresse hídrico (SALES et al., 2012; ZIVCAK et al., 2013). As plantas sob condições de estresse moderado tendem a manter a fotossíntese relativamente constante, enquanto sob estresse hídrico severo a taxa fotossintética reduz acentuadamente (DIAS; BRÜGGEMANN, 2010; GONÇALVES et al., 2010). A redução na assimilação de CO<sub>2</sub> pode se dar apenas nas horas mais quentes do dia, no entanto, com a severidade do estresse ela se torna mais limitada, até mesmo antes de ocorrer diminuição do teor de água na folha (PIMENTEL, 2004; GUAN et al., 2015). Em plantas de milho sob déficit hídrico de dez dias, a fotossíntese reduziu tanto pela manhã quanto ao meio-dia, e com elevada redução do TRA. Enquanto em sorgo, nas mesmas condições de estresse, a fotossíntese não reduziu nas plantas estressadas pela manhã, apenas ao meio-dia, mantendo o TRA semelhante ao das plantas controle (HASAN et al., 2017).

A restrição da fotossíntese afetou no rendimento final de cana-de-açúcar, prejudicando o crescimento do colmo e o conteúdo de sólidos solúveis, devido à baixa assimilação de CO<sub>2</sub>. Isso proporcionou uma menor produção de fotoassimilados necessários para o crescimento da planta e acúmulo de massa seca (MACHADO et al., 2009). De maneira semelhante, em plantas jovens de cana-de-açúcar, a fotossíntese foi afetada pelo déficit hídrico com redução de 99,6% na cultivar sensível após quatro dias de estresse hídrico, quando comparadas às plantas controle, e de 97% na cultivar tolerante após oito dias de estresse, cujas reduções afetaram a produção de biomassa nas plantas estressadas (MEDEIROS et al., 2013). Essas observações também foram constatadas em milho, em que a redução na fotossíntese das plantas estressadas proporcionou a redução na produção de massa seca (HASAN et al., 2017).

Em cultivares de capim-elefante sob déficit hídrico, a fotossíntese reduziu dependendo da cultivar e da intensidade do estresse. Além disso, a cultivar que menos reduziu a taxa fotossintética, mais tolerante, foi a que se recuperou mais rápido após a reidratação (ARAÚJO et al., 2010). De maneira semelhante, em milho após 25 dias sob déficit hídrico a fotossíntese diminuiu com o prolongamento do estresse e, de forma mais intensa na cultivar sensível. Já a cultivar tolerante, com baixa redução da fotossíntese, teve maior crescimento das plantas, maior produção de grãos e melhor ganho de biomassa (ANJUM et al., 2016).

### 3.4.5 Pigmentos fotossintetizantes

Os pigmentos envolvidos na fotossíntese são as clorofilas *a* e *b*, e os carotenoides, responsáveis pela captação da energia luminosa para conversão em energia química (TAIZ; ZEIGER, 2013). A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a etapa fotoquímica da fotossíntese, enquanto que os carotenoides auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios (STREIT et al., 2005). Os carotenoides são pigmentos amarelos ou alaranjados, situados nas lamelas dos cloroplastos, em estreita associação com as clorofilas, o que permite a transferência de energia para as mesmas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Após a absorção dos fótons, as moléculas de clorofila modificam temporariamente suas configurações eletrônicas, passando do estado basal para o estado excitado, o qual possui nível de energia superior, sendo ainda muito instável e de vida curta. Sendo assim, após absorver os fótons, esses pigmentos podem dissipar o excesso de energia proveniente da luz por meio de quatro formas competitivas: (i) dissipação fotoquímica (utilizada na fotossíntese), (ii) fluorescência (re-emissão na forma de luz), (iii) conversão direta de energia (retorno da clorofila ao seu estado base sem ocorrer emissão de fótons) e (iv) dissipação não-fotoquímica (re-emissão na forma de calor) (MAXWELL; JOHNSON, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2013).

A energia química produzida pelas plantas, na forma de ATP e NADPH, com a liberação de O<sub>2</sub> aliado à fotossíntese é decorrente da eficiência de captação luminosa das clorofilas. Assim, as clorofilas estão relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas e, consequentemente com seu crescimento e adaptabilidade as diferentes condições ambientais (SILVA et al., 2011; 2014). A manutenção na síntese de clorofila em plantas sob déficit hídrico pode estar associada a uma melhor eficiência na absorção luminosa, melhorando assim, a produção de massa seca (SIDDIQUI et al., 2015; CHEN et al., 2016).

Em cana-de-açúcar há uma grande amplitude de resposta do teor de clorofila à deficiência hídrica. Em estudo com diferentes cultivares, o teor de clorofila reduziu

drasticamente nas cultivares mais sensíveis, indicando que a degradação desses pigmentos pode ser um critério na seleção de cultivares para tolerância à seca (SILVA et al., 2014; CHEN et al., 2016). De outra maneira, as cultivares tolerantes tiveram respostas semelhantes ou pouca redução em relação ao tratamento irrigado, ambos se correlacionando com a produtividade (SILVA et al., 2012). A diminuição do teor de clorofila sob estresse hídrico é considerado um sintoma típico de estresse oxidativo resultante da fotooxidação e degradação dos pigmentos (FAROOQ et al., 2009), expressivamente em cultivares sensíveis (CHEN et al., 2016).

Além de cana-de-açúcar, é bastante relatado o efeito negativo do déficit hídrico sobre os pigmentos fotossintéticos de diversas culturas (SIDDIQUI et al., 2015; CHEN et al., 2016). Em milho, os teores de clorofilas *a* e *b* tiveram alta redução, proporcional à intensidade do estresse hídrico (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014). A degradação das clorofilas em plantas sob condições de déficit hídrico também ocorreu em diferentes cultivares de trigo (NIKOLAEVA et al., 2010), feijão-fava (SIDDIQUI et al., 2015) e milho (CHEN et al., 2016). Essas reduções foram mais intensas nas cultivares sensíveis, o que assegura ser uma característica eficiente na seleção de cultivares na tolerância à seca.

O teor de carotenoides teve forte redução nas cultivares de cana-de-açúcar sensíveis ao déficit hídrico, enquanto as cultivares tolerantes mantiveram esses pigmentos (SILVA et al., 2014). O teor de carotenoides também teve pouca redução pelo estresse em cultivares tolerantes de milho (KHOLOVÁ et al., 2011), e espécies lenhosas (LIU et al., 2011). Os carotenoides têm papéis adicionais nos cloroplastos, como a absorção de luz e fotoproteção às clorofilas, auxiliando as plantas na tolerância às adversidades do estresse (JALEEL et al., 2009). Assim, é esperado que cultivares que mantêm maiores quantidades de carotenoides durante o estresse têm maior proteção contra a fotooxidação, enquanto a degradação desses pigmentos significa maiores danos às membranas celulares (SILVA et al., 2014).

A determinação do conteúdo de clorofila é, tradicionalmente, realizada pela extração de solutos foliares (avaliação destrutiva) e, posterior determinação espectrofotométrica (ARGENTA et al., 2001). Entretanto, pode ser analisado também pelo índice relativo de clorofila (índice SPAD) que permite diagnosticar a integridade do aparato fotossintético das plantas submetidas ao déficit hídrico (MAGALHÃES et al., 2009). O índice SPAD é determinado através de um medidor portátil SPAD-502 que permite leituras instantâneas de clorofila sem destruição do material vegetal, fazendo com que tal método seja caracterizado pela simplicidade e rapidez, além de, apresentar-se tão eficiente quanto o obtido por espectrofotometria (ARGENTA et al., 2001).

O índice de clorofila SPAD tem sido considerado um bom parâmetro em análises da integridade do aparato fotossintético em cana-de-açúcar sob deficiência hídrica. Dessa forma, pode ajudar nas interpretações avançadas do processo fotoquímico da cultura, sendo considerado eficiente na seleção de cultivares de cana-de-açúcar tolerantes ao déficit hídrico (SILVA et al., 2007; 2014). O índice SPAD também foi eficiente na seleção de cultivares de milho na tolerância ao déficit hídrico (MAGALHÃES et al., 2009).

#### **3.4.6 Fluorescência da clorofila**

A análise da fluorescência da clorofila vem sendo amplamente utilizada no entendimento dos mecanismos da fotossíntese alterados por estresses bióticos ou abióticos, pelos quais as plantas possam passar. Essa análise pode indicar até que ponto o PSII está usando a energia absorvida pela clorofila e a extensão na qual está sendo danificado por excesso de luz (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Em plantas sob condições de estresse hídrico, por exemplo, a eficiência fotossintética é reduzida, o que pode ser causado pela menor dissipação de energia por meio do transporte de elétrons ou pelo início dos processos de fotoinibição. No primeiro, ocorre um declínio na eficiência máxima fotoquímica do PSII, indicada pelo menor  $F_v/F_m$ , enquanto no segundo, também indicado pelo declínio de  $F_v/F_m$ , é devido à redução excessiva da cadeia de transporte de elétrons (ARAÚJO et al., 2010; SALES et al., 2013). Ainda, quando há a interrupção da entrada de  $CO_2$  no mesófilo pelo fechamento estomático, ocorre menor carboxilação e assim menor consumo dos produtos da atividade fotoquímica, NADPH e ATP. Esse mecanismo promove uma condição de excesso de pressão energética no aparato fotoquímico que pode levar à fotoinibição e diminuição da eficiência quântica do fotossistema II, como verificado em cana-de-açúcar sob déficit hídrico (SILVA et al., 2007; SALES et al., 2013). A fotoinibição ocorre quando a energia dos fótons excede a quantidade de energia usada pela fotossíntese, e sob estresse hídrico, geralmente, há aumento simultâneo da temperatura e irradiância aumentando potencialmente a quantidade de energia excessiva de fótons no PSII (ZHANG et al., 2016).

As principais características relacionadas às medições da fluorescência da clorofila são a fluorescência inicial ou mínima ( $F_o$ ) que é a fluorescência quando todos os centros de reação estão abertos e refere-se à emissão de fluorescência pelas moléculas de clorofila do complexo coletor de luz do PSII, a fluorescência máxima ( $F_m$ ) quando todos os centros de reação estão fechados indicando a completa redução da quinona A (QA) a partir da incidência de um pulso de luz no centro de reação, fluorescência variável ( $F_v$ ) determinada pelo estado do centro de reação (aberto ou fechado), e é definida como sendo a diferença entre  $F_m$  e  $F_o$

( $F_v = F_m - F_o$ ), representando o fluxo de elétrons do centro de reação do PSII (P680) até a plastoquinona (PQH<sub>2</sub>); e eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) que indica a integridade do aparato fotoquímico do PSII (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Além de  $F_v/F_m$ , outras características como  $F_v/F_o$ , *quenchings* fotoquímico ( $q_P$ ) e não-fotoquímico ( $q_N$ ), eficiência fotoquímica efetiva do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), taxa de transporte de elétrons (ETR) e excesso relativo de energia na parte fotoquímica (EXC) têm sido úteis para melhor compreensão do aparelho fotoquímico das plantas (LIU et al., 2012; SALES et al., 2013). Esse conjunto de caracteres é bastante utilizado para avaliar o desempenho fotossintético das plantas sob condições estressantes, podendo ser útil para discriminar cultivares de cana-de-açúcar ao déficit hídrico (SILVA et al., 2007; 2011; SALES et al., 2013).

Em duas cultivares de *Eragrostis curvula* sob déficit hídrico, observou-se que  $F_v/F_m$  e  $\Phi_{PSII}$  de ambas as cultivares diminuíram durante o estresse. Após 15 dias de seca, a cultivar mais tolerante apresentou  $F_v/F_m$  maior do que a cultivar sensível. No entanto, observou-se uma recuperação completa tanto de  $F_v/F_m$  quanto de  $\Phi_{PSII}$  nas duas cultivares quando reidratadas (COLOM; VAZZANA, 2003). A seleção de diferentes cultivares quanto a capacidade de tolerância e de recuperação à deficiência hídrica é eficientemente obtida por meio de parâmetros da fluorescência da clorofila (OUKARROUM et al., 2007).

Em cultivares de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica  $F_v/F_m$  reduziu 30% na cultivar mais sensível, chegando a se recuperar 7,5% apenas. Já na cultivar mais tolerante, a redução foi de 7,5% com o estresse, se recuperando completamente quando reidratada (SILVA et al., 2013). Isso sugere maior capacidade da cultivar tolerante em suportar as condições fotoinibitórias ocasionadas pela deficiência hídrica, pois apesar do dano ocasionado no aparato fotossintético durante o déficit hídrico, houve recuperação quando essas cultivares foram reidratadas.

A diminuição de  $F_v/F_m$  é um excelente indicador de fotoinibição quando as plantas estão submetidas a qualquer tipo de estresse, podendo representar uma regulação fotoprotetora reversível ou uma inativação irreversível do PSII, com valores que variam numa faixa de 0,75 a 0,85 em plantas sob condições ambientais adequadas (BAKER; ROSENQVIST, 2004; ARAÚJO et al., 2010). Em cultivares de cana-de-açúcar, a fotoproteção do aparelho fotossintético em resposta ao estresse foi associada a um eficiente mecanismo de dissipação de calor no PSII, indicada pela manutenção de  $F_v/F_m$  e  $\Phi_{PSII}$  (SALES et al., 2013).

Por sua vez,  $F_v/F_o$ , estima o rendimento primário máximo do PSII (PUTEH et al., 2013), podendo fornecer uma estimativa eficaz da capacidade fotossintética foliar. Essa razão tem sido bastante utilizada em diferentes culturas como sorgo (PEIXOTO et al., 2002), café (KONRAD et al., 2005) e cevada (KALAJI et al., 2011). A diminuição de  $F_v/F_o$  é um indicador de danos estruturais nos tilacóides afetando a eficiência fotoquímica, a assimilação de  $CO_2$  e o transporte de elétrons (PEIXOTO et al., 2002; KALAJI et al., 2011).

Em estudo com cultivares de arroz sob estresse hídrico,  $F_v/F_o$  diminuiu em todas as cultivares com o prolongamento do estresse, com reduções variando entre 36 e 65% (PUTEH et al., 2013). Reduções de  $F_v/F_o$  também foram observadas em cultivares de sorgo sob estresse com Alumínio (PEIXOTO et al., 2002). De maneira semelhante, Kalaji et al. (2011) observaram em cevada sob estresse salino, que  $F_v/F_o$  reduziu drasticamente na cultivar mais sensível, enquanto que ficou próximo ao controle na cultivar mais tolerante. Esses autores também observaram que a inibição das reações fotossintéticas devido ao estresse nas cultivares de cevada se assemelhou às mudanças que ocorrem sob fotoinibição, em que na cultivar mais sensível houve menor transporte de elétrons, além de muitos centros de reação inativos. Foi sugerido que a inativação dos centros de reação estava associada ao aumento de dissipação da luz absorvida como calor. Geralmente, a dissipação luminosa na forma de calor, representada pelo  $q_N$ , aumenta em plantas sob condições de déficit hídrico (ZIVCAK et al., 2013).

As plantas sob estresse hídrico reduzem o *quenching* fotoquímico da fluorescência da clorofila, eficiência fotoquímica do fotossistema II, taxa de transporte de elétrons e aumentam a dissipação de calor em comparação com plantas não estressadas (GUAN et al., 2015; ABID et al., 2016). A capacidade de assimilação, transferência e uso de energia luminosa foi diminuída sob estresse de seca em milho (LIU et al., 2012). Essa condição também pode ocorrer em cana-de-açúcar, e ainda variar entre cultivares.

Em cultivares de milho os pontos de compensação e de saturação à luminosidade foram menores em plantas sob déficit hídrico do que os de plantas controle. Essa situação foi mais evidente na cultivar sensível que na mais tolerante à seca (LIU et al., 2012). Esses autores ainda constataram que o aumento do déficit hídrico e da irradiação, proporcionou um declínio constante de  $\Phi_{PSII}$ ,  $q_P$ , e um claro aumento do  $q_N$ .

O aumento do fluxo de fótons promove declínio de  $q_P$  e aumento de  $q_N$ . O decréscimo do  $q_P$  reflete o estado reduzido do primeiro acceptor de elétrons estável do PSII, a QA, fornecendo uma estimativa da capacidade do PSII em utilizar a energia luminosa para redução do  $NADP^+$ , indispensável à assimilação fotossintética do carbono (MAXWELL; JOHNSON,

2000). Quando ocorrem danos nas estruturas dos fotossistemas que estão diretamente ligados ao processo fotoquímico, é perceptível a redução do  $qP$  decorrente de danos no centro de reação do PSII (CAMPOSTRINI, 2001). Dessa forma,  $qP$  quantifica a capacidade fotoquímica do PSII, e corresponde à fração de centros de reação do PSII abertos (LIU et al., 2012). Enquanto isso, o  $qN$  indica a dissipação de calor, em razão do aumento no gradiente de prótons entre o lúmen e o estroma dos cloroplastos (MAXWELL; JOHNSON, 2000). O aumento do  $qN$  resulta na diminuição da excitação nos centros de reação do PSII impedindo que os aceptores de elétrons tornem-se reduzidos, visto que a manutenção dos aceptores quinona parcialmente oxidados pode ser considerada essencial para a tolerância das plantas ao déficit hídrico (BAKER; ROSENQVIST, 2004).

O aumento da intensidade de luz de baixa a moderada em plantas de trigo diminuiu gradativamente  $\Phi_{PSII}$ , e aumentou o  $qN$ , sobretudo com o aumento da luz e na condição mais severa de estresse (ZIVCAK et al., 2013). Em cana-de-açúcar a intensidade do estresse hídrico também promoveu o aumento do  $qN$ , que se correlacionou negativamente com os pigmentos fotossintetizantes e com as trocas gasosas (CHA-UM; KIRDMANEE, 2009). Em feijão-fava, o déficit hídrico também aumentou o  $qN$  nas plantas estressadas, além de reduzir a taxa de transporte de elétrons (ABID et al., 2016).

A ETR está diretamente relacionada à variação de intensidade da luz, que tende a aumentar quanto maior a luminosidade, até que ocorra a saturação dos carreadores de elétrons. Em alguns casos, a curva de ETR pode estar correlacionada à taxa fotossintética, apresentando o mesmo padrão da curva de assimilação de  $CO_2$  (ZIVCAK et al., 2013). A eficiência na utilização da luminosidade em cultivares de milho foi maior sob baixa irradiância, diminuindo a partir do aumento da intensidade luminosa, tanto em plantas irrigadas quanto sob déficit hídrico. No entanto, nas plantas estressadas a eficiência foi sempre menor, principalmente na cultivar mais sensível, o que pode se correlacionar a uma menor taxa de transporte de elétrons (LIU et al., 2012).

A fração de luz absorvida que não vai para o transporte de elétrons e não é dissipada na forma de calor, é definida como o excesso relativo de energia, EXC (DEMMIG ADAMS; ADAMS 1996). Em cultivares de cana-de-açúcar foi observado que o EXC aumentou sob déficit hídrico em 1,5 vezes na cultivar tolerante, e 2,4 vezes na cultivar sensível em relação às plantas controles (SALES et al., 2015). Esse excesso de energia pode estar relacionado ao fechamento dos centros de reação do PSII e regulação na taxa de transporte de elétrons (SILVA et al., 2015). De fato, a redução do transporte de elétrons aumentou o excesso de energia no PSII e a fotoinibição (KOYRO et al., 2013).

### 3.4.7 Ajustamento osmótico e osmoprotetores

A habilidade de algumas espécies ou cultivares de ajustar osmoticamente suas células em condições de déficit hídrico indica a capacidade destes organismos em aumentar a tolerância a períodos de escassez hídrica, atuando, portanto, como uma resposta bioquímica-fisiológica capaz de suportar maior período de estresse (ZHANG et al., 2014; ANJUM et al., 2017).

As plantas precisam manter seu potencial hídrico interno abaixo daquele verificado no solo para a absorção de água, manutenção da turgescência e crescimento. Para isso, requerem uma redução no seu potencial osmótico-hídrico quer seja através da absorção de íons do solo ou pela síntese e acúmulo de solutos orgânicos compatíveis, os osmoprotetores (ASHRAF; FOOLAD, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2013; DAWOOD, 2016).

Osmoprotetores são compostos ou osmólitos de baixo peso molecular e altamente solúveis. Estes compostos são confinados principalmente no citosol, cloroplastos e outros compartimentos citoplasmáticos protegendo os componentes celulares de lesões de desidratação durante o estresse osmótico, por isso, são comumente referidos como osmoprotetores ou osmorreguladores (DAWOOD, 2016). Dentre esses, tem sido bastante investigado os osmoprotetores prolina e glicina betaína, em plantas submetidas a condições de deficiência hídrica (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014; SIDDIQUI et al., 2015; ANJUM et al., 2017). Esses solutos atuam aumentando o ajustamento osmótico para manter a hidratação celular, uma vez que o crescimento celular é concebido principalmente pelo turgor (ASHRAF; FOOLAD 2007; FAROOQ et al., 2009). Além do ajuste osmótico, estes osmólitos também podem ser importantes para proteger as células contra o aumento da acumulação de EROs, sob condições de estresse (MILLER et al., 2010; ANJUM et al., 2016).

#### 3.4.7.1 Prolina

Nas plantas, a prolina é produzida a partir do glutamato via P5C ( $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato) em reações catalisadas por duas enzimas, P5CS ( $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase) e P5CR ( $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato redutase), maior em plantas sob estresse (YOSHIBA et al., 1997). Durante a síntese, torna-se possível manter a razão NADP<sup>+</sup>/NADPH mais estável, sendo uma forma de auxiliar na restauração do aceptor final da cadeia transportadora de elétrons. Assim, a síntese de prolina pode desencadear proteção contra a fotoinibição sob condições adversas, já que no estresse, em muitos casos, há inibição da fotofosforilação. Esta é uma forma de regulação do potencial redox nas células (HARE;

CRESS, 1997). Já, a degradação de prolina é catalisada pela enzima prolina desidrogenase (ProDH) convertendo-a em  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C) que é, então, oxidada a glutamato pela enzima P5C desidrogenase (P5CDH) (YOSHIBA et al., 1997).

A prolina é um osmoprotetor que, frequentemente, ocorre em plantas superiores podendo ser acumulado em elevadas concentrações, em resposta ao déficit hídrico (QUEIROZ et al., 2008; AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014). Sendo assim, pode ser apontado como um agente de proteção contra a deficiência de água, uma vez que esse aminoácido atua como promotor da redução do potencial hídrico dos tecidos, retendo a água e mantendo a integridade desses (KAVI KISHOR et al., 2005; RHEIN et al., 2011). Inicialmente com o estresse, o teor de prolina é alterado podendo aumentar à medida que se prolonga o déficit hídrico (SIDDIQUI et al., 2015; ANJUM et al., 2016). Esse soluto orgânico apresenta efeitos protetores nas plantas sob déficit hídrico a partir da síntese e da degradação, ocorrendo uma diminuição em plantas reidratadas (YOSHIBA et al., 1997).

Além de cana-de-açúcar (RHEIN et al., 2011; ABBAS et al., 2014), tem se observado o acúmulo de prolina em grande número de outras espécies vegetais expostas ao déficit hídrico, como arroz (LUM et al., 2014), milho (ANJUM et al., 2016; 2017), milheto (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014), feijão-fava (ABID et al., 2016), e espécies silvestres (LIU et al., 2011).

Em cana-de-açúcar, o conteúdo de prolina aumentou com o prolongamento do estresse hídrico, constatando-se como uma molécula indicadora e protetora de plantas estressadas, já que o aumento de prolina ajudou as plantas a manter a turgescência celular (RHEIN et al., 2011). De maneira semelhante, Abbas et al. (2014) também observaram que plantas de cana-de-açúcar induzidas ao estresse hídrico aumentaram o conteúdo de prolina com a intensidade do estresse, variando entre as cultivares. O mesmo também ocorreu em milho (ANJUM et al., 2016; 2017), feijão-fava (SIDDIQUI et al., 2015) e girassol (CANAVAR et al., 2014), em que o conteúdo de prolina aumentou diferentemente entre as cultivares quando submetidas ao déficit hídrico, sendo superior nas cultivares mais tolerantes. Isso demonstra que pode haver variabilidade como indicativo de tolerância entre diferentes cultivares da mesma espécie (LUM et al., 2014; SIDDIQUI et al., 2015; ANJUM et al., 2017). Portanto, o acúmulo de prolina em cultivares de cana-de-açúcar sob déficit hídrico, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de tolerância à seca.

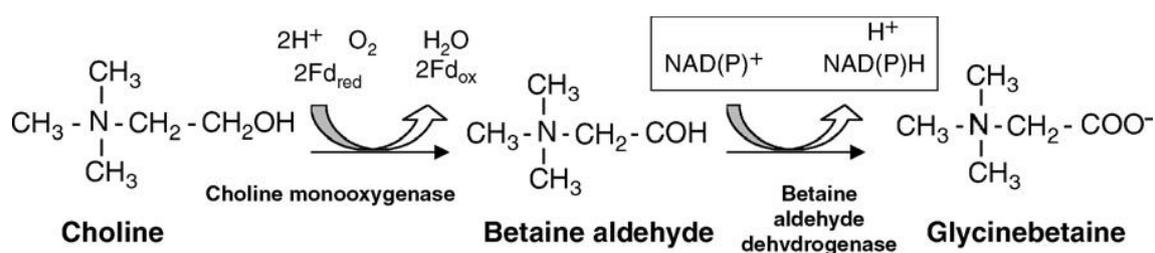
### 3.4.7.2 Glicina betaína

Glicina betaína (GB) é o composto de amônio quaternário mais bem conhecido em plantas superiores, induzido e sintetizado (Figura 2) endogenamente nos cloroplastos em resposta a vários estresses abióticos, entre eles o hídrico, sendo que em muitas culturas a sua concentração se correlaciona com o nível de tolerância ao estresse (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014; ABBAS et al., 2014; DAWOOD et al., 2016).

A glicina betaína é produzida nas plantas na tentativa de controlar, dentro de certo limite, os efeitos negativos nas células como a perda de água. Esse osmoprotetor é conhecido pela sua função de regulador osmótico, aumentando a capacidade das células em reter água sob condições de estresse, sem causar prejuízos às plantas (ANJUM et al., 2011; ZHANG et al., 2014). Desta forma, é apontado como eficaz em plantas expostas a déficit hídrico, pois desempenha papel significativo na proteção das estruturas celulares com o ajustamento osmótico (ASHRAF; FOOLAD 2007).

Em diferentes cultivares de cana-de-açúcar induzidas ao estresse hídrico, a concentração de glicina betaína aumentou de acordo com a intensidade do estresse nas cultivares mais tolerantes à seca (ABBAS et al., 2014). Em outras culturas, como milho, foi observado que a glicina betaína aumentou gradativamente com a intensidade do estresse hídrico. Além disso, o acúmulo deste osmoprotetor foi superior nas folhas que nas raízes, sugerindo seu envolvimento na melhoria das trocas gasosas (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014). Em diferentes cultivares de trigo houve aumento no conteúdo de glicina betaína tanto nas folhas, quanto nas raízes em todos os estádios fenológicos das plantas. No entanto, o acúmulo foi mais proeminente nas folhas da cultivar mais tolerante à seca (HUSEYNOVA et al., 2016). O acúmulo de glicina betaína também aumentou em cultivares mais tolerantes à seca, em milho (ANJUM et al., 2017) e arroz (FAROOQ et al., 2008).

**Figura 2.** Via biosintética da glicina betaína (ASHRAF; FOOLAD, 2007).



### 3.4.7.3 Aplicação exógena de glicina betaína nas plantas

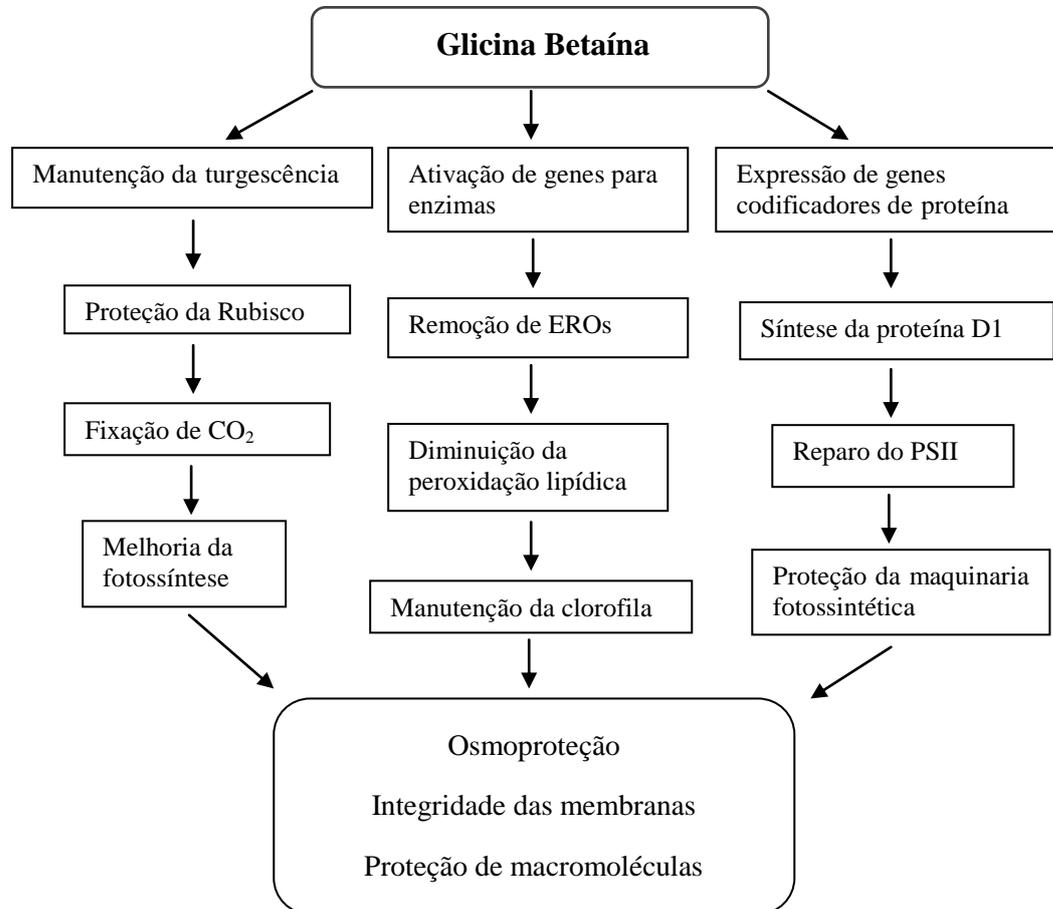
A glicina betaína vem sendo investigada como um atenuador dos efeitos negativos do déficit hídrico sobre as culturas agrícolas, como em milho (ANJUM et al., 2011; ZHANG et al., 2014), girassol (IQBAL et al., 2008), trigo (MA et al., 2006) e arroz (FAROOQ et al., 2008; CHA-UM et al., 2013), a qual tem promovido inúmeros benefícios a essas plantas (Figura 3). Entretanto, não há relatos na cultura da cana-de-açúcar. Todavia, existem resultados de que essa cultura responde satisfatoriamente à aplicação exógena de atenuantes ao déficit hídrico, como constatado com prolina (MEDEIROS et al., 2015) e neonicotinóides (ENDRES et al., 2016). Sendo assim, a aplicação foliar de glicina betaína pode ser um bom atenuante às adversidades causadas pelo déficit hídrico em cana-de-açúcar.

A aplicação foliar de GB em milho sob estresse hídrico moderado e severo, melhorou o crescimento das plantas e o teor relativo de água, sobretudo sob estresse severo. Além disso, contribuiu com o aumento de prolina, glicina betaína endógena, SOD e CAT em ambos os tipos de estresse, de modo que a peroxidação lipídica foi reduzida (ZHANG et al., 2014). Já em plantas de girassol sob estresse hídrico, a aplicação foliar de GB aliviou os danos da seca, enquanto a aplicação nas sementes não teve nenhum efeito. Nessas plantas, a GB foliar aumentou o potencial hídrico e de turgor da folha nas plantas estressadas, tanto na fase vegetativa quanto reprodutiva, em relação às plantas controle. Esses efeitos levaram ao aumento no rendimento de aquênios quando a GB foi aplicada no início do déficit hídrico, nos estádios de crescimento vegetativo ou reprodutivo (IQBAL et al., 2008).

A GB exógena na folha também aumentou a atividade de enzimas antioxidantes, a síntese de osmoprotetores, além de manter o conteúdo de água nas folhas e a integridade de membranas em plantas de arroz sob déficit hídrico (FAROOQ et al., 2008). Efeitos semelhantes, foram encontrados em plantas de trigo sob déficit hídrico. Essas plantas, quando estressadas, a aplicação de GB melhorou a capacidade fotossintética, protegendo a maquinaria fotoquímica de EROs, e mantendo o conteúdo de RuBP, ribulose-bifosfato (MA et al., 2006). A GB exógena também ajudou plantas de milho a suportarem melhor a seca, mantendo o conteúdo de clorofilas e de carotenóides, e aumentando a eficiência no uso da água, fazendo com que a produção de biomassa fosse mantida (ANJUM et al., 2011).

A eficiência relatada com o uso de GB exógena pode ser atribuída à atuação da GB que pode penetrar rapidamente através da superfície foliar e ser transportada para outros órgãos da planta, contribuindo, portanto, na melhoria da tolerância ao estresse (ANJUM et al., 2011; OSMAN, 2015).

**Figura 3.** Esquema simplificado dos mecanismos e papéis protetores, diretos e indiretos da glicina betaína exógena em plantas cultivadas.



### 3.5 Estresse oxidativo: estresse secundário

Diversos tipos de estresse abiótico geram um estresse secundário, o estresse oxidativo, o qual é resultante do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são constantemente produzidas nas plantas como subprodutos da respiração e fotossíntese, no entanto, em condições normais de desenvolvimento as plantas produzem estas espécies, mas as mantêm em pequenas concentrações (SHARMA et al., 2012). Enquanto, condições de estresses como hídrico, salino, excesso de calor e luz promovem um incremento na produção de EROs decorrentes da reação de Mehler e excitação dos pigmentos antena dos cloroplastos (MITTLER, 2002; MILLER et al., 2010).

Os principais pontos de produção das EROs são os cloroplastos e as mitocôndrias, pois são organelas com alta atividade de oxidação metabólica ou com intenso fluxo de elétrons. Nos

cloroplastos, a formação de EROs está relacionada com eventos da fotossíntese. Na mitocôndria, de 1 a 5% de  $O_2$  consumido em condições de escuro, pode estar responsável pela produção de EROs. A fotorrespiração nos peroxissomos é outra forma de produção de  $H_2O_2$  (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012).

Nos cloroplastos, a oxidação da água no PSII ocorre no complexo de produção de oxigênio, onde a liberação de uma molécula de  $O_2$  requer a oxidação de duas moléculas de água e a remoção de quatro elétrons (TAIZ; ZEIGER, 2013). A energia luminosa excita a molécula de clorofila resultando em alta energia de excitação, podendo reagir com o oxigênio e formar EROs. Os pigmentos excitados doam energia ao  $O_2$ , produzindo o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (MILLER et al., 2010; SHARMA et al., 2012).

Na respiração mitocondrial, a redução de quatro elétrons produz em condição normal uma molécula de água pela enzima do complexo IV citocromo oxidase. Entretanto, na reação acidental de um elétron com outros componentes do transporte de elétrons tem-se a formação de EROs (SHARMA et al., 2012; TAIZ; ZEIGER, 2013). Além disso, a limitação da fixação de  $CO_2$  resultante de algum estresse, como o déficit hídrico, também contribui com o acúmulo de EROs, e é potencialmente prejudicial às células, pois causa a fotoinibição, com excessiva redução na cadeia transportadora de elétrons, além de outros efeitos deletérios como a supressão de genes e morte celular (LI et al., 2016).

### 3.5.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são formas parcialmente reduzidas do oxigênio atmosférico ( $O_2$ ), que podem promover a oxidação de vários componentes celulares, levando à destruição oxidativa de células em um fenômeno denominado estresse oxidativo (CARVALHO, 2008; GILL; TUTEJA, 2010). A excitação das clorofilas atingem o estado triplet ( $3Chl^*$ ) e quando essa energia não é dissipada, há formação de oxigênio singleto ( $^1O_2^*$ ) pela reação da  $3Chl^*$  com o oxigênio molecular. O  $^1O_2^*$  pode causar efeitos deletérios nas células, e biologicamente, tem sido apontada como uma das EROs mais tóxica para as células. Como consequência, o PSII torna-se muito excitado e é inativado (fotoinibição dinâmica) havendo formação de radicais hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o que promove a peroxidação de lipídeos (SCANDALIOS, 2005).

O radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é a primeira espécie reativa produzida através da redução de  $O_2$  durante o transporte de elétrons na via fotossintética nos cloroplastos, em que o PSI e PSII são os principais locais para sua produção, enquanto nas mitocôndrias, o complexo I, ubiquinona e

complexo III da cadeia transportadora de elétrons (CTE) são os principais locais da produção (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012).

O radical hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) é dependente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e, portanto, sua formação está sujeita a inibição tanto por superóxido dismutase (SOD) quanto por catalase (CAT) (SHARMA et al., 2012). Essa ERO é a mais reativa entre todas, com grande potencial oxidativo atacando macromoléculas e levando a danos celulares, como a peroxidação lipídica (BOWLER et al., 1992; SCANDALIOS, 2005).

As EROs são bem reconhecidas por desempenhar um duplo papel como espécies deletérias e benéficas, dependendo da sua concentração nas plantas. Em concentrações elevadas, as EROs causam danos às biomoléculas, enquanto que em concentrações de baixa a moderada podem atuar como mensageiros secundários em cascatas de sinalização intracelular que medeiam várias respostas em células vegetais (MILLER et al., 2010; SHARMA et al., 2012). Por exemplo, a atuação de peróxido de hidrogênio exógeno em cana-de-açúcar foi atribuída ao papel de mensageiro secundário nas células (SILVA et al., 2015). No entanto, em alta concentração pode atuar negativamente (CIA et al., 2012; BOARETTO).

### 3.5.1.1 Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é gerado nas mitocôndrias, cloroplastos e citosol a partir da dismutação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , podendo ocorrer espontaneamente ou ser catalisado pela enzima SOD que leva à formação de  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Além disso, a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos também gera  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Na membrana plasmática, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é formado pela ação da NADPHoxidase e, na matriz extracelular, várias enzimas também são fonte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (MILLER et al., 2010; SHARMA et al., 2012).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um composto estável com meia vida relativamente longa, e que pode causar inativação de enzimas (GILL; TUTEJA, 2010). Entretanto, é pouco reativo quando comparado a outras EROs (GRATÃO et al., 2005). Nas plantas C4, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é gerado nos cloroplastos, prejudicial às organelas e membranas celulares (SILVA et al., 2015). O efeito prejudicial pode ser devido ao seu tempo de vida, bem como por sua alta permeabilidade pelas membranas (SILVA et al., 2015). No entanto, esse efeito depende da concentração, além da atuação de enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidase e catalase (CIA et al., 2012; BOARETTO et al., 2014; SALES et al., 2015). Como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um oxidante forte, ele pode iniciar um dano oxidativo localizado nas células da folha, levando a interrupção da função metabólica e perda de integridade celular, resultando em senescência. O papel do  $\text{H}_2\text{O}_2$  como causador de danos em plantas sob estresse é conhecido há muito tempo, no entanto,

agora também é aceito como um componente integral ou mensageiro secundário das cascatas de sinalização celular (MITTLER, 2002; SILVA et al., 2015).

O estudo deste composto tem permitido o acesso a uma gama de informações para se entender o estresse oxidativo (CIA et al., 2012; SILVA et al., 2015). Sabe-se que, o  $H_2O_2$  apresenta dois papéis principais, em baixas concentrações tem função de sinalizador, podendo levar a aclimatação e tolerância à determinada condição de estresse, e em altas concentrações pode levar à morte celular programada (GILL; TUTEJA, 2010). Quando um alto conteúdo de  $H_2O_2$  é produzido sob condições de estresse por seca, é necessária uma resposta rápida do sistema antioxidante para que o  $H_2O_2$  funcione como um mensageiro secundário efetivo (CARVALHO, 2008; SILVA et al., 2015). Por exemplo, o aumento na atividade de SOD foliar e radicular, fez com que a cultivar mais tolerante de cana-de-açúcar suportasse a alta concentração exógena de  $H_2O_2$  (SILVA et al., 2015).

O aumento na concentração de  $H_2O_2$ , geralmente, tem sido associado à intensidade do déficit hídrico, como em cana-de-açúcar (CIA et al., 2012; BOARETTO et al., 2014), feijão-fava (SIDDIQUI et al., 2015), milho (CHEN et al., 2016; ANJUM et al., 2017) e trigo (CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012). Nesses estudos, o agravamento do estresse hídrico promoveu o aumento de  $H_2O_2$ , e de forma mais intensa nas cultivares mais sensíveis à seca, indicando-o como danoso ao metabolismo celular.

Em diferentes cultivares de trigo e milho, o conteúdo de  $H_2O_2$  aumentou em todas as cultivares sob condições de déficit hídrico. No entanto, esse aumento foi maior nas cultivares mais sensíveis, e principalmente com o agravamento do estresse (CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012; ANJUM et al., 2017). De maneira semelhante, em cana-de-açúcar a cultivar mais sensível à seca teve maior acúmulo de  $H_2O_2$  sob déficit hídrico (CIA et al., 2012). No entanto, esses autores constataram que na indução inicial do déficit hídrico houve acúmulo de peróxido de hidrogênio em todas as cultivares, independente da tolerância.

### **3.5.2 Peroxidação lipídica por acúmulo de malondialdeído (MDA)**

A oxidação lipídica origina diversos produtos secundários que agravam o dano oxidativo, entre eles o malondialdeído (MDA), que é o principal e mais estudado produto da peroxidação lipídica. Portanto, o MDA tem funcionado como um eficiente marcador molecular para designar a peroxidação lipídica em células de plantas submetidas a diferentes estresses abióticos, a citar o estresse hídrico (CARVALHO, 2008; GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012).

Os produtos da peroxidação lipídica são altamente reativos, podendo se ligar a biomoléculas como DNA e proteínas danificando-os irreversivelmente, causando prejuízos nas funcionalidades das células, tanto dentro quanto fora delas (SHARMA et al., 2012). Os principais danos da peroxidação lipídica são a diminuição da fluidez das membranas, a facilidade na troca de fosfolípidos entre as duas bicamadas, o aumento do extravasamento das membranas para substâncias que normalmente não o atravessam e, danos a proteínas de membranas inativando receptores, enzimas e canais iônicos (GILL; TUTEJA, 2010).

Nesse sentido, a peroxidação lipídica tem sido amplamente utilizada como um indicador de danos às membranas celulares em plantas sob déficit hídrico. Esses danos são caracterizados pela ação de EROs em ácidos graxos poli-insaturados das membranas, o que pode afetar seriamente a integridade e a funcionalidade das células, além de provocar outros danos irreversíveis (GRATÃO et al., 2005). No entanto, quando há baixa produção de MDA em plantas estressadas não implica que o aumento da formação de EROs não esteja ocorrendo, mas que provavelmente é resultado do aumento concomitante das defesas antioxidantes celulares, promovido pela atividade enzimática (CARVALHO, 2008; CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012; ANJUM et al., 2017). Esse mecanismo é relatado em plantas mais tolerantes ao déficit hídrico (BOARETTO et al., 2014; SALES et al., 2015). De outra maneira, plantas com alta produção de MDA são mais sensíveis e, portanto, sofrem maiores danos pelos efeitos da seca (ANJUM et al., 2017).

Em diferentes cultivares de cana-de-açúcar, o prolongamento do déficit hídrico promoveu o aumento de MDA, mais notoriamente nas cultivares sensíveis que nas tolerantes ao déficit hídrico (CIA et al., 2012; ABBAS et al., 2014; SALES et al., 2015). O mesmo ocorreu em diferentes cultivares de feijão-fava (SIDDIQUI et al., 2015), trigo (NIKOLAEVA et al., 2010), milho (CHEN et al., 2016; ANJUM et al., 2016, 2017), além de espécies silvestres (LIU et al., 2011). Essas situações configuraram uma maior peroxidação lipídica nas cultivares mais sensíveis, apontando ser um importante indicador na seleção de cultivares na tolerância à seca, em conjunto com a ação de enzimas antioxidantes.

### **3.5.3 Sistema antioxidante**

As plantas sob condições normais produzem EROs em um nível baixo que possibilita o equilíbrio adequado entre a produção e extinção. Entretanto, eventualmente são expostas a diferentes estresses, como hídrico, luminoso, térmico e salino. Esses estresses, podem promover certas alterações fisiológicas levando ao aumento na geração de EROs e danos celulares se não houver mecanismos de proteção capazes de dissipar a energia excessiva e

reduzir os compostos da cadeia transportadora de elétrons (SALES et al., 2013). Um mecanismo que tem se mostrado bastante eficiente na limpeza de EROs é a atividade das enzimas antioxidantes (SHARMA et al., 2012; BOARETTO et al., 2014; SALES et al., 2015; ANJUM et al., 2016; 2017).

As plantas possuem um complexo sistema antioxidativo constituído por enzimas capazes de prevenir o acúmulo de EROs e o estresse oxidativo (CARVALHO, 2008; BOARETTO et al., 2014; SIDDIQUI et al., 2015; ANJUM et al., 2017). As enzimas do sistema antioxidante são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico servindo como sinalizadores e aliviadores desse, destacando-se: a ascorbato peroxidase, catalase e superóxido dismutase (CIA et al., 2012; ANJUM et al., 2016; 2017). Essas enzimas operam em diferentes compartimentos celulares e respondem em conjunto quando as células estão expostas ao estresse oxidativo, desempenhando um papel importante na limpeza de EROs em plantas sob déficit hídrico (SHARMA et al., 2012).

Nesse contexto, a atividade de enzimas antioxidantes está altamente ligada ao nível de dano oxidativo induzido por EROs nas células, e essa relação entre antioxidantes e produção de EROs é que determina a tolerância ou susceptibilidade de uma cultivar ao estresse hídrico (MITTLER, 2002). Assim sendo, o aumento da atividade enzimática em plantas sob déficit hídrico tem sinalizado maior tolerância à seca.

### **3.5.3.1 Enzima superóxido dismutase (SOD)**

A SOD é a primeira linha de defesa contra EROs nas células vegetais, onde realizam a dismutação de  $O_2^{\cdot-}$  para  $O_2$  e  $H_2O_2$ . Assim sendo, controla a concentração de  $O_2^{\cdot-}$  e, portanto, desempenha papel fundamental no mecanismo de defesa ao prevenir a formação do radical  $OH^{\cdot}$  (BOWLER et al., 1992). Os íons superóxido são sintetizados em qualquer compartimento celular onde há transporte de elétrons, portanto, a SOD está presente em todos os compartimentos celulares sensíveis ao estresse oxidativo (MITTLER, 2002; SHARMA et al., 2012). Como o  $O_2^{\cdot-}$  pode ser produzido em qualquer local onde esteja presente uma cadeia de transporte de elétrons, e como as membranas fosfolipídicas são impermeáveis ao  $O_2^{\cdot-}$ , é muito importante que a SOD esteja no local onde ele é formado (ALSCHER et al., 2002).

A SOD pertence ao grupo de metaloenzimas e está presente nas plantas de três formas: isoenzimas de SOD de cobre/zinco SOD (Cu/Zn-SOD), manganês SOD (Mn-SOD) e ferro SOD (Fe-SOD) (SHARMA et al., 2012). O número de isoenzimas de cada tipo de SOD varia muito de uma planta para outra, assim como a abundância relativa de cada enzima (BOWLER et al., 1992). Todas as formas de SOD são codificadas por genes nucleares e direcionadas para

seus respectivos compartimentos subcelulares. A MnSOD está localizada nas mitocôndrias, enquanto a Fe-SOD está localizada nos cloroplastos. Já, a Cu/Zn-SOD está presente em três isoformas, que são encontradas no citosol, cloroplasto, peroxissoma e mitocôndria (BOWLER et al., 1992; SCANDALIOS, 2005).

O aumento da atividade de SOD tem sido relatado em diversas espécies de plantas expostas ao déficit hídrico (CIA et al., 2012; SIDDIQUI et al., 2015; ANJUM et al., 2016; 2017). Nessas condições, cultivares mais tolerantes apresentam um sistema de defesa mais desenvolvido que as sensíveis, através do qual a SOD desempenha um papel fundamental na desintoxicação de EROs (SHARMA et al., 2012; SALES et al., 2015).

Em diferentes cultivares de cana-de-açúcar, a atividade de SOD aumentou com o agravamento do estresse hídrico, principalmente na cultivar mais tolerante (BOARETTO et al., 2014; SALES et al., 2015). Da mesma maneira, a atividade de SOD aumentou mais na cultivar tolerante à seca, em milho (ANJUM et al., 2016), arroz (LUM et al., 2014), feijão-fava (SIDDIQUI et al., 2015; ABID et al., 2016), e trigo (CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012). Nessas plantas, a atividade de SOD foi caracterizada como um antioxidante eficiente na proteção dos danos oxidativos, causados tanto pela duração quanto pela intensidade do déficit hídrico (CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012; SIDDIQUI et al., 2015).

### **3.5.3.2 Enzima ascorbato peroxidase (APX)**

A APX é uma enzima localizada em todos os compartimentos celulares de produção de EROs, podendo funcionar como um regulador de  $H_2O_2$  em nível celular, convertendo-o em água (CARVALHO, 2008; SHARMA et al., 2012). Nos cloroplastos e mitocôndrias a APX atua no ciclo ascorbato-glutationa, no qual o  $H_2O_2$  formado pela ação da SOD é reduzido pelo agente dessa peroxidase, o ascorbato (MITTLER, 2002). Nos cloroplastos, a fotorredução do oxigênio à água pode gerar  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ , que são eliminados pela ação da SOD e da APX, respectivamente (ASADA, 2006). Ainda, a APX é considerada a enzima mais importante na eliminação do  $H_2O_2$  dos cloroplastos, por não existir catalase para exercer essa função no devido compartimento celular (MITTLER, 2002).

Além disso, a APX parece ser uma enzima mais efetiva que a catalase em relação ao estresse oxidativo. Contudo, essas enzimas conjuntas desempenham suas importantes funções a depender da gravidade do déficit hídrico, e conseqüentemente, de produção de EROs. Nessa ocasião, sob condição de estresse leve a moderado a remoção de  $H_2O_2$  é preferencialmente feita pelo agente redutor da APX, o ascorbato, enquanto que sob estresse severo a atividade da catalase é acionada (CARVALHO, 2008).

A atividade de APX foi maior em plantas mais tolerantes ao estresse hídrico, em diferentes culturas, como cana-de-açúcar (CIA et al., 2012; BOARETTO et al., 2014; Sales et al., 2015), milho (ANJUM et al., 2016; 2017) e trigo (NIKOLAEVA et al., 2010; CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012). A atividade de APX em plantas estressadas aumenta gradativamente com o prolongamento do estresse hídrico, no intuito de aliviar o estresse oxidativo (SALES et al., 2013; AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014). Em cultivares de trigo, após três dias sob déficit hídrico, a atividade de APX aumentou nas plantas estressadas, ajudando a diminuir a peroxidação de lipídeos (NIKOLAEVA et al., 2010). Em milho, a atividade de APX aumentou proporcionalmente à intensidade do estresse hídrico na cultivar mais tolerante, enquanto na cultivar sensível, a atividade de APX diminuiu (ANJUM et al., 2017). A atividade de APX também foi maior na cultivar tolerante e menor na cultivar sensível de cana-de-açúcar ao estresse hídrico (SALES et al., 2015) e salino (MEDEIROS et al., 2014). Dessa maneira, cultivares que aumentam a atividade de APX têm maior tolerância ao estresse hídrico.

### **3.5.3.3 Enzima catalase (CAT)**

A CAT é encontrada nos glioxissomas e, principalmente, nos peroxissomas. Esta enzima é responsável pela remoção do excesso de EROs durante o estresse, e atua na conversão do  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular, liberado durante a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos ou durante a fotorrespiração (MITTLER, 2002; GILL; TUTEJA, 2010). Diferente da APX, a CAT atua sem agente redutor, fornecendo às plantas uma forma energeticamente eficiente para remoção do  $H_2O_2$ , exceto nos cloroplastos (SHARMA et al., 2012). A atividade da CAT é efetiva, principalmente, em concentrações relativamente altas de  $H_2O_2$ , por isso são consideradas indispensáveis para a desintoxicação de EROs, especialmente em condições de estresse severo, quando os níveis de  $H_2O_2$  aumentam (CARVALHO, 2008; GILL; TUTEJA, 2010; ANJUM et al., 2016).

A atividade da CAT aumenta proporcionalmente com a intensidade da escassez de água, sobretudo nas folhas, auxiliando na remoção excessiva de peróxido de hidrogênio (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014). O aumento da CAT foi observado em cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico, de cana-de-açúcar (CIA et al., 2012; BOARETTO et al., 2014), arroz (LUM et al., 2014), milho (ANJUM et al., 2017) e feijão-fava (SIDDIQUI et al., 2015; ABID et al., 2016). Nessas espécies, a atividade de CAT foi responsável pelo alívio de EROs geradas pelo estresse hídrico. Entretanto, como a CAT é produzida nos peroxissomas, em plantas C4, como a cana-de-açúcar, a fotorrespiração é

mínima, e conseqüentemente a atividade dessa enzima é menor do que nas plantas C3 (CARMO-SILVA et al., 2008). Todavia, a atividade de CAT é essencial na desintoxicação celular em conjunto com outras enzimas, como APX e SOD (SHARMA et al., 2012; BOARETTO et al., 2014).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S. R., AHMAD S.D., SABIR S.M., SHAH A.H. Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation, antioxidante activity, glycine-betaine and proline contents. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 14, p. 233-243, 2014.

ABID, G., M'HAMDI, M., MINGEOT, D., AOUIDA, M., AROUA, I., MUHOVSKI, Y., SAAI, K., SOUISSI, F., MANNAI, K., JEBARA, M. Effect of drought stress on chlorophyll fluorescence, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in faba bean (*Vicia faba* L.). **Archives of Agronomy and Soil Science**, p. 1-15, 2016.

AJITHKUMAR, I. P., PANNEERSELVAM, R. ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* Roth under drought stress. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, p. 587-595, 2014.

ALMEIDA, A. C. S.; SOUZA, J. L.; TEODORO, I.; BARBOSA, G. V. S.; FILHO, G. M.; JÚNIOR, R. A. F. Desenvolvimento vegetativo e produção de variedades de cana-de-açúcar em relação à disponibilidade hídrica e unidades térmicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p.1441-1448, 2008.

ALSCHER, R.G., ERTURK, N., HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

ANGELOCCI, L. R. Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: introdução ao tratamento biofísico. Piracicaba: ESALQ/USP, 2002. 272 p.

ANJUM, S.A., FAROOQ, M., WANG, L.C., XUE, L.L., WANG, S.G., WANG, L., ZHANG, S., CHEN, M. Gas exchange and chlorophyll synthesis of maize cultivars are enhanced by exogenously-applied glycinebetaine under drought conditions. **Plant, Soil and Environment**, v. 57, p. 326-331, 2011.

- ANJUM, S.A., SALEEM, M. F., WANG, L., BILAL, M. F., SAEED, A. Protective role of glycinebetaine in maize against drought-induced lipid peroxidation by enhancing capacity of antioxidative system. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 4, p. 576-583, 2012.
- ANJUM, S. A., TANVEER, M., ASHRAF, U., HUSSAIN, S., SHAHZAD, B., KHAN, I., WANG, L. Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 17132-17141, 2016.
- ANJUM, S. A., ASHRAF, U., TANVEER, M., KHAN, I., HUSSAIN, S., SHAHZAD B., ZOHAIB, A., ABBAS, F., SALEEM, M. F., ALI, I., WANG, L. C. Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-12, 2017.
- ARAÚJO, S. A. C.; VASQUEZ, H. M.; CAMPOSTRINI, E.; TORRES NETTO, A.; DEMINICIS, B. B.; LIMA, E. S. Características fotossintéticas de genótipos de capim-elefante anão (*Pennisetum purpureum* Schum.) em estresse hídrico. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 1, p. 1-7, 2010.
- ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F.; BORTOLINI, C.G.; FORSTHOFER, E.L. & STRIEDER, M.L. Relação entre teor de clorofila extraível e leitura do clorofilômetro na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 1101-1106, 2001.
- ASADA K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v. 141, p. 391-396, 2006.
- ASHRAF, M., and M. R. FOOLAD. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.
- BAKER, N.R., ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1607-1621, 2004.
- BARBOSA, A. M.; GUIDORIZI, K. A.; CATUCHI, T. A.; MARQUES, T. A.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, G. M. Biomass and bioenergy partitioning of sugarcane plants under water deficit. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 1-8, 2015.
- BATES, L. S. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BERGONCI, J. I.; BERGAMASCHI, H.; BERLATO, M. A.; SANTOS, A. O. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 1531-1540, 2000.

BOARETTO L.F., CARVALHO G., BORGO, L., CRESTE, S., LANDELL, M. G. A., MAZZAFERA, P. AZEVEDO, R. A. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, p. 165-175, 2014.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 83-116, 1992.

CAMPOSTRINI, E. Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas. Rio de Janeiro: **UENF**, 2001. 34 p.

CANAVAR, O., GÖTZ, K., ELLMER, F., CHMIELEWSKI, F., KAYNAK, M. A. Determination of the relationship between water use efficiency, carbon isotope discrimination and proline in sunflower genotypes under drought stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 2, p. 232-242, 2014.

CARMO-SILVA A. E., POWERS S.J., KEYS A.J., ARRABAÇA M.C., PARRY, M.A.J. Photorespiration in C4 grasses remains slow under drought conditions. **Plant Cell Environment**, v. 31, p. 925-940, 2008.

CARVALHO M. H. C. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v.3, p. 156-165, 2008.

CATUNDA, M.G.; FREITAS, S.P.; OLIVEIRA, J.G.; SILVA, C.M.M. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comosus*). **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 115-121. 2005.

CHAKRABORTY U., PRADHAN, B. Oxidative stress in five wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) exposed to water stress and study of their antioxidant enzyme defense system, water stress responsive metabolites and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, p. 117-130, 2012.

CHA-UM, S., KIRDMANEE, C. Proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Plantlets in response to iso-osmotic salt and water-deficit stress. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, p. 51-58, 2009.

CHA-UM, S., SAMPHUMPHUANG, T., KIRDMANEE, C. Glycinebetaine alleviates water deficit stress in *indica* rice using proline accumulation, photosynthetic efficiencies, growth performances and yield attributes. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, p. 213-218, 2013.

CHEN, D.; WANG, S.; CAO B.; CAO, D.; LENG, G.; LI, H.; YIN, L.; SHAN, L.; DENG, X. Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-15, 2016.

CIA, M.C., GUIMARÃES, A.C.R., MEDICI, L.O., CHABREGAS, S.M., AZEVEDO, R.A. Antioxidant response to water deficit by drought-tolerant and sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, p. 313-324. 2012.

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

CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira. Cana, v. 4 - Safra 2017/18, n. 1 - Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-57, abril 2017.

DANTAS NETO, J.; FIGUEIRÊDO, J. L. C.; FARIAS, C. H. A. DE; AZEVEDO, H. M. DE; AZEVEDO, C. A. V. Resposta da cana-de-açúcar, primeira soca, a níveis de irrigação e adubação de cobertura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 283-288, 2006.

DAWOOD, M. G. Influence of osmoregulators on plant tolerance to water stress. **Scientia Agriculturae**, v. 13, p. 42-58, 2016.

DEMMING-ADAMS, B., ADAMS, W. W. Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. **Planta**, v. 198, p. 460-470, 1996.

DIAS, M. C.; BRÜGGEMANN, W. Limitations of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* under drought stress: gas exchange, chlorophyll fluorescence and Calvin cycle enzymes. **Photosynthetica**, v. 48, n. 1, p. 96-102, 2010.

ENDRES, L.; SILVA, J. V.; FERREIRA, V. M.; BARBOSA, G. D. S. Photosynthesis and water relations in Brazilian sugarcane. **Open Agriculture Journal**, v. 4, n. 3, p. 31-37, 2010.

FAROOQ M., BASRA S.M.A., WAHID A., CHEEMA Z.A., CHEEMA M.A., KHALIQ A. Physiological role of exogenously applied glycine betaine to improve drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, p. 325-333, 2008.

FAROOQ M., WAHID A., KOBAYASHI N., FUJITA D., BASRA S. M. A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, p. 185-212, 2009.

GAVA, G. J. C.; SILVA, M. A.; SILVA, R. C.; JERONIMO, E. M.; CRUZ, J. C. S.; KÖLLN, O. T. Produtividade de três cultivares de cana-de-açúcar sob manejos de sequeiro e irrigado por gotejamento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 250-255, 2012.

GILL, S. S.; TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GONÇALVES, E. R.; FERREIRA, V. M.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; BARBOSA, T. P.; DUARTE, W. G. 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.

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.

GUAN, X. K.; SONG, L.; WANG, T. C.; TURNER, N. C.; LI, F. M. Effect of Drought on the Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence and Yield of Six Different-Era Spring Wheat Cultivars. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 201, 253-266, 2015.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79-102, 1997.

HASAN, S.A.; RABEI, S.H.; NADA, R.M.; ABOGADALLAH, G.M. Water use efficiency in the drought-stressed sorghum and maize in relation to expression of aquaporin genes. **Biologia Plantarum**, v. 61, n. 1, p. 127-137, 2017.

HEERDEN, P. D. R. V.; DONALDSON, R. A.; WATT, D. A.; SINGELS, A. Biomass accumulation in sugarcane: unravelling the factors underpinning reduced growth phenomena. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 11, p. 2877-2887, 2010.

HUSEYNOVA, I. M.; RUSTAMOVA, S. M.; SULEYMANOV, S. Y.; ALIYEVA, D. R.; MAMMADOV, A. C.; ALIYEV, J. A. Drought-induced changes in photosynthetic apparatus and antioxidant components of wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties. **Photosynthesis Research**, v. 130, p. 215-223, 2016.

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.

IQBAL N.; ASHRAF M.; ASHRAF, M.Y. Glycinebetaine, an osmolyte of interest to improve water stress tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.): water relations and yield. **South African Journal of Botany**, v. 74, p. 274-281, 2008.

JALEEL C. A.; MANIVANNAN, P.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; AL-JUBURI, H. J.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 11, n.1, p. 100-105, 2009.

KALAJI, H. M.; GOVINDJEE, BOSA, K.; KOSCIELNIAK, J.; ZUK-GOŁASZEWSKA, K. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 64-72, 2011.

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

KONRAD, M. L. F.; SILVA, J. A. B.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v. 64, p. 339-347, 2005.

KOYRO, H.; HUSSAINA, T.; HUCHZERMEYER, B.; KHANA, M. A. Photosynthetic and growth responses of a perennial halophytic grass *Panicum turgidum* to increasing NaCl concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, v. 91, p. 22-29, 2013.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima. 2006, 531p.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, p. 275-294, 2002.

LI, C.; NONG, Q.; SOLANKI, M. K.; LIANG, Q.; XIE, J.; LIU, X.; LI, Y.; WANG, W.; YANG, L.; LI, Y. Differential expression profiles and pathways of genes in sugarcane leaf at elongation stage in response to drought stress. **Scientific Reports**, p. 1-10, 2016.

LIU, C.; LIU, Y.; GUO, K.; FAN, D.; GUOQING LI, G.; ZHENG, Y.; YU, L.; YANG, R. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 174-183, 2011.

LIU, M.; QI, H.; ZHANG, Z. P.; SONG, Z. W.; KOU, T. J.; ZHANG, W. J.; YU, J. L. Response of photosynthesis and chlorophyll fluorescence to drought stress in two maize cultivars. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, p. 4751-4760, 2012.

LUM, M. S.; HANAFI, M. M.; RAFII, Y. M.; AKMAR, A. S. N. Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 24, n. 5, p. 1487-1493, 2014.

MA Q.Q.; WANG W.; LI Y.H.; LI D.Q.; ZOU Q. Alleviation of photoinhibition in drought-stressed wheat (*Triticum aestivum*) by foliar-applied glycinebetaine. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 165-175, 2006.

MACHADO, R. S.; RIBEIRO, R. V. MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, D. F. S. P.; MACHADO, E. C.; LANDELL, M. G. A. Respostas biométricas e fisiológicas ao déficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1575-1582, 2009.

MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, T. C.; ALBUQUERQUE, P. E. P.; KARAM, D.; MAGALHÃES, M. M.; CANTÃO, F. R. O. Caracterização ecofisiológica de linhagens de milho submetidas à baixa disponibilidade hídrica durante o florescimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 8, n. 3, p. 223-232, 2009.

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

MAZUMDAR, R.K.; CHAKIDER, B.P.; MUKHERJEE, S.K. Selection and classification of mango root stocks in the nursery stage. **Acta Horticultural**, v. 24, p. 101-106, 1969.

- MEDEIROS, D. B.; SILVA, E. C.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; TEIXEIRA, M. M.; BUCKERIDGE, M. S. Physiological limitations in two sugarcane varieties under water suppression and after recovering. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 3, p. 213-222, 2013.
- MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, p. 453-467, 2010.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.
- MOZAMBANI, A. E.; PINTO, A. S.; SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, p. 11-18, 2006.
- NIKOLAEVA, M. K.; MAEVSKAYA, S. N.; SHUGAEV, A. G.; BUKHOV, N. G. Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 57, n. 1, p. 87-95, 2010.
- OUKARROUMA, A.; MADIDI, S. E.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 438-446, 2007.
- PEIXOTO, P. H. P.; DA MATTA, F. M.; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, p. 821-832, 2002.
- PIMENTEL, C. A relação da planta com a água. **Seropédica**: EDUR, 2004. 191 p.
- PINCELLI, R. P. Tolerância à deficiência hídrica em cultivares de cana-de-açúcar avaliada por meio de variáveis morfofisiológicas. 65f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu, 2010.
- PINCELLI, R. P.; SILVA, M. A. Alterações morfológicas foliares em cultivares de cana-de-açúcar em resposta à deficiência hídrica. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 4, p. 546-556, 2012.

PUTEH, A. B.; SARAGIH, A. A.; ISMAIL, M. R.; MONDAL, M. M. A. Chlorophyll fluorescence parameters of cultivated (*Oryza sativa* L. ssp. indica) and weedy rice (*Oryza sativa* L. var. nivara) genotypes under water stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7 n. 9, p. 1277-1283. 2013.

QUEIROZ, R. J. B.; SANTOS, D. M. M.; CARLIN, S. D.; MARIN, A.; BANZATTO, D. A.; CAZETTA, J. O. Osmoprotetores em cana-de-açúcar sob efeito da disponibilidade hídrica no solo. **Científica**, v. 36, n. 2, p. 107-115, 2008.

RHEIN, A. F. L.; SANTOS, D. M. M.; CARLIN, S. D. Atividade da enzima redutase do nitrato e teores de prolina livre em raízes de cana-de-açúcar sob os estresses hídrico e ácido no solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1345-1360, 2011.

SALES, C.R.G.; RIBEIRO, R.V.; MACHADO, D.F.S.P.; MACHADO, R.S.; DOVIS, V.L.; LAGÔA, A.M.M.A. Trocas gasosas e balanço de carboidratos em plantas de cana-de-açúcar sob condições de estresses radiculares. **Bragantia**, v. 71, p. 319-327, 2012.

SALES, C.R.G.; RIBEIRO, R.V.; SILVEIRA, J.A.G.; MACHADO, E. C.; MARTINS, M. O.; LAGÔA, A. M. M. A. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 326-336, 2013.

SALES, C.R.G.; MARCHIORI, P.E.R.; MACHADO, R.S.; FONTENELE, A.V.; MACHADO, E.C.; SILVEIRA, J.A.G.; RIBEIRO, R.V. Photosynthetic and antioxidant responses to drought during the sugarcane ripening. **Photosynthetica**, v. 53, n. 4, p. 547-554, 2015.

SANTOS, H. R. B. Abordagem multivariada de características fisiológicas foliares de cana-de-açúcar sob estresse hídrico. 71 p. **Doutorado** (Agronomia/Fisiologia vegetal) Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2015.

SARAIVA, G. F. R.; ANDRADE, R. S.; SOUZA, G. M. Termografia por infravermelho como ferramenta de diagnóstico precoce de estresse hídrico severo em soja. **Biosfera**, v. 1, p. 158-169, 2014.

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

SCARPARI, M.S.; BEAUCLAIR, E.G.F. Anatomia e botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A.C.M.; LANDELL, M.G.A. Cana-de-açúcar. **Campinas: Instituto Agrônomo**, 2008. p. 47-56.

SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. Atualização em produção de cana-de-açúcar. **Piracicaba: Livro Ceres**, p. 19-36, 2006.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, 1-26, 2012.

SHIGAKI, F.; BERTO, A.; LIMA, E.; ZONTA, E.; CEDDIA, M.B.; FREITAS, N. Influência do estresse hídrico nos parâmetros de crescimento, acúmulo de N e produtividade em diferentes variedades de cana-de-açúcar em Miracema, RJ. **Revista Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 24, n. 2, p. 18-25, 2004.

SIDDIQUI, M. H.; AL-KHAISHANY, M. Y.; AL-QUTAMI, M. A.; AL-WHAIBI, M. H.; GROVER, A., ALI, H. M.; AL-WAHIBI, M. S.; BUKHARI, N. A. Response of different genotypes of faba bean plant to drought stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 10214-10227, 2015.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 193-201, 2007.

SILVA, M. A.; SOARES, R. A. B.; LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P. Agronomic performance of sugarcane families in response to water stress. **Bragantia**, v. 67, p. 656-661, 2008.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SHARMA, V.; SILVA, J. A. G.; CAPUTO, M. M.; DAMAJ, M. B.; GUIMARÃES, E. R.; FERRO, M. I. T. Use of physiological parameters in screening drought tolerance in sugarcane genotypes. **Sugar Tech**, v. 13, p. 191-197, 2011.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; SANTOS, C. M.; SHARMA, V. Relationships between physiological traits and productivity of sugarcane in response to water deficit. **The Journal of Agricultural Science**, v. 152, n. 01, p. 104-118, 2012.

SILVA, M. A.; SANTOS, C. M.; ARANTES, M. T.; BRUNELLI, M. C.; HOLANDA, L. A. Respostas fisiológicas de cultivares de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica e a reidratação. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 3, p. 28-35, 2013.

SILVA, M. A.; SANTOS, C. M.; VITORINO, H. S.; RHEIN, A. F. L. Pigmentos fotossintéticos e índice SPAD como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 173-181, 2014.

SILVA, K. I.; SALES, C. R. G.; MARCHIORIA, P. E. H.; SILVEIRA, N. M.; MACHADO, E. C.; RIBEIRO, R. V. Short-term physiological changes in roots and leaves of sugarcane varieties exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in root medium. **Journal of Plant Physiology**, v. 177, p. 93-99, 2015.

SMIT, M. A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, v. 98, n. 2-3, p. 91-97, 2006.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TRENTIN, R.; ZOLNIER, S.; RIBEIRO, A.; STEIDLE NETO, A. J. Transpiração e temperatura foliar da cana-de-açúcar sob diferentes valores de potencial matricial. **Engenharia Agrícola**, v. 31, n. 6, p.1085-1095, 2011.

TRUJILLO I.; RIVAS, M.; CASTRILLO M. Leaf recovery responses during rehydration after water deficit in two bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 4, p. 360-369, 2013.

ULLAH, A.; SUN, H.; YANG, X.; ZHANG, X. Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, p. 271-284, 2017.

VIEIRA, G. H. S.; MANTOVANI, E. C.; SEDIYAMA, G. C.; DELAZARI, F. T. Indicadores morfo-fisiológicos do estresse hídrico para a cultura da cana-de-açúcar em função de lâminas de irrigação. **Bioscience Journal**, v.30, p. 65-75, 2014.

XIANG, D.; PENG, L.; ZHAO, J.; ZOU, L.; ZHAO, G.; SONG, C. Effect of drought stress on yield, chlorophyll contents and photosynthesis in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 11, p. 1358-1363, 2013.

YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHISHINOZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, p. 1095-1102, 1997.

ZHANG, L. X.; LAI, J. H.; LIANG, Z. S.; ASHRAF, M. Interactive effects of sudden and gradual drought stress and foliar-applied glycinebetaine on growth, water relations, osmolyte accumulation and antioxidant defence system in two maize cultivars differing in drought tolerance. **Journal Agronomy Crop Science**, 200: 425-433, 2014.

ZHANG, C.; ZHAN, D. X.; LUO, H. H.; ZHANG, Y. L.; ZHANG, W. F. Photorespiration and photoinhibition in the bracts of cotton under water stress. **Photosynthetica**, v. 54, n. 1, p. 12-18, 2016.

ZIVCAK, M.; BRESTIC, M.; BALATOVA, Z.; DREVENAKOVA, P.; OLISOVSKA, K.; KALAJI, H. M.; YANG, X.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. **Photosynthesis Research**, 117:529-546, 2013.

## CAPÍTULO II

### O AUMENTO DA ESPESSURA E A MANUTENÇÃO DA LARGURA DAS FOLHAS E MANUTENÇÃO DAS TROCAS GASOSAS SÃO INDICADORES DE TOLERÂNCIA À SECA EM CANA-DE-AÇÚCAR NO SEGUNDO CICLO

#### RESUMO

A ocorrência cada vez mais frequente de secas prolongadas tem se tornado um fator bastante negativo na produção de cana-de-açúcar. Nessas condições, as plantas tendem a adotar diferentes estratégias para minimizar os danos ocasionados pela seca, como aumentar a espessura das folhas sem reduzir a quantidade e a largura, além de manter as trocas gasosas e a integridade do aparato fotossintético. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar respostas biométricas e fisiológicas de cultivares de cana-de-açúcar em condições de estresse hídrico no segundo ciclo. Para tanto, foram utilizadas seis cultivares: RB72910, RB99382, RB72454, RB92579, RB855536 e RB931011, e três tratamentos hídricos, com base no conteúdo de água disponível no solo (CAD) e definidos como: controle, 80 a 100% (AD); estresse hídrico moderado, 40 a 60% (AD) e estresse hídrico severo, 0 a 20% (AD). A cultivar RB92579 foi mais tolerante com menos alterações em suas características fisiológicas e biométricas, além de baixa redução da biomassa sob déficit hídrico. Por outro lado, a RB72454 foi a mais afetada, com maior redução da fotossíntese, condutância estomática, transpiração, eficiência de carboxilação, massa seca de folhas, de colmos e da parte aérea. A condutância estomática, transpiração, fotossíntese, eficiência de carboxilação, largura da folha e área foliar específica são bastante sensíveis à alteração da umidade no solo, podendo ser utilizadas para discriminar cultivares de cana-de-açúcar mais tolerantes à deficiência hídrica.

**Palavras-chave:** Déficit hídrico. Fotossíntese. Condutância estomática. Massa seca.

#### 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura de grande importância econômica mundial, devido à sua utilização como fonte de matéria-prima para a indústria alimentícia e produção de biocombustível renovável, sendo o Brasil o maior produtor mundial com produção estimada para a safra 2016/17 de 690,98 milhões de toneladas e, crescimento da área plantada de 4,8% (CONAB, 2016).

A deficiência hídrica é apontada como um dos fatores ambientais responsáveis pelas maiores reduções na produção da cana-de-açúcar, mesmo em regiões com bastante chuva, mas que não são distribuídas uniformemente ao longo do ano (VIEIRA et al., 2014). Com

isso, um dos grandes desafios da agricultura tem sido aumentar a produtividade da cultura em regiões passíveis da ocorrência de restrição hídrica (CARLIN; SANTOS, 2009) como é o caso do Cerrado no Centro-Oeste e o Agreste no Nordeste brasileiro. Nesse aspecto, a seleção de cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico tem se tornado fundamental para viabilizar a cultura nessas regiões (SILVA et al., 2007; 2013).

Em condições de déficit hídrico, as plantas podem aumentar a espessura das folhas como mecanismo para conservar maior conteúdo de água foliar (LOPEZ et al., 1997; TRUJILLO et al., 2013), bem como manter a largura das folhas (HOLANDA et al., 2014). Além disso, nessas condições as plantas tendem a fechar os estômatos na tentativa de restringir a perda de água pela transpiração (MACHADO et al., 2009; MEDEIROS et al., 2013), o que diminui o processo fotossintético pela restrição da entrada de CO<sub>2</sub>, visto a relação existente entre a condutância estomática, a transpiração e a fotossíntese (ENDRES et al., 2010; GRAÇA et al., 2010; SALES et al., 2012). Desse modo, pode afetar o crescimento e o desenvolvimento da cana-de-açúcar, e conseqüentemente seu rendimento final (SILVA et al., 2007; MACHADO et al., 2009).

Além da relação com a condutância estomática, a taxa de transpiração também é influenciada pelo déficit de pressão de vapor do ar e pelas características de tolerância de cada cultivar (ENDRES et al., 2010; GRAÇA et al., 2010; SILVA et al., 2013). A redução da transpiração em cana-de-açúcar pode influenciar na eficiência do uso da água além de aumentar a temperatura da folha, levando à inibição da fotossíntese (GONÇALVES et al., 2010; MEDEIROS et al., 2013; VIEIRA et al., 2014; SARAIVA et al., 2014).

O déficit hídrico também pode afetar a biossíntese de clorofilas, ocorrendo a diminuição da eficiência de absorção da energia luminosa, que pode levar a sérios danos no aparelho fotossintético (SILVA et al., 2007). Esses danos podem ser interpretados pela razão Fv/Fo que estima o rendimento primário máximo do PSII, fornecendo uma estimativa eficaz da capacidade fotossintética foliar (PUTTEH et al., 2013). Essa análise tem sido bastante utilizada em diferentes culturas como sorgo (PEIXOTO et al., 2002), café (KONRAD et al., 2005) e cevada (KALAJI et al., 2011).

O índice SPAD também se apresenta como um parâmetro confiável na seleção de cultivares tolerantes à seca, como observado em cana-de-açúcar (SILVA et al., 2014a) e milho (MAGALHÃES et al., 2009), e tem sido indicado como uma técnica bastante eficiente no diagnóstico dos pigmentos cloroplastídicos, pois é bem correlacionado com os teores de clorofilas e de carotenoides, além de ter manuseio fácil e rápido (SILVA et al., 2011; 2014a).

Vários estudos vêm sendo realizados para seleção de cultivares de cana-de-açúcar mais tolerantes ao déficit hídrico (GRAÇA et al., 2010; MEDEIROS et al., 2013; SILVA et al., 2014a). No entanto, a maioria desses trabalhos foram realizados com cana-planta em vasos, dentro de casa de vegetação (MACHADO et al., 2009; GRAÇA et al., 2010; MEDEIROS et al., 2013) que, a depender do tamanho do vaso, pode ser um fator limitante no crescimento das raízes (GONÇALVES et al., 2010). Além disso, não há registros de trabalhos realizados com cana-soca, uma vez que o ciclo pode influenciar na tolerância das cultivares ao estresse, bem como em vasos de grande volume que proporcionam maior potencial de exploração do sistema radicular.

Nossa hipótese é que as diferenças biométricas e fisiológicas entre cultivares de cana-planta relatadas na literatura (Machado et al. 2009; Gonçalves et al. 2010; Silva et al. 2011; 2012; Medeiros et al. 2013), também se expressam no segundo ciclo de cultivo. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar respostas biométricas e fisiológicas de cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob condições de estresse hídrico.

Este estudo também contribuirá para caracterizar a biometria e fisiologia na cana-de-açúcar, através da identificação de cultivares mais tolerantes à seca, levando-se em consideração o ciclo de cultivo, vindo a contribuir na caracterização de cultivares melhor adaptadas ao déficit hídrico que possam ser utilizadas em programas de melhoramento genético da cultura.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal e condições experimentais**

O experimento foi conduzido sob as coordenadas 9°28' S, 35°49' W, a 127 m de altitude. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 6 x 3, sendo seis cultivares de cana-de-açúcar e três tratamentos hídricos, distribuídos em quatro blocos, totalizando 72 parcelas experimentais. As cultivares de cana-de-açúcar utilizadas foram RB72910, RB99382, RB72454, RB92579, RB855536 e RB931011. Os tratamentos hídricos foram baseados na capacidade de água disponível no solo (CAD), e definidos como: controle, 80 a 100% (AD); estresse hídrico moderado, 40 a 60% (AD) e estresse hídrico severo, 0 a 20% (AD). A parcela experimental foi composta por um vaso de 0,485 m de diâmetro médio e 0,99 m de altura, preenchido com aproximadamente 180 kg de solo destorroado, peneirado e homogeneizado. Os vasos foram distribuídos em arranjo espacial de 1,0 x 1,0 m entre as linhas e fileiras, a céu aberto.

O solo utilizado foi um Latossolo Amarelo coeso. As análises físico-químicas foram realizadas seguindo a metodologia da Embrapa (1997), e a curva de retenção de umidade foi estimada utilizando-se a metodologia de Richards (1965), cujos resultados encontram-se na Tabela 1.

Os rebolos utilizados para o plantio (19/02/2014) foram padronizados levando-se em consideração a idade, estado sanitário, e região do colmo da cana semente. Para garantir melhor homogeneidade das plântulas, os rebolos foram plantados previamente em bandejas plásticas mantidas sob telado até que as plântulas atingissem três folhas definidas, aptas ao transplantio. Decorridos 30 dias após o plantio, foram selecionadas três plântulas, de tamanho uniforme, para cada vaso.

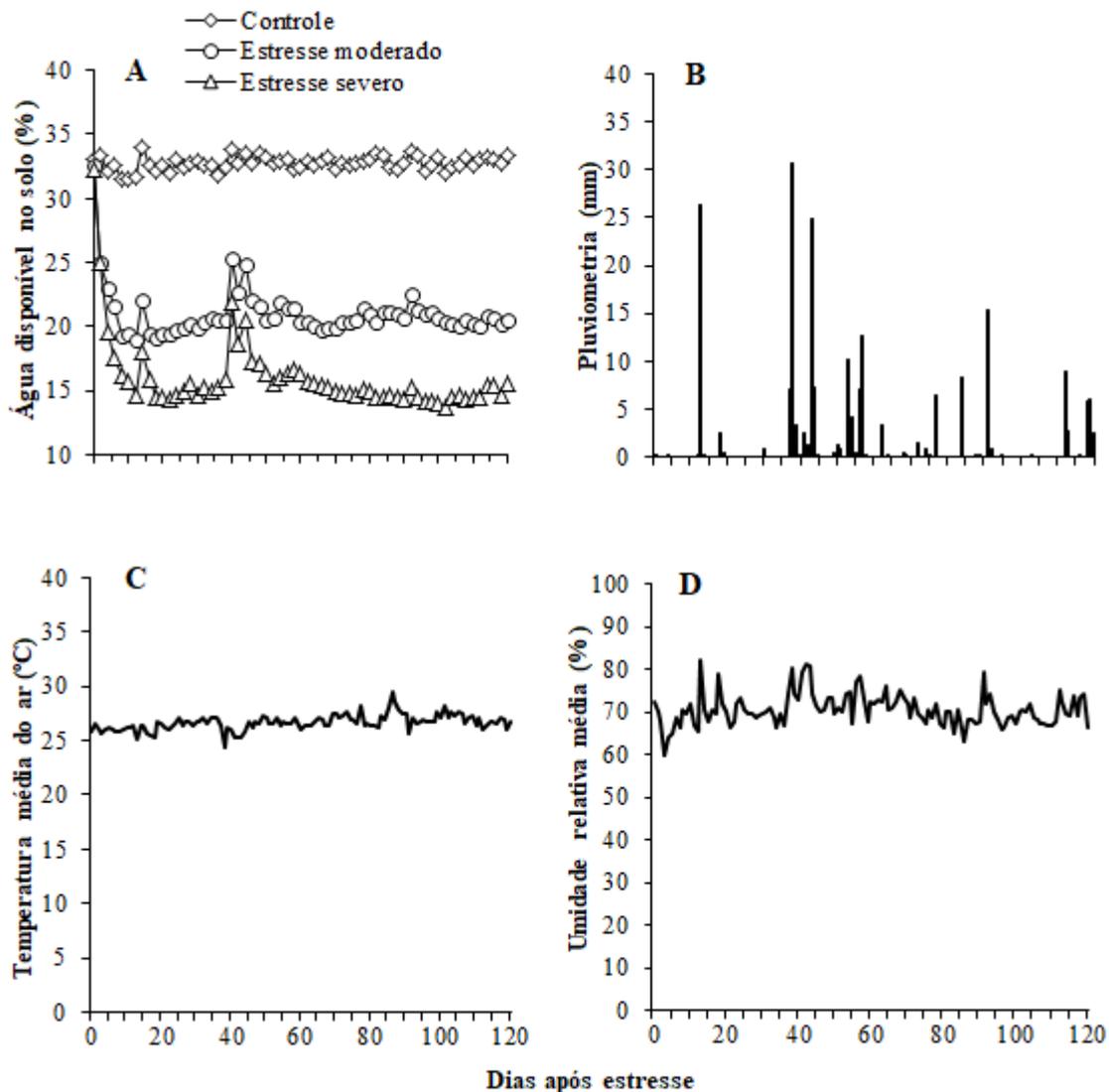
**Tabela 1.** Propriedades químicas e físicas do solo utilizado no experimento.

Análise do solo	
Química	
Condutividade elétrica	0,32 dS m <sup>-1</sup>
pH	6,3
Ca <sup>2+</sup>	7,61 cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
Mg <sup>2+</sup>	4,41 cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
Na <sup>+</sup>	0,26 cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
K <sup>+</sup>	0,18 cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
P	49 mg kg <sup>-1</sup>
Al <sup>3+</sup>	0,00 cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
Matéria orgânica	35,60 g kg <sup>-1</sup>
Física	
Porosidade total	56,2%
Densidade global	1,17 g cm <sup>-3</sup>
Areia	637,6 g kg <sup>-1</sup>
Silte	205,9 g kg <sup>-1</sup>
Argila	156,5 g kg <sup>-1</sup>
classificação Textural	Franco argilo arenoso
Tensão (MPa)	Conteúdo de água (%)
0,033	27,72
1,5	14,76
Água disponível	12,96

Aos 240 dias após o plantio, a cana-planta foi cortada iniciando-se o segundo ciclo. Posteriormente, os vasos foram irrigados, regularmente, próximo à capacidade de campo até o momento de implantação dos tratamentos hídricos que tiveram início aos 60 dias após o corte (DAC). Foi realizado o desbaste do perfilhamento deixando-se seis plantas de tamanho uniforme em cada vaso.

Durante o período de estresse hídrico a umidade do solo foi monitorada em cada vaso, por meio de um sistema de sonda de monitoramento de umidade de solo (Moisture Meter PR2, Delta T Devices, England) que avalia a umidade a cada 10 cm até a profundidade de 40 cm. A reposição da água foi feita por sistema de irrigação pressurizada, com um emissor por parcela, deixando-se cada tratamento hídrico na sua faixa de umidade (Figura 1A). Os dados climáticos referentes ao período experimental foram obtidos por uma estação agrometeorológica automática, localizada a aproximadamente 200 m do experimento. Os dados foram registrados a cada dez minutos, onde se obteve a precipitação pluvial (Figura 1B), a temperatura do ar média (Figura 1C) e a umidade relativa do ar média (Figura 1D).

**Figura 1.** Umidade do solo com cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao estresse hídrico no segundo ciclo (A), pluviometria (B), temperatura média do ar (C) e umidade relativa média do ar (D) durante o período experimental.



## 2.2 Avaliações fisiológicas

Aos 22 dias após o início do estresse hídrico foram realizadas as seguintes avaliações fisiológicas: potencial hídrico da folha, trocas gasosas, teor relativo de água na folha, eficiência fotoquímica primária do PSII ( $F_v/F_o$ ) e índice SPAD.

O potencial hídrico da folha ( $\Psi_w$ ) foi avaliado entre 08:00 e 11:00 horas, determinado na parte intermediária da folha +1, usando uma câmara de pressão Scholander (SoilMoisture Equipment, Santa Bárbara, USA).

As medidas de trocas gasosas foram avaliadas no terço médio da folha +1 com um analisador de gás, modelo Li-6400XT (Licor, EUA) entre as 8:00 e 10:00 horas da manhã. Na ocasião, foram avaliadas a condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), concentração interna de carbono ( $C_i$ ), fotossíntese líquida ( $A$ ), temperatura foliar ( $T_f$ ), déficit de pressão de vapor folha-ar (DPV folha-ar), eficiência intrínseca no uso da água ( $E_iUA$ ), calculada relacionando a fotossíntese líquida com a condutância estomática ( $A/g_s$ ) e, eficiência instantânea de carboxilação ( $E_iC$ ), relacionando a fotossíntese líquida com a concentração interna de  $CO_2$  ( $A/C_i$ ).

O teor relativo de água foi quantificado extraíndo-se três discos ( $0,85\text{ cm}^2$ ) da folha +1 coletada entre 09:00 e 10:00 horas. Primeiramente foi determinada a massa do tecido fresco dos discos em balança analítica. Posteriormente, os respectivos discos foram reidratados usando água deionizada por 24 h em ausência de luz, transcorrido esse tempo foi retirado o excesso de água com lenço de papel, e determinada a massa do tecido túrgido. A massa do tecido seco foi obtida depois que os discos foram secos por 48 h em estufa de circulação forçada de ar a  $65^\circ\text{C}$ . O TRA foi calculado conforme Barrs; Weatherley (1962):  $TRA = [(MF - MS) / (MT - MS)] \times 100$ ; em que: MF corresponde a massa do tecido fresco, MT a massa do tecido túrgido, e MS a massa do tecido seco.

O índice SPAD foi mensurado utilizando-se um clorofilômetro portátil modelo SPAD-502, sendo aferidas três leituras na região do terço médio da folha +1 (SILVA et al., 2011; 2013). Posteriormente, obteve-se a média geral por folha.

As medidas da eficiência fotoquímica primária do PSII ( $F_v/F_o$ ) foram realizadas entre 12:00 e 13:00 horas utilizando-se um fluorômetro portátil de luz modulada (PAM 2500, WALZ) seguindo os procedimentos propostos por Maxwell; Johnson (2000) e Konrad et al., (2005). As avaliações foram realizadas nas folhas +1 pré-adaptadas ao escuro ( $\approx 30$  min) com a utilização de cliques específicos colocados na região mediana das folhas, evitando-se a nervura central.

### 2.3 Avaliações biométricas

Aos 120 dias após início dos tratamentos hídricos foram realizadas as seguintes avaliações de crescimento: altura da planta (cm), diâmetro do colmo (mm), número de folhas expandidas com pelo menos 20% de área verde, comprimento e largura da folha +3 (cm) segundo a classificação Kuijper (VAN DILLEWIJN, 1952). A partir da largura e comprimento da folha +3, e do número de folhas foi calculada a área foliar (cm<sup>2</sup>) pelo método descrito por Hermann; Câmara (1999).

As plantas foram então colhidas, separadas em folhas e colmos, e secas em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C até atingirem peso constante, obtendo-se a massa seca de folhas, colmos e parte aérea (folhas+colmos).

A massa seca de folha, e a área foliar foram utilizadas para avaliar:

$$\text{Área foliar específica} = \frac{AF}{MSF} \text{ (cm}^2 \text{ g}^{-1}\text{)}$$

Em que:

AF = Área foliar;

MSF = Massa seca da folha.

### 2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando detectada diferença significativa fez-se teste de médias para os fatores isolados, e os desdobramentos das interações, utilizando-se o teste de Tukey a  $p < 0,05$ . As variáveis que tiveram efeito da interação dos fatores foram submetidas à análise de componentes principais (ACP), possibilitando determinar suas relações com as cultivares em cada condição hídrica.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Avaliações fisiológicas

Os tratamentos hídricos afetaram todas as variáveis fisiológicas estudadas (Tabela 2), enquanto que somente o déficit de pressão folha-ar e a temperatura foliar não variaram entre as cultivares. Além disso, a condutância estomática, transpiração,  $F_v/F_o$ , índice SPAD, concentração interna de CO<sub>2</sub>, fotossíntese e eficiência instantânea de carboxilação tiveram efeito da interação entre tratamentos hídricos e cultivares (Tabela 2).

O potencial hídrico da folha foi 40% menor nas plantas sob estresse hídrico severo em relação às do estresse moderado e do controle (Figura 2A). Entre as cultivares, a RB931011

manteve o maior potencial hídrico, enquanto a RB72454 teve o menor (Figura 2B). Do mesmo modo, o teor relativo de água na folha foi afetado pelo déficit hídrico reduzindo aproximadamente 6,1 e 16,3% sob estresse hídrico moderado e severo, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Figura 2C). Entre as cultivares, a RB931011 manteve o maior teor relativo de água, no entanto, semelhante às demais com valor médio de 87%, exceto a RB72454 que teve menor TRA, aproximadamente 82% (Figura 2D).

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância das variáveis fisiológicas: potencial hídrico da folha ( $\Psi_w$ ), temperatura da folha ( $T_f$ ), déficit de pressão de vapor  $_{\text{folha-ar}}$  (DPV  $_{\text{folha-ar}}$ ), teor relativo de água na folha (TRA), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração ( $E$ ), concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), fotossíntese ( $A$ ), eficiência de carboxilação ( $E_iC$ ), eficiência intrínseca no uso da água ( $E_iUA$ ), eficiência fotoquímica primária do fotosistema II ( $F_v/F_o$ ) e índice SPAD em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse moderado e estresse severo.

FV	GL	Quadrados médios					
		$\Psi_w$	$T_f$	DPV	TRA	$g_s$	$E$
W	2	2,301*	1,51*	1,08*	1,060,02*	0,34*	46,20*
C	5	0,096*	0,05 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	32,97*	0,00*	0,84*
(W x C)	10	0,035 <sup>ns</sup>	0,13 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	6,61 <sup>ns</sup>	0,01*	1,11*
Erro	34	0,040	0,24	0,01	8,21	0,00	0,41

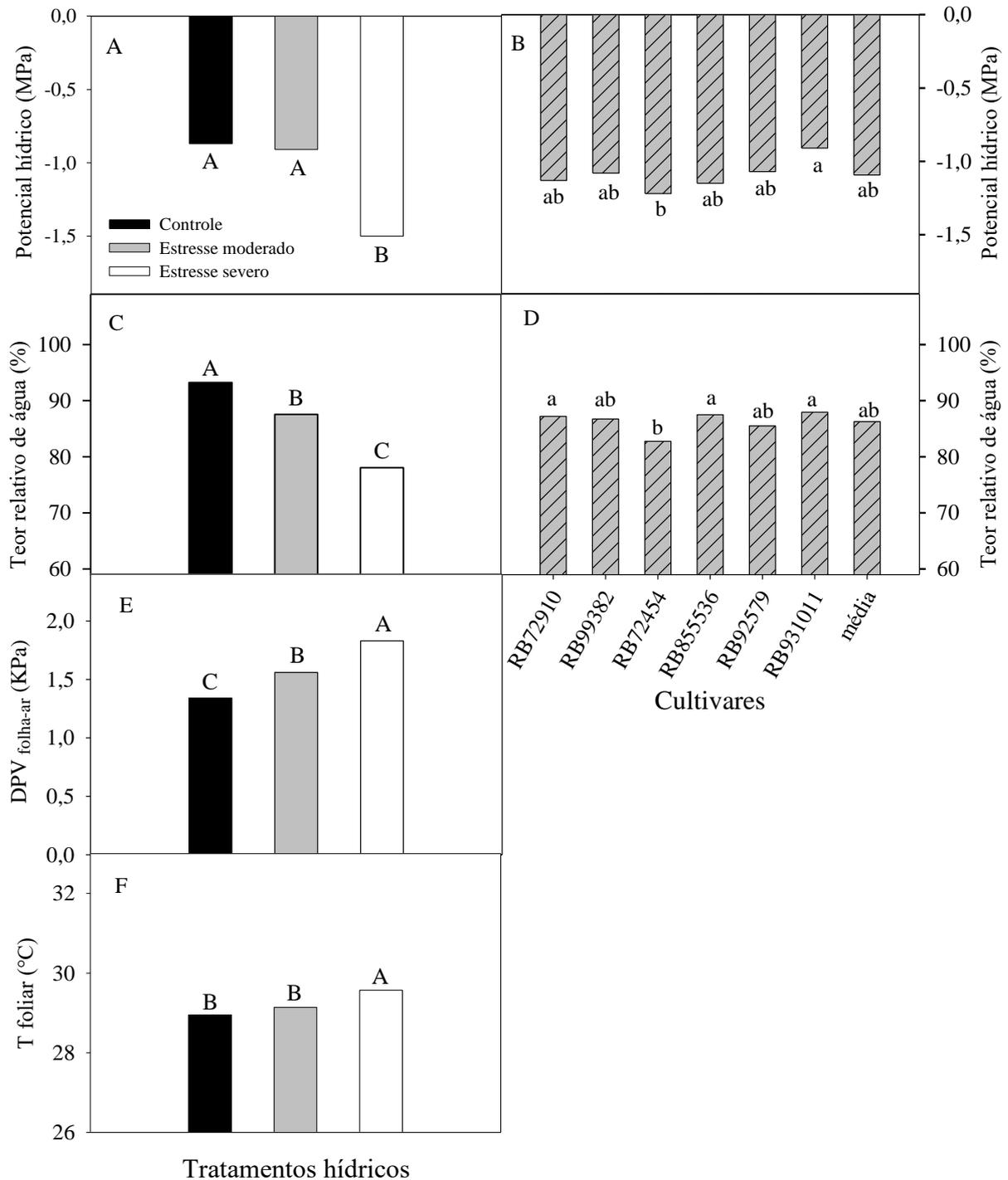
		$C_i$	$A$	$E_iC$	$E_iUA$	$F_v/F_o$	SPAD
W	2	5,259,76*	1,935,92*	0,06*	12459,48*	3,04*	575,72*
C	5	2,040,31*	71,43*	0,008*	3782,70*	0,35*	73,91*
(W x C)	10	1,077,82*	40,67*	0,003*	1774,02 <sup>ns</sup>	0,29*	21,81*
Erro	34	453,53	16,68	0,000	1246,02	0,03	5,35

FV: Fontes de variação; GL: graus de liberdade; W: Tratamentos Hídricos; C: Cultivares. \*: significativo ( $p < 0,05$ ) pelo teste Tukey; ns: não-significativo ( $p < 0,05$ ) pelo teste Tukey.

O estresse hídrico severo aumentou o déficit de pressão de vapor (folha-ar) em 26,7% em relação ao tratamento controle (Figura 2E), enquanto o aumento da temperatura foliar foi em média 3%, nas mesmas condições (Figura 2F).

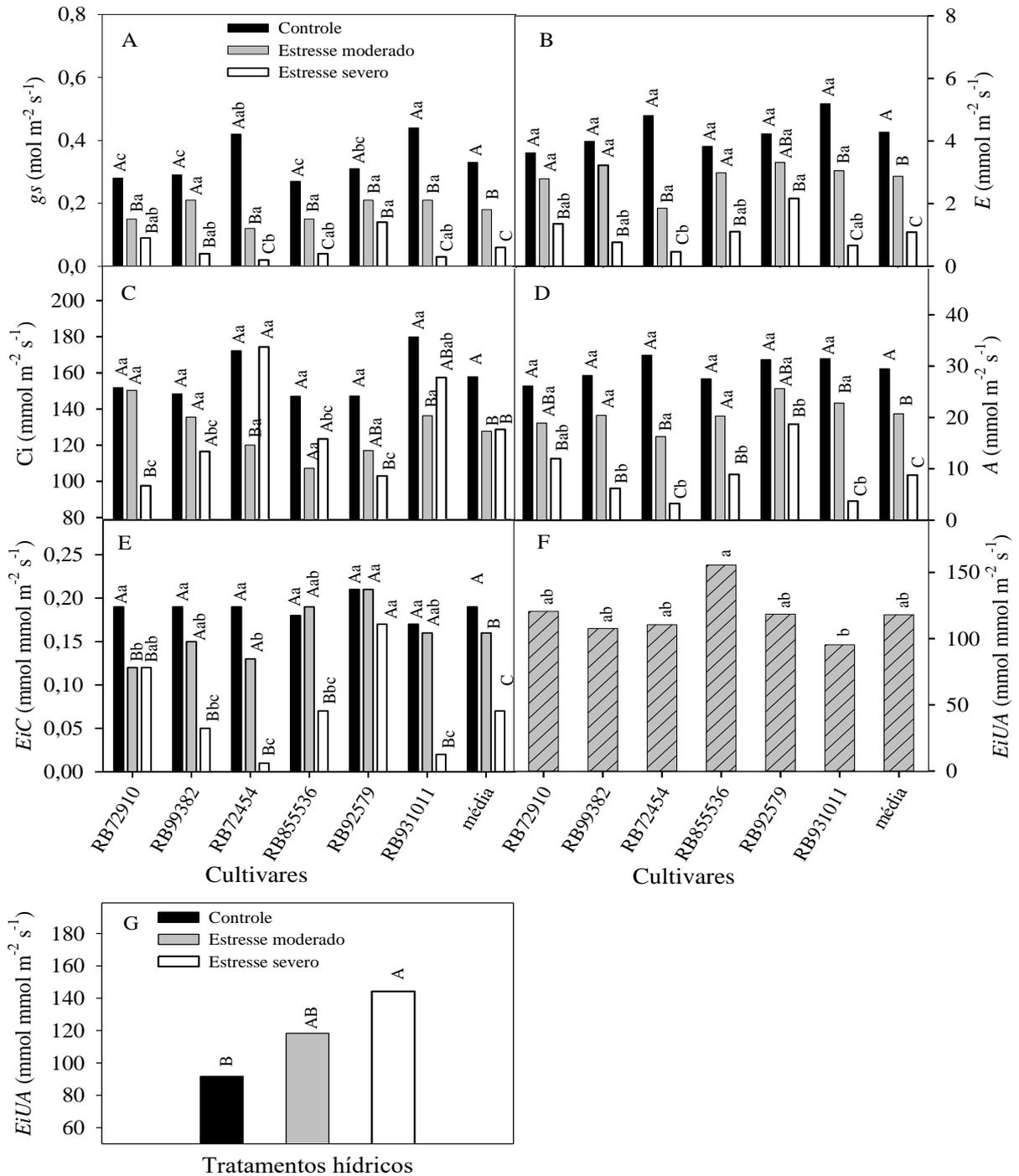
A condutância estomática variou bastante entre as cultivares quando sob condição adequada de umidade do solo (Figura 3A). A cultivar RB931011, por exemplo, teve uma condutância 39,7% maior que a cultivar RB855536 nessa condição. Quando imposto o estresse hídrico, as cultivares RB72454 e RB931011 foram as mais afetadas com o estresse severo reduzindo a  $g_s$  cerca de 94,3 e 93,2%, respectivamente. Enquanto isso, as cultivares RB92579 e RB72910 tiveram menores reduções, aproximadamente 55,1 e 67,8%, respectivamente.

**Figura 2.** Potencial hídrico da folha (A e B), teor relativo de água (C e D), déficit de pressão de vapor folha-ar (E) e temperatura foliar (F), em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse moderado e estresse severo.



Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos em cada cultivar e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares em cada tratamento hídrico pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A média apresenta o efeito isolado dos tratamentos hídricos.

**Figura 3.** Condutância estomática (A), transpiração (B), concentração interna de CO<sub>2</sub> (C), fotossíntese (D), eficiência de carboxilação (E) e eficiência intrínseca no uso de água (F e G), em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo.



Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos em cada cultivar e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares em cada tratamento hídrico pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A média apresenta o efeito isolado dos tratamentos hídricos.

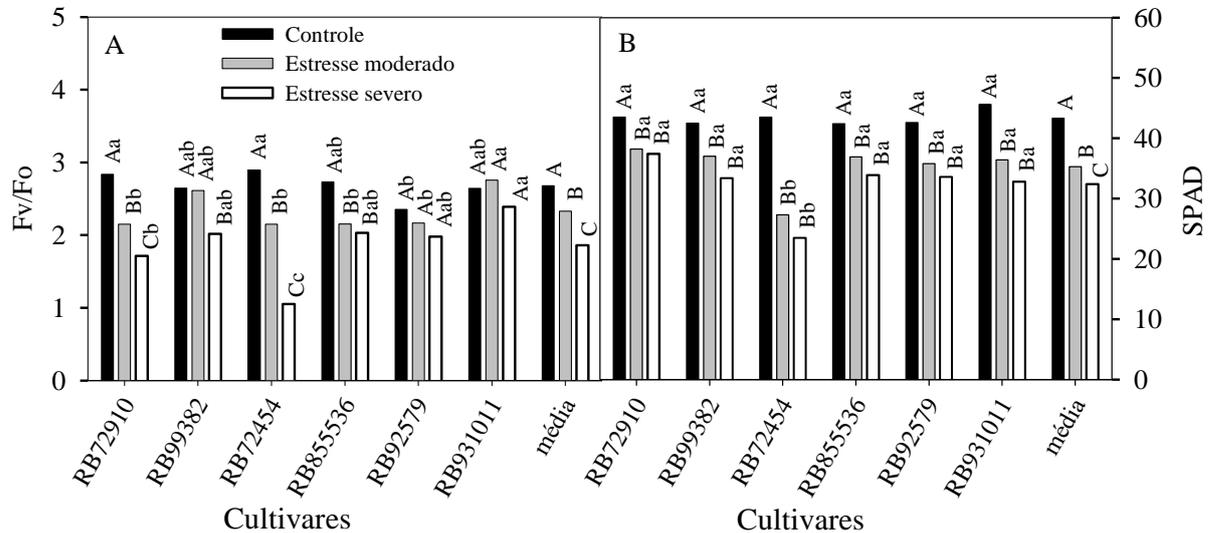
Diferente da  $g_s$ , a transpiração diferiu apenas entre as cultivares quando essas estavam sob estresse severo (Figura 3B). Nessa circunstância, a transpiração estava intimamente relacionada com a  $g_s$ , ocorrendo redução da transpiração nas cultivares RB72454 e RB931011, cerca 90,3 e 87,3%, respectivamente. Enquanto isso, a transpiração foi menos afetada pelo estresse severo nas cultivares RB92579 e RB72910 que tiveram reduções de 48,9 e 62,7%, respectivamente, em relação às plantas sob tratamento controle.

A concentração interna de  $CO_2$  e a fotossíntese também variaram entre as cultivares somente sob estresse severo (Figura 3C). Em algumas cultivares o  $C_i$  diminuiu com o aumento do estresse, como na cultivar RB92579 e na RB72910, enquanto em outras ocorreu uma redução do  $C_i$  sob estresse moderado e novamente um aumento quando sob estresse severo, como nas cultivares RB72454 e RB931011. A cultivar RB92579 foi a que menos reduziu a fotossíntese sob estresse severo, enquanto que a cultivar RB72454 apresentou a maior queda em sua fotossíntese, com 89,9% de redução (Figura 3D). A RB92579 foi a única cultivar que não diminuiu a sua eficiência instantânea de carboxilação ( $E_iC$ ), mesmo sob estresse severo (Figura 3E). Enquanto a cultivar RB72454 foi a mais afetada com redução de 94% quando sob estresse severo. Já quando relacionado a fotossíntese com a condutância estomática, observou-se maior eficiência intrínseca no uso da água na cultivar RB855536 (Figura 3F), e um aumento médio de 36,5% entre as cultivares sob estresse hídrico severo (Figura 3G).

A estimativa da capacidade fotossintética primária,  $F_v/F_o$ , só se manteve inalterada quando imposto o estresse, nas cultivares RB92579 e RB931011. Entre as cultivares, a RB72454 foi a que mais reduziu  $F_v/F_o$ , a qual sob condição controle teve o  $F_v/F_o$  mais alto e sob condição de estresse severo o mais baixo, com redução de 87% (Figura 4A). Esta cultivar também foi a que teve o índice SPAD mais afetado pelo estresse, tanto moderado quanto severo, com reduções de 37,2 e 46%, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Figura 4B).

Na análise de componentes principais, tanto nas variáveis biométricas quanto nas fisiológicas, as cultivares agruparam-se de acordo com cada tratamento hídrico (Figura 8B e D). O  $C_i$  teve maior relação com as cultivares RB931011 e RB72454 no tratamento controle, enquanto sob estresse severo se relacionou negativamente com as cultivares RB92579 e RB72910 (Figura 8A e B). Além disso,  $g_s$ ,  $E$ ,  $F_v/F_o$ , SPAD e  $A$  tiveram relação positiva com as cultivares RB855536, RB92579, RB99382 e RB72910 sob tratamento controle, e negativa com as cultivares RB931011 e RB72454 sob estresse severo.

**Figura 4.** Eficiência fotoquímica primária do fotossistema II - Fv/Fo (A) e conteúdo estimado de clorofila - SPAD (B) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo.



Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos em cada cultivar e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares em cada tratamento hídrico pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A média apresenta o efeito isolado dos tratamentos hídricos.

### 3.2 Avaliações biométricas

Todas as características biométricas diferiram entre as cultivares (Tabela 3). Enquanto que somente o comprimento foliar não foi afetado pelos tratamentos hídricos. Os tratamentos hídricos afetaram a biometria das cultivares de maneira distinta, como pode ser visto pela interação significativa entre os fatores em quase todas as variáveis.

A altura da planta diferiu entre as cultivares quando sob tratamento controle e estresse moderado, mas não houve diferença sob estresse severo (Figura 5A).

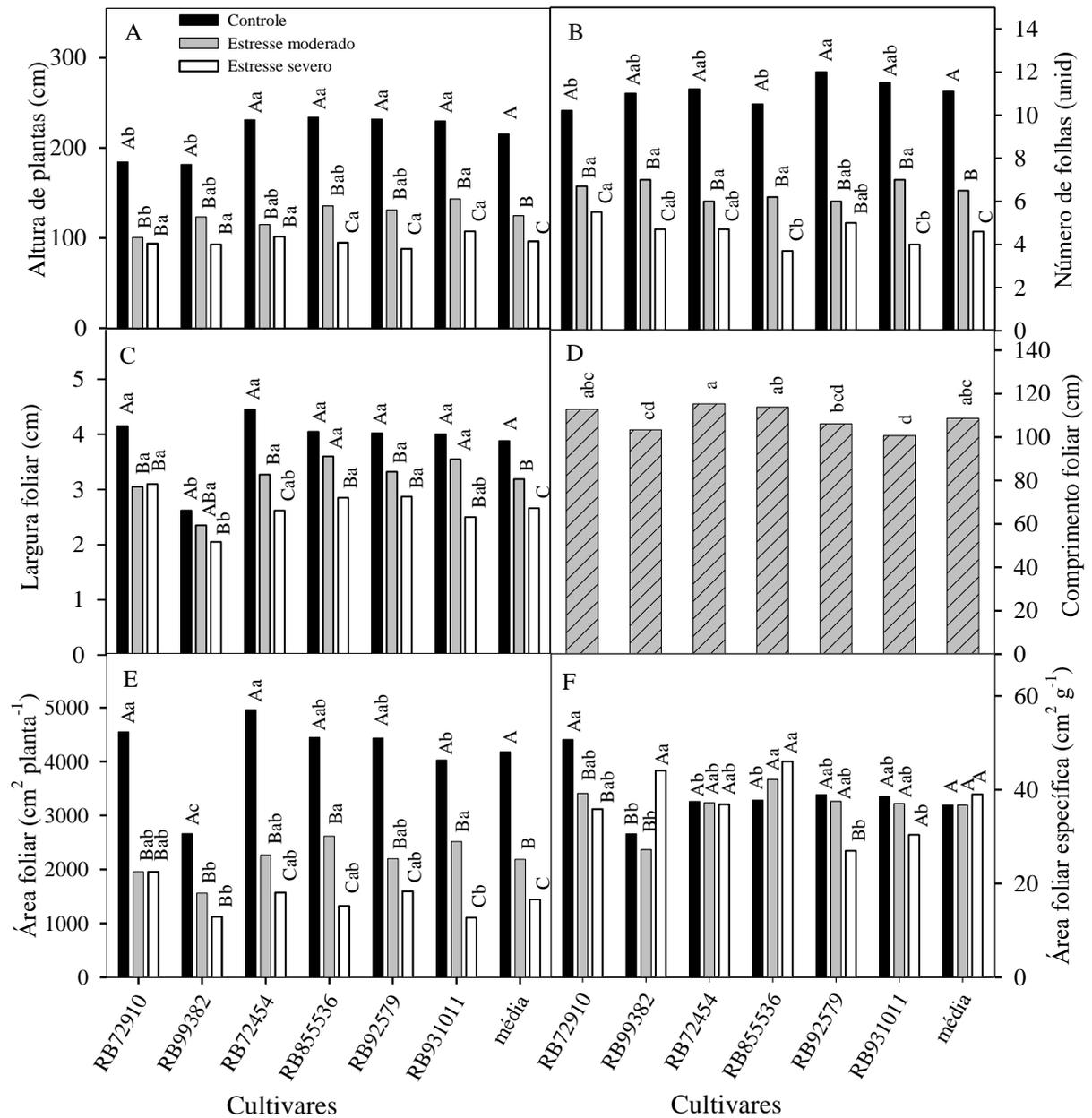
O número de folhas reduziu bastante quando sob estresse severo, sendo a cultivar RB931011 a mais afetada com redução de 65,2% (Figura 5B). Todas as cultivares tiveram redução na largura foliar, com destaque para a RB72454 que reduziu 41,1% (Figura 5C), enquanto que, o comprimento não foi afetado pelo estresse hídrico (Figura 5D). Do mesmo modo, a área foliar da cana-de-açúcar diminuiu 47,7% sob estresse moderado e 65,5% sob estresse severo, sendo umas cultivares mais afetadas como a RB931011, e outras menos como a RB72910 (Figura 5E). A espessura das folhas também foi afetada pelo déficit hídrico, que pode ser visto pela diminuição da área foliar específica em aproximadamente 30% nas cultivares RB72910 e RB92579 sob estresse severo (Figura 5F).

**Tabela 3.** Resumo da análise de variância das variáveis biométricas: altura de plantas (AP), número de folhas (NF), comprimento da folha (CF), largura da folha (LF), área foliar (AF), área foliar específica (AFE), diâmetro do colmo (DC), massa seca de folhas (MSF), massa seca do colmo (MSC) e massa seca da parte aérea (MSPA) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo.

FV	GL	Quadrados médios				
		AP	NF	CF	LF	AF
W	2	92716,12 <sup>*</sup>	264,93 <sup>*</sup>	37,72 <sup>ns</sup>	8,93 <sup>*</sup>	48125813,34 <sup>*</sup>
C	5	2097,55 <sup>*</sup>	1,08 <sup>*</sup>	406,78 <sup>*</sup>	2,39 <sup>*</sup>	2135651,80 <sup>*</sup>
(W x C)	10	791,00 <sup>*</sup>	1,58 <sup>*</sup>	152,82 <sup>ns</sup>	0,30 <sup>*</sup>	727307,03 <sup>*</sup>
Erro	51	319,69	0,44	42,95	0,08	123714,48
		AFE	DC	MSF	MSC	MSPA
W	2	42,09 <sup>ns</sup>	125,63 <sup>*</sup>	300289,14 <sup>*</sup>	27917,82 <sup>*</sup>	509096,51 <sup>*</sup>
C	5	158,22 <sup>*</sup>	57,72 <sup>*</sup>	32529,86 <sup>*</sup>	770,06 <sup>*</sup>	39373,41 <sup>*</sup>
(W x C)	10	166,58 <sup>*</sup>	1,73 <sup>ns</sup>	9222,04 <sup>*</sup>	641,32 <sup>*</sup>	13353,98 <sup>*</sup>
Erro	51	37,91	1,63	179,96	46,34	262,00

FV: Fontes de variação; GL: graus de liberdade; W: Tratamentos Hídricos; C: Cultivares; ns: não-significativo; \*: significativo ( $p < 0,05$ ) pelo teste Tukey.

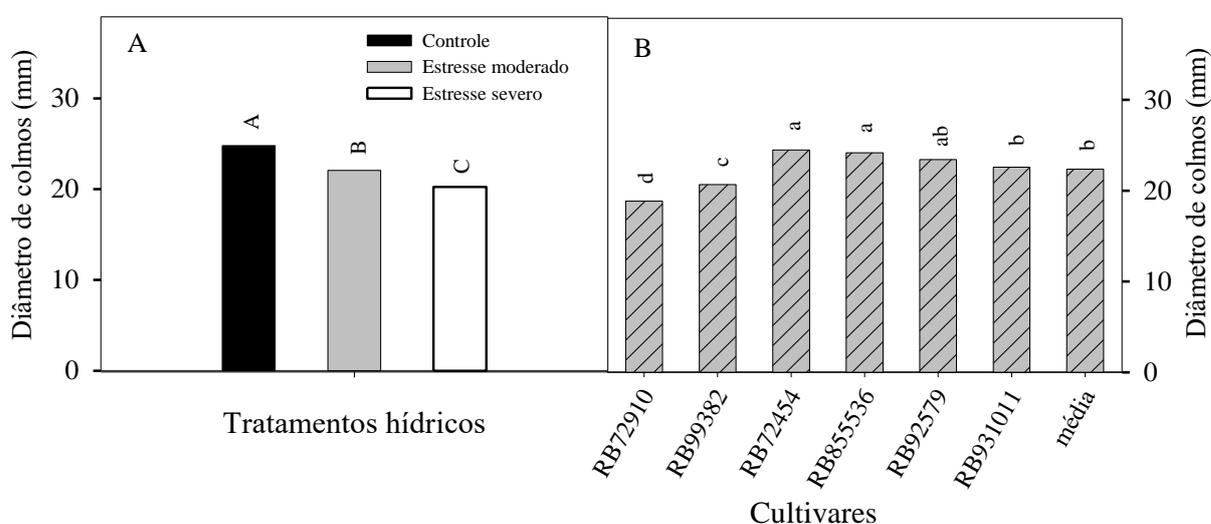
**Figura 5.** Altura de plantas (A), número (B), largura (C) e comprimento de folhas (D), área foliar (E) e área foliar específica (F) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo.



Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos em cada cultivar e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares em cada tratamento hídrico pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A média apresenta o efeito isolado dos tratamentos hídricos.

O diâmetro do colmo reduziu 18,3% nas plantas do estresse hídrico severo em relação às controles (Figura 6A). Entre as cultivares, menores diâmetros de colmos foram observados na RB72910 e RB99382, e maiores na RB72454 e RB855536 (Figura 6B).

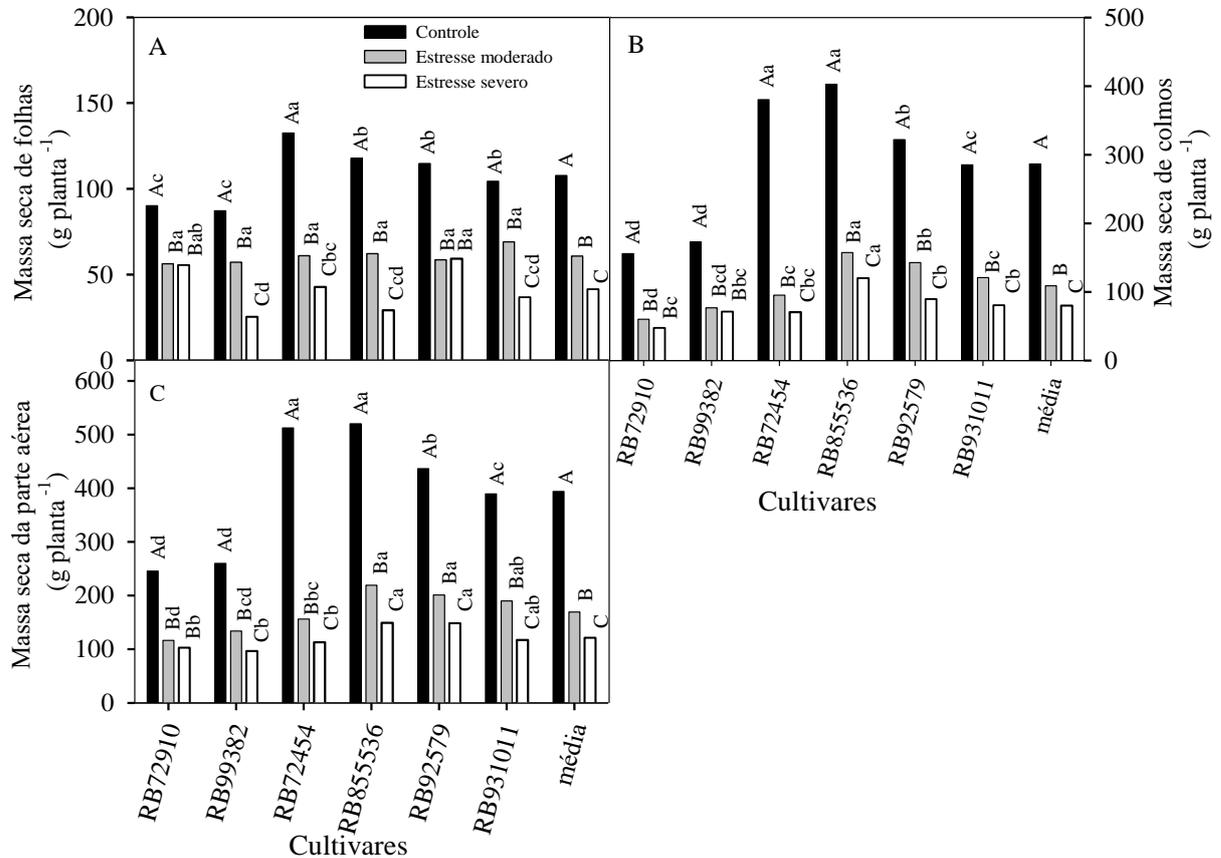
**Figura 6.** Diâmetro de colmos (A e B) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo.



Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A média apresenta o efeito isolado dos tratamentos hídricos.

A massa seca das folhas foi drasticamente afetada pelo estresse hídrico severo nas cultivares RB72454 e RB855536, com redução média de 67,7% e 75,3%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 7A). O mesmo foi observado na produção de colmos, em que as cultivares RB855536 e RB72454 tiveram a maior massa de colmo quando sob condições hídricas adequadas, no entanto, foram as mais afetadas pelo estresse (Figura 7B). Sob estresse moderado, essas cultivares tiveram redução de 75 e 61% de massa do colmo, respectivamente. Já sob estresse severo a redução aumentou para 81,5% na RB72454. Essas reduções refletiram na massa seca da parte aérea, a qual foi mais afetada pelo estresse severo na cultivar RB72454, com redução de 77,9%, seguida da RB855536, de 71,3% (Figura 7C).

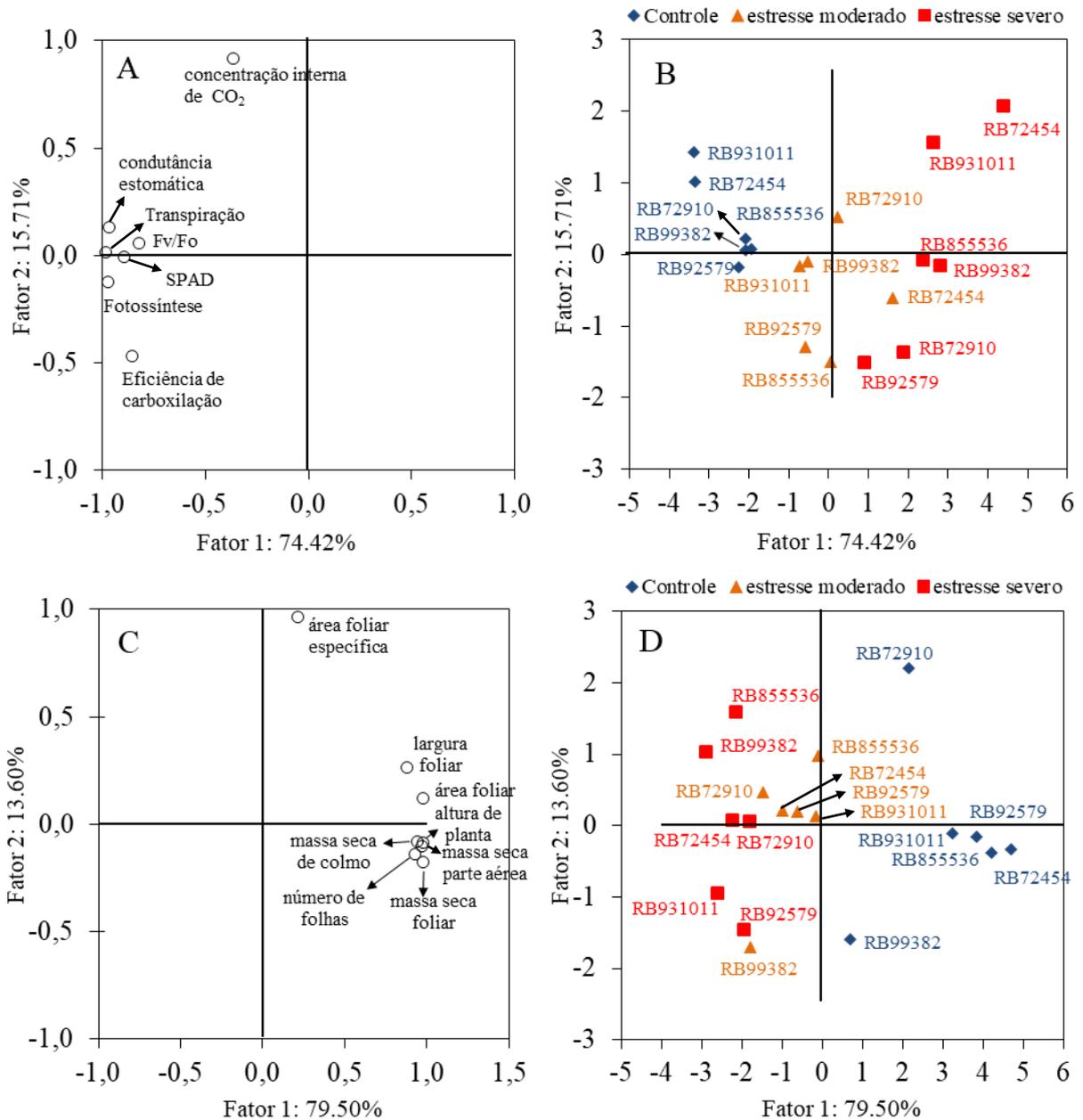
**Figura 7.** Massa seca de folhas (A), de colmos (B) e da parte aérea (C) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo.



Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos hídricos em cada cultivar e letras minúsculas indicam diferenças significativas entre cultivares em cada tratamento hídrico pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A média apresenta o efeito isolado dos tratamentos hídricos.

A altura da planta, largura da folha, número de folhas, área foliar, massa seca de folhas, massa seca de colmos e massa seca da parte aérea se relacionaram com as cultivares RB72454, RB855536, RB931011 e RB92579 sob tratamento controle, enquanto a área foliar específica se relacionou com a cultivar RB72910 (Figura 8C e D). Já sob estresse severo, especialmente, a altura da planta, número de folhas, massa seca de folhas, de colmos e da parte aérea tiveram pouca relação com as cultivares RB99382, RB72454 e RB931011.

**Figura 8.** Análise de componentes principais das avaliações fisiológicas (A e B) e biométricas (C e D) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo.



#### 4 DISCUSSÃO

O potencial hídrico da folha descreve a tensão de água na folha, cujos gradientes dirigem os fluxos de água da planta à atmosfera, e tem sido bastante utilizado em estudos das relações hídricas de plantas (BERGONCI et al., 2000). A cultivar RB72454 teve o menor  $\Psi_w$  foliar, o que pode indicar maior desidratação dos protoplastos, levando à maior redução da  $g_s$ ,

$E$  e  $A$  (SILVA et al., 2007; ENDRES et al., 2010). Em cana-de-açúcar sob diferentes lâminas de irrigação, o  $\Psi_w$  foliar aumentou proporcional ao aumento do fornecimento de água, indicando que com o baixo  $\Psi_w$  foliar nas condições limitantes de água, a cultura sofre maior estresse (VIEIRA et al., 2014). A manutenção do  $\Psi_w$  foi relacionada com a tolerância à seca, pela manutenção no crescimento em altura e na produção de massa seca do colmo (MACHADO et al., 2009). Além do  $\Psi_w$  foliar baixo, a cultivar RB72454 também teve o menor TRA. O estresse hídrico influencia negativamente no TRA, e cultivares que reduzem o TRA possuem indicativo de sensibilidade à seca (SILVA et al., 2013; MEDEIROS et al., 2013). Portanto, alterações no  $\Psi_w$  e no TRA têm sido eficientes para selecionar plantas quanto à tolerância ao estresse (SILVA et al., 2007; PUTEH et al., 2013; CANAVAR et al., 2014).

A diminuição da razão  $F_v/F_o$  é um indicador de danos estruturais nos tilacóides, afetando a eficiência fotoquímica, a assimilação de  $CO_2$  e, sobretudo, o transporte de elétrons (PEIXOTO et al., 2002; KALAJI et al., 2011). Esses danos metabólicos puderam ser vistos na cultivar RB72454 que apresentou baixa razão  $F_v/F_o$ , além de menor índice SPAD, como visualizados também na análise de componente principal. O SPAD trata-se de uma boa ferramenta para diagnosticar a integridade do aparato fotossintético de folhas, podendo ajudar nas interpretações do processo fotoquímico das plantas (SILVA et al., 2014a). Em cultivares de cana-de-açúcar sob estresse hídrico, as mais sensíveis tiveram maior redução do índice SPAD, o qual foi relacionado com a diminuição da produtividade e rendimento industrial da cultura (SILVA et al., 2012; VIEIRA et al., 2014; SILVA et al., 2014a). De maneira semelhante, o índice SPAD também teve maior redução em cultivares de milho mais sensíveis ao déficit hídrico (MAGALHÃES et al., 2009).

O DPV folha-ar aumentou aproximadamente 27% nas plantas sob estresse severo, o que desencadeou outros efeitos como o aumento da  $T_f$ . O acréscimo do DPV folha-ar em cultivares de cana-de-açúcar sob déficit hídrico ocorre devido à redução da perda de água pelas folhas, e tem funcionado efetivamente como um parâmetro de sinalização de estresse em plantas (ENDRES et al., 2010; SILVA et al., 2013). A relação entre o aumento do DPV e da  $T_f$  pode promover o aquecimento da superfície foliar com perda da capacidade de dissipação térmica da planta (VIEIRA et al., 2014; SARAIVA et al., 2014). Além disso, pode interferir em outros fatores, como condutância estomática, transpiração e fotossíntese (ENDRES et al., 2010; SILVA et al., 2013).

Em cana-de-açúcar, cultivares sensíveis ao déficit hídrico respondem rapidamente com o fechamento estomático (MACHADO et al., 2009; MEDEIROS et al., 2013). Novamente,

parece ser o caso da cultivar RB72454, como também observado em experimento de estresse hídrico em casa de vegetação (GONÇALVES et al., 2010). O fechamento estomático, inicialmente, pode ser vantajoso, pois responde rapidamente contra a perda excessiva de água evitando a desidratação foliar (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; MACHADO et al., 2009; INMAN-BAMBER et al., 2012), entretanto, quando prolongado torna-se ineficiente, pois acaba interferindo no fluxo difusivo de CO<sub>2</sub> (SALES et al., 2012; MEDEIROS et al., 2013). Portanto, pode-se atribuir que a baixa condutância estomática na cultivar RB72454 funcionou como uma estratégia desvantajosa, tornando a tentativa de economizar água ineficaz, já que a cultivar também teve menor potencial hídrico, teor relativo de água na folha e fotossíntese. Em cultivares de trigo e milho mais sensíveis à seca, ocorreu maior redução da condutância estomática, proporcional à intensidade do estresse (GUAN et al., 2015; HASAN et al., 2017).

Uma estratégia diferente foi adotada pela cultivar RB92579 que mesmo com o baixo potencial hídrico na folha, ela manteve melhor condutância estomática, transpiração, fotossíntese e eficiência fotoquímica primária em relação às demais cultivares. Fato também confirmado pela manutenção da eficiência de carboxilação dessa cultivar, uma vez que a manutenção dessa característica sob estresse hídrico indica tolerância ao estresse (MACHADO et al., 2009). Isso talvez decorra do fato que essa cultivar tem um sistema radicular mais desenvolvido, conforme observado em cultivos comerciais. Isso possibilita que essa cultivar baixe o potencial hídrico foliar, mantenha os estômatos mais abertos e consiga fazer as trocas gasosas, mesmo sob condições de déficit hídrico moderado (ENDRES et al., 2010).

Com a redução da  $g_s$ , é esperado que também ocorra redução da concentração interna de CO<sub>2</sub> se o aparato fotossintético não foi afetado pelo estresse (KONRAD et al., 2005; KALAJI et al., 2011). Dessa maneira, o aumento de  $C_i$  nas cultivares RB72454 e RB931011 pode ser atribuído a algum fator não estomático de redução da fotossíntese à medida que o estresse se tornou mais severo, como a falta de ATP e de NADPH, provenientes da cadeia transportadora de elétrons do fotossistema II, e conseqüentemente da redução do metabolismo de fixação de carbono (SALES et al., 2012; SILVA et al., 2014b).

O fechamento estomático tem forte influência sobre a  $E$  e a  $A$  (GRAÇA et al., 2010; MEDEIROS et al., 2013, SILVA et al., 2013). O mesmo encontramos, nesse estudo, em que foi observado uma maior redução da  $E$  e da  $A$  na cultivar RB72454 e menor na cultivar RB92579, acompanhando o comportamento estomático. Medeiros et al. (2013) observaram que cultivares de cana-de-açúcar mais sensíveis ao déficit hídrico tiveram forte redução da transpiração quando sob estresse hídrico, com redução menos intensa nas cultivares mais

tolerantes. Esses mecanismos fisiológicos, além de estarem interligados são bastante variáveis entre cultivares de cana-de-açúcar (GONÇALVES et al., 2010; GRAÇA et al., 2010). Resultados semelhantes também foram observados em plantas de trigo (GUAN et al., 2015) e milho (HASAN et al., 2017) sob déficit hídrico.

Alterações morfológicas são consequências de alterações fisiológicas provocadas pelo déficit hídrico (MACHADO et al., 2009; SILVA et al., 2012; PINCELLI; SILVA, 2012). A altura de plantas é uma característica inerente de cada cultivar (MACHADO et al., 2009; DIAS et al., 2012). Em cana-de-açúcar sob estresse hídrico, a altura de planta pode ser utilizada como critério na seleção de cultivares tolerantes, pois é altamente responsiva às condições de déficit hídrico (MACHADO et al., 2009). No entanto, se o estresse for muito severo, esse parâmetro se torna ineficiente na seleção de tolerância à seca entre cultivares. Em nosso estudo foi observado que sob estresse moderado essa característica se manteve, mas sob estresse severo a diferença de altura entre cultivares desapareceu.

A cana-de-açúcar respondeu ao estresse hídrico com redução drástica do número de folhas. A redução das folhas decorre da senescência foliar e da diminuição do surgimento de folhas novas, como mecanismo para diminuir a área transpirante e o gasto metabólico para manutenção dos tecidos (SMIT; SINGELS, 2006; INMAN-BAMBER et al., 2008; SCALON et al., 2011). Em diferentes cultivares de cana-de-açúcar, Pincelli & Silva (2012) observaram que a redução do número de folhas sob estresse hídrico foi menor nas cultivares mais tolerantes. Em nosso estudo, essa característica foi observada na cultivar RB72910, também caracterizada como tolerante à seca em plantios comerciais, apesar de ser menos produtiva que as cultivares modernas.

O estresse hídrico também afetou a largura foliar da cana-de-açúcar, principalmente nas cultivares RB72454 e RB931011. Pincelli; Silva (2012) não observaram um padrão na largura da folha de cultivares de cana-de-açúcar que pudesse ser relacionado com a tolerância ao estresse, mas em seu experimento eles só mantiveram as plantas durante 56 dias sob estresse. De acordo com Holanda et al. (2014) é necessário um longo período de estresse para que alterações morfológicas tornem-se mais evidentes. Em nosso estudo, como o tempo de exposição ao estresse foi bem maior, foi possível identificar diferenças entre as cultivares, sugerindo que a manutenção da largura foliar além de indicar tolerância ao déficit hídrico favorece na produção de biomassa nessas condições.

A redução do número e do tamanho das folhas resultou em redução da área foliar. Assim, a maior redução na área foliar das cultivares RB931011, RB855536 e RB72454, e menor nas cultivares RB72910, RB99382 e RB92579 pode indicar diferenças entre as

mesmas na adaptação ao estresse. A área foliar é extremamente sensível às condições hídricas do solo, sobretudo em cultivares mais sensíveis (SMIT; SINGELS, 2006; PINCELLI; SILVA 2012), o que acaba afetando o processo fotossintético, e conseqüentemente, a produção de biomassa em condições de estresse hídrico (MACHADO et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010; MEDEIROS et al., 2013). Além disso, a redução da área foliar específica, como observado nas cultivares RB72910 e RB92579, indica uma estratégia de aclimatação ao estresse hídrico com maior potencial para manutenção da produção de massa seca. A redução na área foliar específica em plantas sob estresse hídrico indica maior espessura das folhas, podendo auxiliar na conservação de água no tecido foliar e, portanto, permitir uma resposta mais favorável à seca (LOPEZ et al., 1997; TRUJILLO et al., 2013).

O diâmetro do colmo e o comprimento da folha não foram influenciados pelo estresse em nenhuma das cultivares, como constatado também em outros estudos com diferentes cultivares de cana-de-açúcar, respectivamente (DIAS et al., 2012; PINCELLI; SILVA., 2012). Isso sugere que esses parâmetros não são bons indicadores para seleção de cultivares de cana-de-açúcar na tolerância à deficiência hídrica.

As cultivares RB72454 e RB855536 foram as mais produtivas em biomassa na condição de controle. No entanto, estão entre as cultivares que mais reduziram a produção de biomassa quando sob estresse hídrico, como pode ser observado pela análise de componente principal. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos em que o estresse hídrico afetou a produção de biomassa em cana-de-açúcar (MACHADO et al., 2009; MEDEIROS et al., 2013). No entanto, observamos em nossos resultados que cultivares que naturalmente têm baixa produção de biomassa, como a RB72910, também têm menos distúrbios fisiológicos e menor redução de produtividade quando sob estresse hídrico. Isso é bem conhecido na literatura, em que o aumento da rusticidade e tolerância aos estresses leva à diminuição da taxa de crescimento (SCALON et al., 2011). Portanto a cultivar RB72910 pode ser um bom material genético em programas de melhoramento para obtenção de cultivares modernas mais tolerantes à seca. Esse talvez seja o caso da cultivar RB92579, que produziu bem em condições controle e foi a que menos reduziu a massa seca da parte aérea nas condições estressantes, confirmando experiências de plantios comerciais em que essa cultivar é umas das mais produtivas em condições adequadas, e por isso uma das mais plantadas na atualidade.

## 5 CONCLUSÕES

As estratégias desencadeadas pelas cultivares RB92579 e RB72910 como menores reduções das trocas gasosas, índice SPAD, e menor área foliar específica, em condições de estresse hídrico severo, lhes proporcionam melhor capacidade de tolerância à seca, resultando numa menor redução da produção de biomassa. Enquanto isso, a cultivar RB72454, apesar de ser bastante produtiva em condições favoráveis, é afetada negativamente pelo estresse hídrico, com drásticas reduções das trocas gasosas, índice SPAD, eficiência fotoquímica primária e largura da folha, resultando em grande redução da biomassa. As trocas gasosas, largura da folha e área foliar específica são bastante responsivas à alteração da umidade no solo, podendo ser utilizadas para discriminar cultivares de cana-de-açúcar mais tolerantes ao déficit hídrico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRS, H. D.; WEATHERLEY, P. E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 15, p. 413-428, 1962.

BERGONCI, J. I.; BERGAMASCHI, H.; BERLATO, M. A.; SANTOS, A. O. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 1531-1540, 2000.

CARLIN, S. D.; SANTOS, D. M. M. Indicadores fisiológicos da interação entre déficit hídrico e acidez do solo em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1106-1113, 2009.

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**, Acompanhamento da safra brasileira://[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_04\\_18\\_14\\_27\\_1\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_1o\\_lev\\_-\\_16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_18_14_27_1_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_16.pdf) (acessado em setembro de 2016).

DIAS, C. M. O.; CORSATO, C. E.; SANTOS, V. M.; SANTOS, A. F. S. Indicadores fitotécnicos, de produção e agroindustriais em cana de açúcar cultivada sob dois regimes hídricos. **Revista Caatinga**, v. 25, n. 3, p. 58-65, 2012.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Manual de Métodos de Análise de Solos. 2.ed. Rio de Janeiro, **Embrapa**, 1997. 212.p.

ENDRES, L.; SILVA, J. V.; FERREIRA, V. M.; BARBOSA, G. D. S. Photosynthesis and water relations in Brazilian sugarcane. **Open Agriculture Journal**, v. 4, n. 3, p. 31-37, 2010.

GONÇALVES, E. R.; FERREIRA, V. M.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; BARBOSA, T. P.; DUARTE, W. G. 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, p. 378-386, 2010.

GRAÇA, J. P.; RODRIGUES, F. A.; FARIAS, J. R. B.; OLIVEIRA, M. C. N. D.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ZINGARETTI, S. M. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n.3, p. 189-197, 2010.

GUAN, X. K.; SONG, L.; WANG, T. C.; TURNER, N. C.; LI, F. M. Effect of Drought on the Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence and Yield of Six Different-Era Spring Wheat Cultivars. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 201, p. 253-266, 2015.

HASAN, S. A.; RABEI, S. H.; NADA, R. M.; ABOGADALLAH, G. M. Water use efficiency in the drought-stressed sorghum and maize in relation to expression of aquaporin genes. **Biologia Plantarum**, v. 61, n. 1, p. 127-137, 2017.

HERMANN, E. R.; CÂMARA, G. M. S. Um método simples para estimar a área foliar da cana-de-açúcar. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 17, p. 32-34. 1999.

HOLANDA, L. A.; SANTOS, C. M.; SAMPAIO NETO, G. D.; SOUSA, A. P.; SILVA, M. A. Variáveis morfológicas da cana-de-açúcar em função do regime hídrico durante o desenvolvimento inicial. **Irriga**, v. 19, p. 573-584, 2014.

INMAN-BAMBER, N. G.; BONNETT, G. D.; SPILLMAN, M. F.; HEWITT, M. L.; JACKSON, J. Increasing sucrose accumulation in sugarcane by manipulating leaf extension and photosynthesis with irrigation. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 59, n. 1, p. 13-26, 2008.

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.; LAKSHMANAN, P.; PARK, S. Sugarcane for water-limited environments: Theoretical assessment of suitable traits. **Field Crops Research**, v. 134, p. 95-104, 2012.

KALAJI, H. M.; GOVINDJEE, BOSA, K.; KOSCIELNIAK, J.; ZUK-GOŁASZEWSKA, K. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO<sub>2</sub> assimilation of two Syrian barley landraces. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 64-72, 2011.

KONRAD, M. L. F.; SILVA, J. A. B.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v. 64, p. 339-347, 2005.

LOPEZ, F. B.; CHAUHAN, Y. S.; JOHANSEN, C. Effects of timing of drought stress on leaf area development and canopy light interception of short-duration pigeonpea. **Journal Agronomy & Crop Science**, 178, 1-7, 1997.

MACHADO, R. S.; RIBEIRO, R. V.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, D. F. S. P.; MACHADO, E. C.; LANDELL, M. G. de A. Respostas biométricas e fisiológicas ao déficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1575-1582, 2009.

MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, T. C.; ALBUQUERQUE, P. E. P.; KARAM, D.; MAGALHÃES, M. M.; CANTÃO, F. R. O. Caracterização ecofisiológica de linhagens de milho submetidas à baixa disponibilidade hídrica durante o florescimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 8, n. 3, p. 223-232, 2009.

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

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

PEIXOTO, P. H. P.; DA MATTA, F. M.; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, p. 821-832, 2002.

PINCELLI, R. P.; SILVA, M. A. Alterações morfológicas foliares em cultivares de cana-de-açúcar em resposta à deficiência hídrica. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 4, p. 546-556, 2012.

PUTEH, A. B.; SARAGIH, A. A.; ISMAIL, M. R.; MONDAL, M. M. A. Chlorophyll fluorescence parameters of cultivated (*Oryza sativa* L. ssp. indica) and weedy rice (*Oryza sativa* L. var. nivara) genotypes under water stress. **Australian journal of Crop Science**, v. 7, n. 9, p. 1277-1283. 2013.

RICHARDS, L. A. Physical conditions of water in soil. In: BLACK, C. A.; EVANS, D. D.; WHITE, J. L.; CLARK, F. E. (ed.) **Methods of soil analysis - physical and mineralogical properties, including statistics of measurements and sampling**. Madison, ASASSSA, p. 128-152, 1965.

SALES, C. R. G.; RIBEIRO, R. V.; MACHADO, D. F. S. P.; MACHADO, R. S.; DOVIS, V. L.; LAGÔA, A. M. M. A. Trocas gasosas e balanço de carboidratos em plantas de cana-de-açúcar sob condições de estresses radiculares. **Bragantia**, v. 71, p. 319-327, 2012.

SARAIVA, G. F. R.; ANDRADE, R. S.; SOUZA, G. M. Termografia por infravermelho como ferramenta de diagnóstico precoce de estresse hídrico severo em soja. **Agrarian Academy**, v. 1, n. 2, p. 158-169, 2014.

SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; EUZÉBIO, V. L. M.; KODAMA, F. M.; KISSMANN, C. Estresse hídrico no metabolismo e crescimento inicial de mudas de mutambo (*Guazuma ulmifolia* Lam.). **Ciência Floresta**, v. 21, n. 4, p. 655-662, 2011.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 193-201, 2007.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SHARMA, V.; SILVA, J. A. G.; CAPUTO, M. M.; DAMAJ, M. B.; GUIMARÃES, E. R.; FERRO, M. I. T. Use of physiological parameters in screening drought tolerance in sugarcane genotypes. **Sugar Tech**, v. 13, p. 191-197, 2011.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; SANTOS, C. M.; SHARMA, V. Relationships between physiological traits and productivity of sugarcane in response to water deficit. **The Journal of Agricultural Science**, v. 152, n. 01, p. 104-118, 2012.

SILVA, M. A.; SANTOS, C. M.; ARANTES, M. T.; BRUNELLI, M. C.; HOLANDA, L. A. Respostas fisiológicas de cultivares de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica e a reidratação. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 3, p. 28-35, 2013.

SILVA, M. A.; SANTOS, C. M.; VITORINO, H. S.; RHEIN, A. F. L. Pigmentos fotossintéticos e índice SPAD como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 173-181, 2014a.

SILVA, L. A.; BRITO, M. E. B.; SÁ, F. V.; MOREIRA, R. C. L.; SOARES FILHO, W. S.; FERNANDES, P. D. Mecanismos fisiológicos em híbridos de citros sob estresse salino em cultivo hidropônico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, p. 1-7, 2014b.

SMIT, M.A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, v. 98, n. 2-3, p. 91-97, 2006.

TRUJILLO I.; RIVAS, M.; CASTRILLO M. Leaf recovery responses during rehydration after water deficit in two bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 4, p. 360-369, 2013.

VAN DILLEWIJN, C. Botany of sugarcane. **Chronica Botanica**, Waltham, 1952.

VIEIRA, G. H. S.; MANTOVANI, E. C.; SEDIYAMA, G. C.; DELAZARI, F. T. Indicadores morfo-fisiológicos do estresse hídrico para a cultura da cana-de-açúcar em função de lâminas de irrigação. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 65-75, 2014.

### CAPÍTULO III

## UM EFICIENTE SISTEMA ANTIOXIDANTE ESTÁ ASSOCIADO A MENOR FOTOINIBIÇÃO DA FOTOSSÍNTESE E MAIOR TOLERÂNCIA À SECA DE CANA-DE-AÇÚCAR

### RESUMO

O déficit hídrico é um dos principais fatores que limitam a produção de cana-de-açúcar. Contudo, nessas condições, plantas mais tolerantes aumentam a atividade de enzimas antioxidantes como um mecanismo de proteção antioxidativa capaz de proteger os pigmentos fotossintéticos e as membranas celulares. Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar respostas bioquímicas de cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob condições de estresse hídrico. Para tanto, foram utilizadas seis cultivares: RB72910, RB99382, RB72454, RB92579, RB855536 e RB931011, e três tratamentos hídricos, com base no teor de água disponível no solo (AD), e definidos como: controle, 80 a 100% (AD); estresse hídrico moderado, 40 a 60% (AD), e estresse hídrico severo, 0 a 20% (AD). A cultivar RB72454 foi mais sensível ao déficit hídrico. Essa cultivar aumentou a produção de peróxido de hidrogênio, mas sem aumento da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase. Esse estresse oxidativo levou a peroxidação de lipídeos e degradação das clorofilas, resultando na diminuição da eficiência fotoquímica do PSII. Por outro lado, a cultivar RB92579 foi a mais tolerante à seca, com aumento da atividade das enzimas antioxidantes, que levou a baixa peroxidação de lipídeos, manutenção da clorofila e da eficiência fotoquímica do PSII. O sistema de defesa antioxidante desencadeado pelas enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase parece ser o fator chave de proteção à fotoinibição de plantas de cana-de-açúcar sob estresse hídrico. O aumento do sistema antioxidante, bem como a manutenção dos pigmentos fotossintéticos e das membranas celulares serviram como critérios para discriminar cultivares mais tolerantes ao estresse hídrico.

**Palavras-chaves:** Déficit hídrico. Clorofilas. Fotoxidação. Espécies Reativas de Oxigênio.

### 1 INTRODUÇÃO

Em países tropicais, a cana-de-açúcar é uma das culturas mais importante economicamente devido à sua utilização tanto na indústria alimentícia, quanto na produção de biocombustíveis renováveis, sendo o Brasil o maior produtor mundial com produção estimada para a safra 2016/17 de 690,98 milhões de toneladas, e crescimento da área plantada de 4,8%

(CONAB, 2016). Entretanto, a introdução de novas áreas tem sido limitada, devido a vários fatores. Entre eles, o aquecimento global que tem provocado mudanças nos padrões de precipitação, mesmo nas regiões onde é tradicionalmente cultivada, aumentando a ocorrência dos eventos de seca, e afetando consideravelmente a produção da cultura (ST CLAIR; LYNCH, 2010; SILVA et al., 2013; VIEIRA et al., 2014).

Esses fatores têm proporcionado um dos maiores desafios para o futuro da agricultura mundial, lidar com a disponibilidade de água cada vez menor o que tem despertado de maneira efetiva o interesse e/ou necessidade de encontrar estratégias de convivência com essa realidade. Uma das principais estratégias que vem sendo explorada é o conhecimento de materiais genéticos com maior capacidade de tolerar o déficit hídrico (Cia et al., 2012; Silva et al., 2012).

A ocorrência de déficit hídrico afeta a absorção e aproveitamento da energia luminosa nos fotossistemas através da degradação dos pigmentos fotossintéticos, apontados como características de extrema importância para tolerância à seca (JALEEL et al., 2009). Em condições de deficiência hídrica, cultivares que conseguem manter os teores de pigmentos estáveis são relatadas como tolerantes (SILVA et al., 2014, CHEN et al., 2016). Assim, esses pigmentos quando danificados, conseqüentemente, afetam o aparato fotossintético e a produtividade do vegetal (SILVA et al., 2012; CARLIN et al., 2012).

Além disso, sob condições de deficiência hídrica e alta luminosidade as plantas sofrem distúrbios em função do excesso de elétrons nos sistemas de transporte dos tilacóides e dos fotossistemas, o que causa uma sobre-excitação dos centros de reação dos Fotossistemas I e II, elevando a produção de EROs, espécies reativas de oxigênio (CARVALHO, 2008). Essas EROs alteram o estado redox nos cloroplastos, desencadeando o estresse oxidativo que causa efeitos negativos sobre o metabolismo das plantas, como oxidação dos lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucléicos (CARLIN et al., 2012; SALES et al., 2013). Nessas condições, as plantas podem desenvolver mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para aumentar a tolerância ou adaptação às condições de estresse e, assim, minimizar as EROs que são formadas em consequência do estresse (WENG et al., 2015; LI et al., 2014).

Os danos oxidativos causados pelas EROs prejudicam efetivamente o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade das plantas, o que acaba prejudicando o rendimento das culturas agrícolas, como a cana-de-açúcar (SALES et al., 2013; SANTOS; SILVA, 2015). Nessa cultura, as cultivares mais tolerantes à seca, geralmente, apresentam maior capacidade antioxidante através de altas atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), e menores concentrações de peróxido de hidrogênio e

peroxidação lipídica (CIA et al., 2012; BOARETTO et al., 2014; CHEN et al., 2016). Como consequência destas respostas fisiológicas, o crescimento das plantas é menos afetado pelo estresse, uma vez que o aparato fotossintético é protegido quando há atividade de enzimas antioxidantes (BOARETTO et al., 2014; SALES et al., 2015).

Diversos estudos com cana-de-açúcar vêm utilizando abordagens bioquímicas, de natureza enzimática e não enzimática, na seleção de cultivares tolerantes ao estresse hídrico (BOARETTO et al., 2014; SANTOS; SILVA, 2015; SALES et al., 2015). Contudo, a maioria deles foi realizada em cana-planta, fazendo com que investigações num outro ciclo da cultura se torne extremamente importante, visto que a cultura geralmente é renovada somente depois de cinco ou mais anos de cultivo e pouco se sabe sobre os seus mecanismos de tolerância à seca, a partir do segundo ciclo. Para isso, esse trabalho teve como objetivo avaliar as implicações do estresse hídrico no metabolismo da cana-de-açúcar no segundo ciclo, por meio da quantificação dos pigmentos fotossintéticos, enzimas do sistema antioxidante e peroxidação de lipídeos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal e condições experimentais**

O experimento foi conduzido sob as coordenadas 9°28' S, 35°49' W, a 127 m de altitude. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 6 x 3, com seis cultivares de cana-de-açúcar e três regimes hídricos, distribuídos em quatro blocos, totalizando 72 parcelas experimentais. As cultivares de cana-de-açúcar utilizadas foram RB72910, RB99382, RB72454, RB855536, RB92579 e RB931011.

Os tratamentos hídricos foram baseados na capacidade de água disponível no solo, e definidos como: controle, 80 a 100% (AD); estresse hídrico moderado, 40 a 60% (AD) e estresse hídrico severo, 0 a 20% (AD). A parcela experimental foi composta por um vaso de 0,485 m de diâmetro médio e 0,99 m de altura, preenchidos com aproximadamente 180 kg de solo destorroado, peneirado e homogeneizado. Os vasos foram distribuídos em arranjo espacial de 1,0 x 1,0 m entre as extremidades das linhas e fileiras, respectivamente, a céu aberto.

O solo utilizado foi um Latossolo Amarelo coeso. As análises físico-químicas foram realizadas seguindo a metodologia da Embrapa (1997), e a curva de retenção de umidade foi estimada utilizando-se a metodologia de Richards (1965), como mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Propriedades químicas e físicas do solo utilizado no experimento.

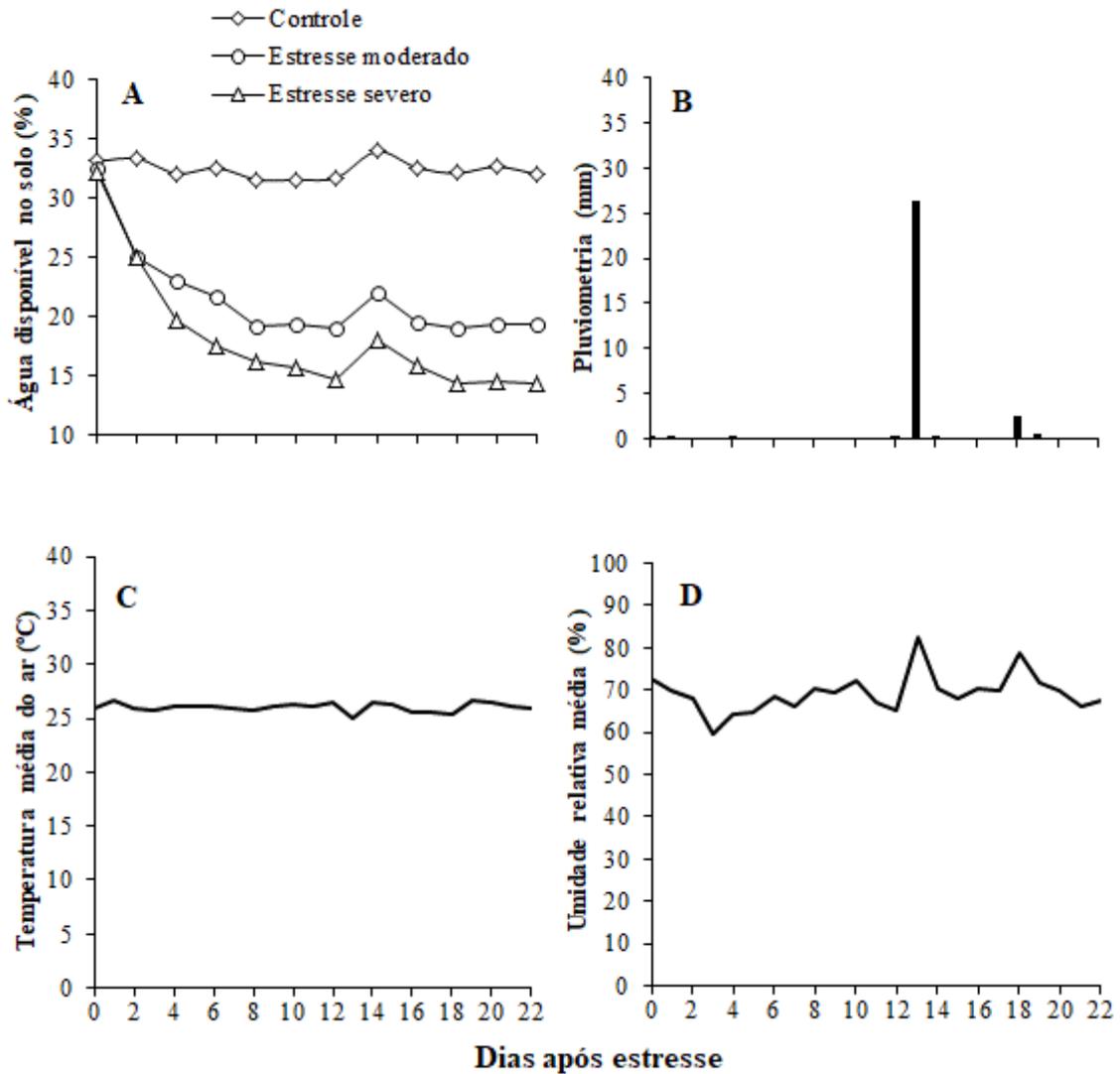
Análise do solo	
	Química
Condutividade elétrica	0,32 dS m <sup>-1</sup>
pH	6,3
Ca <sup>2+</sup>	7,61 cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
Mg <sup>2+</sup>	4,41 cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
Na <sup>+</sup>	0,26 cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
K <sup>+</sup>	0,18 cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
P	49 mg kg <sup>-1</sup>
Al <sup>3+</sup>	0,00 cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>
Matéria orgânica	35,60 g kg <sup>-1</sup>
	Física
Porosidade total	56,2%
Densidade global	1,17 g cm <sup>-3</sup>
Areia	637,6 g kg <sup>-1</sup>
Silte	205,9 g kg <sup>-1</sup>
Argila	156,5 g kg <sup>-1</sup>
classificação Textural	Franco argilo arenoso
Tensão (MPa)	Conteúdo de água (%)
0,033	27,72
1,5	14,76
Água disponível	12,96

Os rebolos utilizados para o plantio (19/02/2014) foram padronizados levando-se em consideração a idade, estado sanitário, e região do colmo da cana semente e foram plantados previamente em bandejas plásticas mantidas sob telado até que as plântulas atingissem três folhas definidas, aptas ao transplantio. Decorridos 30 dias após o plantio, foram selecionadas três plântulas, de tamanho uniforme, para cada vaso. Aos 240 dias após o plantio, a cana-planta foi cortada iniciando-se o segundo ciclo. Em seguida, os vasos foram irrigados regularmente na capacidade de campo, até a implantação dos tratamentos hídricos que tiveram início 60 dias após. Foi realizado o desbaste do perfilhamento deixando-se seis plantas de tamanho uniforme em cada vaso.

Durante o período de estresse hídrico a umidade do solo foi monitorada em cada vaso através de uma sonda de umidade de solo (Moisture Meter PR2, Delta T Devices, England) que avalia a umidade a cada 10 cm, até a profundidade de 40 cm. A reposição da água foi feita por sistema de irrigação pressurizada, com um emissor por parcela, deixando-se cada tratamento hídrico na sua faixa de umidade (Figura 1A). Os dados climáticos referentes ao

período experimental foram obtidos por uma estação agrometeorológica automática, localizada a aproximadamente 200 m do experimento (Figura 1B, C e D).

**Figura 1.** Umidade do solo com cultivares de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos hídricos no segundo ciclo de cultivo (A), pluviometria (B), temperatura média do ar (C) e umidade relativa média do ar (D) durante o período experimental.



Aos 22 dias após estresse (DAE) foi avaliada a eficiência fotoquímica máxima do PSII nas folhas +1 em um perfilho de cada parcela. A classificação das folhas foi feita de acordo com o sistema Kuyper (VAN DILLEWIJN, 1952). Posteriormente, as folhas +1 foram coletadas, selecionado-se a porção mediana, para análises bioquímicas. Uma parte da folha coletada foi acondicionada em caixa térmica com gelo para análises dos pigmentos

fotossintéticos, e outra parte foi embalada em papel alumínio, devidamente identificada, acondicionada em nitrogênio líquido, e posteriormente colocada em freezer a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises enzimáticas.

## **2.2 Avaliação da eficiência fotoquímica do PSII**

A eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) foi determinada utilizando-se um fluorômetro portátil de luz modulada (PAM 2500, WALZ) seguindo os procedimentos de Maxwell; Johnson (2000). Essas avaliações foram realizadas entre 12 e 13 horas, em folhas pré-adaptadas ao escuro ( $\approx 30$  min) com a utilização de cliques metálicos específicos, colocados no terço médio da folha evitando-se a nervura central.

## **2.3 Conteúdo de pigmentos fotossintetizantes**

Os conteúdos de clorofila *a*, *b*, e os carotenoides foram quantificados utilizando três discos de  $0,8\text{ cm}^2$  de folhas frescas. Os discos foram picotados e acondicionados em tubos de vidro protegidos com papel alumínio contendo 5 ml de acetona a 80%, acondicionados ao abrigo da luz a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Posteriormente, foram feitas as leituras de absorvância dos extratos a 480, 645, 663 nm de comprimento de onda, em espectrofotômetro. Os níveis de clorofila *a*, *b*, e os carotenoides foram então calculados como descrito por Lichtenthaler (1987), e expressos em  $\text{mg g}^{-1}$  MF. Posteriormente, foram calculados o conteúdo de clorofila total ( $a+b$ ), e a razão clorofila  $a/b$ .

## **2.4 Extração e quantificações enzimáticas**

Os extratos para quantificação da atividade das enzimas APX e CAT, e de proteínas solúveis foram obtidos através da maceração a frio com auxílio de almofariz, pistilo e  $\text{N}_2$ . Cerca de 0,1 g de tecido foliar foi submetido a extração em solução contendo 300 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 2 mM de EDTA e 20 mM de ácido ascórbico com adição de 0,3 g de PVPP, perfazendo um volume final de 2000  $\mu\text{L}$ . O extrato foi centrifugado a  $15000 \times g$ , por 10 minutos, a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A extração para quantificação da SOD foi obtido a partir de 0,1 g de tecido vegetal congelado, macerado em 2000  $\mu\text{L}$  do meio de extração contendo Tampão Fosfato de Potássio 300 mM (pH = 7,8).

A quantificação de proteínas foi realizada conforme o protocolo de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), conforme proposto por Giannopolitis; Ries (1977), com

modificações. Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático a 2950  $\mu\text{L}$  do meio de reação composto por: tampão de fosfato de potássio 300 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 100 mM, NBT 75  $\mu\text{M}$ , e riboflavina 2  $\mu\text{M}$ . A amostra de referência foi utilizada apenas o meio de reação sem adição de extrato vegetal. A amostra mais o meio de reação foram iluminados com lâmpada fluorescente de 15 W por 4 minutos, e posteriormente, realizada a absorbância em espectrofotômetro a 560 nm, em triplicata. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio, e expressas em unidade  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade da APX foi obtida seguindo a metodologia de Nakano; Asada (1981). Para a medida de atividade, foi utilizado 50  $\mu\text{L}$  de extrato adicionado a 334  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 300 mM (pH 7,5), 20  $\mu\text{L}$  de ascorbato de sódio 50 mM, 20  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 10 mM e 1576  $\mu\text{L}$  de água deionizada. A atividade da enzima foi determinada pelo acompanhamento da oxidação do ascorbato, a cada 10 segundos, durante um minuto. A reação oxidativa foi monitorada em espectrofotômetro a 290 nm, em triplicata. Uma unidade da atividade da APX foi definida como a conversão de 1  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico em monodehidroascorbato durante um minuto. O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) utilizado nos cálculos para esta enzima foi  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , e expressa em unidade  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

A atividade da CAT foi quantificada segundo Havar; Mchale (1987), com modificações. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foram adicionados a 334  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 300 mM (pH 7,5), 250  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 12,5 mM e 1366  $\mu\text{L}$  de água destilada incubadas a 30 °C. A atividade da enzima foi determinada em espectrofotômetro, pela redução da absorbância a 240 nm, por um minuto, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio, em triplicata. Uma unidade da atividade da CAT foi definida como a degradação de 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante um minuto. O coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) utilizado nos cálculos para esta enzima foi  $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , e expressa como unidade  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

## **2.5 Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e peroxidação de lipídeos**

O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi determinado de acordo com Velikova et al. (2000). Foi macerado cerca de 0,1 g de material fresco congelado, em solução ácida composta por 2000  $\mu\text{L}$  de TCA (ácido tricloroacético) a 0,1% (m/v) e centrifugados a 10000  $\times g$  por 10 minutos, a 4 °C. Em tubos de ensaio contendo 700  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1000  $\mu\text{L}$  de iodeto de potássio 1 M, foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e a mistura incubada por 10 min a 30 °C. Posteriormente, a absorbância foi realizada a 390 nm,

em triplicata, e o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi calculado por meio de uma curva padrão de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) estabelecida previamente, expresso em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF.

A peroxidação lipídica foi determinada pela quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como descrito por Cakmak; Horst (1991) com pequenas modificações. Foi macerado cerca de 0,1 g com 2000  $\mu\text{L}$  de TCA 0,1%. O homogeneizado foi então centrifugado a 10000  $\times$  g por 10 minutos a 4 °C. Alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram adicionadas a 1700  $\mu\text{L}$  do meio de reação composto por ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (m/v) e TCA 10% (m/v), e incubados a 90 °C por 60 minutos com interrupção da reação pelo rápido resfriamento em banho de gelo. Os extratos foram novamente centrifugados sob mesma rotação e tempo anteriores, para clareamento e ausência de interferentes. A absorbância da amostra foi determinada a 532 nm, em triplicata, e para se obter os valores de absorbância líquida, o valor foi descontado da absorbância inespecífica a 600 nm. A peroxidação de lipídeos através da quantificação de MDA foi expressa em  $\text{nmol g}^{-1}$  MF.

## 2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e quando detectado efeito significativo para as interações, os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$ , dentro dos desdobramentos, tanto entre regimes hídricos quanto entre cultivares. A correlação de Pearson ( $r$ ) foi utilizada para verificar a relação entre as variáveis analisadas dentro de cada condição hídrica.

## 3 RESULTADOS

O resumo da análise de variância com as respostas das cultivares, dos tratamentos hídricos, e cultivares *versus* tratamentos hídricos para pigmentos fotossintéticos, eficiência fotoquímica máxima do PSII, atividade das enzimas antioxidantes, peróxido de hidrogênio, e peroxidação de lipídeos são apresentados na Tabela 2.

### 3.1 Conteúdo de pigmentos fotossintetizantes

O conteúdo de pigmentos variou entre as cultivares de cana-de-açúcar mesmo sem estresse hídrico (Figuras 2A, B, C, D). De um modo geral, houve redução do teor de clorofila quando as plantas foram submetidas ao estresse. No entanto, a resposta foi diferente entre as cultivares. O estresse moderado foi suficiente para reduzir o teor de clorofila *a* em todas as cultivares, menos na RB855536 e RB92579 (Figura 2A). Por outro lado, a cultivar RB72454 foi a que mais reduziu a clorofila *a* nessas condições, com redução de 40%. Já sob estresse

severo, todas as cultivares reduziram o teor de clorofila *a*, com maior redução também na RB72454, de 43,2%.

O conteúdo de clorofila *b* não foi alterado entre os tratamentos hídricos na cultivar RB855536 (Figura 2B). Sob estresse moderado a cultivar RB72454 teve a maior redução, de 35,1%, em relação ao controle, enquanto a cultivar RB92579 reduziu apenas 8,9%. Já sob estresse severo a redução da clorofila *b* foi de 50,7% na cultivar RB72454, e apenas 22,1% na RB92579.

A cultivar RB72454 teve a maior redução do conteúdo de clorofila total sob estresse moderado, com redução de 38,8%, enquanto a redução foi apenas 8,9% na RB92579 em relação ao controle (Figura 2C). Já sob estresse severo a redução foi de 45% na cultivar RB72454, e de apenas 14,5% na RB92579.

A razão clorofila *a/b* não foi afetada pelos tratamentos hídricos nas cultivares RB855536, RB92579 e RB931011 (Figura 2D). Por outro lado, sob estresse severo a razão clorofila *a/b* aumentou 21,5% na cultivar RB99382, 17,2% na RB72910 e 12,7% na RB72454 em relação ao controle.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância de parâmetros fisiológicos em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo.

<b>Parâmetros fisiológicos</b>	<b>Variáveis</b>	<b>FV</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Eficiência fotoquímica	Fv/Fm	C	26,24	0,000***
		W	7,19	0,000***
		CxW	3,36	0,003***
Pigmentos fotossintéticos	Chl <i>a</i>	C	62,80	0,000***
		W	159,52	0,000***
		CxW	6,37	0,000***
	Chl <i>b</i>	C	10,85	0,000***
		W	66,22	0,000***
		CxW	2,46	0,017*
	Chl <i>a/b</i>	C	4,54	0,001**
		W	5,77	0,005**
		CxW	2,30	0,025*
	Chl total	C	2,35	0,000***
		W	174,94	0,000***
		CxW	5,206	0,000***
Carotenoides	C	39,34	0,000***	
	W	136,46	0,000***	
	CxW	4,21	0,000***	
Enzimas antioxidantes	SOD	C	96,20	0,000***
		W	157,62	0,000***
		CxW	0,26	0,000***
	APX	C	43,67	0,000***
		W	59,384	0,000***
		CxW	14,28	0,000***
	CAT	C	29,03	0,000***
		W	72,65	0,000***
		CxW	4,76	0,000***
Espécie reativa de oxigênio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	C	23,42	0,000***
		W	91,22	0,000***
		CxW	8,97	0,000***
Peroxidação de lipídeos	MDA	C	10,61	0,000***
		W	112,93	0,000***
		CxW	5,01	0,000***

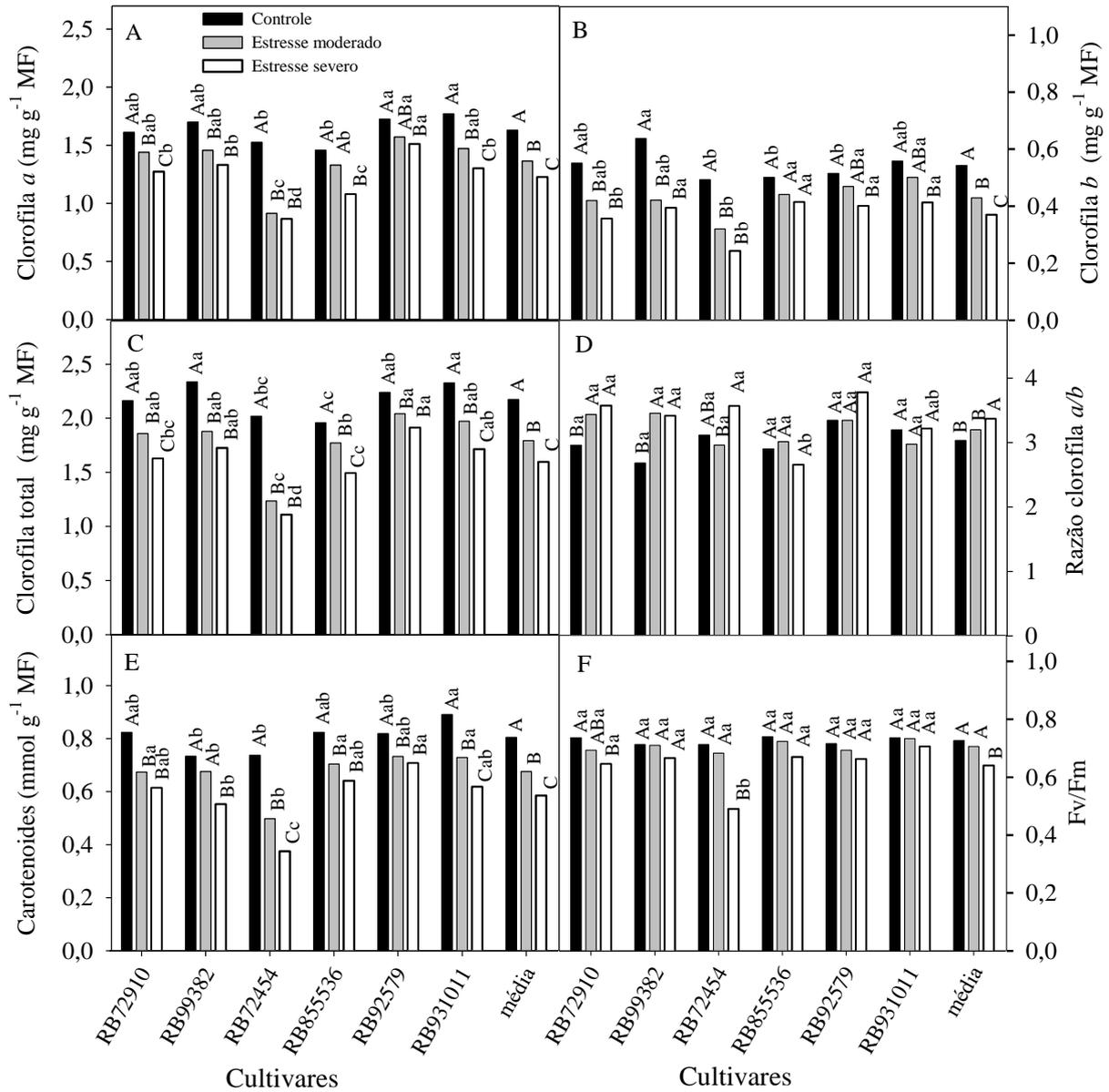
FV: fontes de variação; F: F calculado; P: probabilidade de significância; \*, \*\* e \*\*\* significativo a p<0,05, <0,01 e <0,001, respectivamente.

O conteúdo de carotenoides não foi alterado entre o tratamento controle e o estresse moderado nas cultivares RB99382 e RB92579. A cultivar RB72454 foi a que mais reduziu os carotenoides, em 32,4% sob estresse moderado e em 49,1% sob estresse severo em relação ao controle (Figura 2E). Já os carotenoides da cultivar RB92579 reduziram apenas 13,5%, sob estresse severo. As clorofilas *a* e *b* tiveram alta correlação com a Chl total em todas as condições hídricas (Tabela 3). Por outro lado, o conteúdo de carotenoides se correlacionou com os outros pigmentos apenas quando as plantas estavam sob estresse.

### **3.2 Eficiência fotoquímica do PSII**

A eficiência fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ) foi afetada apenas sob estresse severo, em que as cultivares RB72910 e RB72454 tiveram redução de 12,2 e 31,3%, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Figura 2F).

**Figura 2.** Teores de pigmentos fotossintéticos: clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C), razão clorofila *a/b* (D), carotenoides (E) e eficiência fotoquímica máxima do PSII – Fv/Fm (F) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo.



Barras seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos hídricos dentro de cada cultivar, e minúsculas entre cultivares dentro de cada tratamento hídrico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A média representa o efeito isolado dos tratamentos hídricos.

### 3.3 Enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas SOD, APX e CAT nas folhas não variou entre as cultivares quando sob tratamento controle, mas aumentou com a presença do estresse hídrico (Figuras

3A, B, C). A atividade de SOD aumentou com a imposição do estresse (Figura 3A). A cultivar RB92579 teve o maior aumento da atividade de SOD, de 19,7% sob estresse moderado, e de 57,8% sob estresse severo, em relação ao controle. Por outro lado, a cultivar RB72454 foi a que menos aumentou a atividade da SOD, 18% mesmo sob estresse severo. A atividade da SOD não teve correlação com os pigmentos e nem com as outras enzimas antioxidantes em plantas sob tratamento controle, mas teve correlação sob estresse moderado, e essa correlação aumentou sob estresse severo (Tabela 3).

Semelhante à SOD, a atividade da enzima APX teve maior aumento na cultivar RB92579, de 29,3% sob estresse moderado, e 59,8% sob estresse severo, em relação às plantas sob tratamento controle (Figura 3B). Um aumento parecido da APX foi observado na RB72910. Por outro lado, as cultivares RB99382 e RB72454 não tiveram alteração na atividade da APX quando sob estresse hídrico.

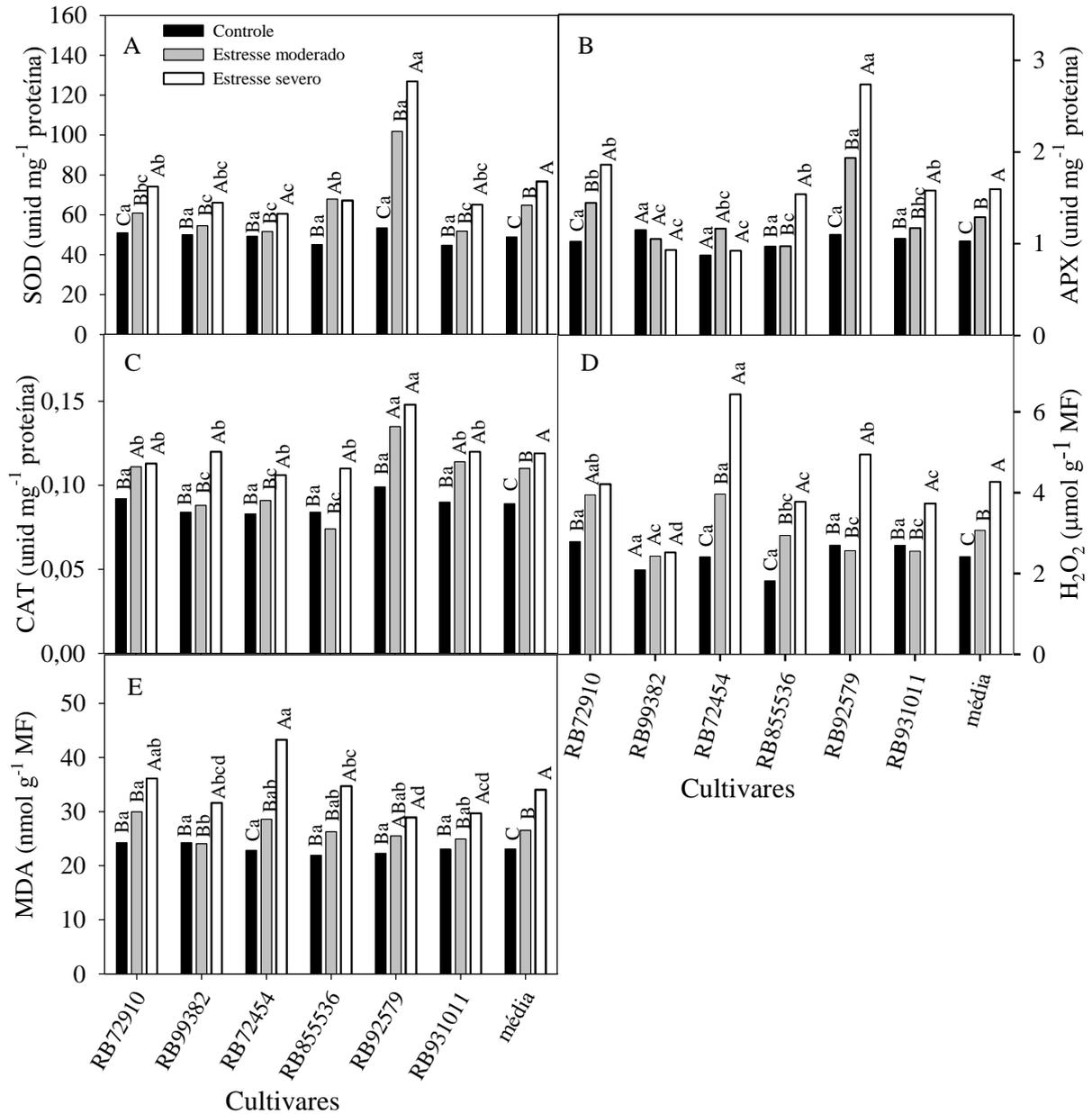
A atividade da CAT também aumentou sob as condições de estresse, em que a cultivar RB92579 teve o maior aumento sob estresse severo, de 33,1% em relação ao controle (Figura 3C). A atividade da CAT teve correlação positiva somente com Chl *a* em plantas sob condições controle. Em plantas sob estresse hídrico a atividade da CAT passou a ter também correlação com Chl total, carotenoides e APX (Tabela 3).

**Tabela 3.** Correlação de Pearson entre clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), clorofila total (Chl *t*), razão clorofila *a/b* (Chl *a/b*), carotenoides (Carot), eficiência fotoquímica máxima do Fotossistema II (Fv/Fm), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e teor de malondialdeído (MDA) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: Controle (C), Estresse hídrico moderado (EM) e Estresse hídrico severo (ES).

Trat.	Var.	Chl <i>b</i>	Chl <i>t</i>	Chl <i>a/b</i>	Carot	Fv/Fm	APX	CAT	SOD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MDA
<b>C</b>	Chl <i>a</i>	0.52**	0.94**	0.12	0.03	-0.26	0.50*	0.41*	-0.02	0.38	0.31
	Chl <i>b</i>		0.78**	-0.76**	-0.29	-0.29	0.52**	0.03	-0.14	-0.00	0.38
	Chl <i>t</i>			-0.21	-0.09	-0.30	0.57**	0.31	-0.07	0.28	0.38
	Chl <i>a/b</i>				0.33	0.13	-0.24	0.24	0.17	0.30	-0.21
	Carot					0.56**	-0.09	0.05	-0.11	0.16	-0.34
	Fv/Fm						-0.08	0.02	-0.24	0.03	-0.09
	APX							0.32	-0.13	-0.00	0.02
	CAT								-0.12	0.30	0.12
	SOD									0.38	0.13
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>										0.11
	<b>EM</b>	Chl <i>a</i>	0.77**	0.98**	0.31	0.72**	0.14	0.35	0.49*	0.45*	-0.60**
Chl <i>b</i>			0.86**	-0.35	0.55**	0.36	0.13	0.38	0.29	-0.55**	-0.46*
Chl <i>t</i>				0.15	0.71**	0.20	0.31	0.48*	0.43*	-0.62**	-0.41*
Chl <i>a/b</i>					0.21	-0.30	0.29	0.14	0.18	-0.04	0.17
Carot						0.14	0.33	0.44*	0.49*	-0.48*	-0.40*
Fv/Fm							-0.38	-0.15	-0.32	-0.30	-0.43*
APX								0.74**	0.73**	-0.03	0.11
CAT									0.54**	-0.12	-0.04
SOD										-0.31	-0.14
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>											0.76**
<b>ES</b>		Chl <i>a</i>	0.52**	0.97**	0.37	0.64**	0.21	0.62**	0.69**	0.63**	-0.44*
	Chl <i>b</i>		0.71**	-0.58**	0.65**	0.39	0.38	0.38	0.24	-0.55**	-0.61**
	Chl <i>t</i>			0.14	0.71**	0.28	0.61**	0.68**	0.59**	-0.51**	-0.83**
	Chl <i>a/b</i>				-0.12	-0.18	0.17	0.24	0.33	0.19	-0.07
	Carot					0.40	0.75**	0.53**	0.58**	-0.40*	-0.67**
	Fv/Fm						-0.00	-0.13	-0.14	-0.45*	-0.22
	APX							0.72**	0.87**	0.08	-0.48*
	CAT								0.82**	-0.10	-0.66**
	SOD									0.15	-0.44*
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>										0.48*

Trat.: tratamentos hídricos; Var.: variáveis; \*\* significativo a  $p < 0,01$ , \* significativo a  $p < 0,05$ .

**Figura 3.** Atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (A), ascorbato peroxidase (B) e catalase (C); conteúdo de peróxido de hidrogênio -  $H_2O_2$  (D) e conteúdo de malondialdeído - MDA (E) em cultivares de cana-de-açúcar no segundo ciclo de cultivo sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico moderado e estresse hídrico severo.



Barras seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos hídricos dentro de cada cultivar, e minúsculas entre cultivares dentro de cada tratamento hídrico, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A média representa o efeito isolado dos tratamentos hídricos.

### 3.4 Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peroxidação de lipídeos

O conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a peroxidação lipídica não variaram entre as cultivares em plantas não estressadas, mas aumentaram com a intensidade do estresse hídrico (Figura 3D, E). O conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teve o maior aumento na cultivar RB72454, de 38,4% sob estresse moderado, e 62,5% sob estresse severo, em relação às plantas controle (Figura 3D). O mesmo ocorreu com a peroxidação lipídica da cultivar RB72454 que teve um aumento de 34% sob estresse moderado, e 47,2% sob estresse severo (Figura 3E). Por outro lado, a peroxidação de lipídeos nas demais cultivares aumentou apenas sob estresse severo, tendo o menor aumento na cultivar RB92579, de 22,8%. É interessante observar que o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a peroxidação de lipídeos começaram a ter correlação negativa com as clorofilas e carotenoides quando as plantas estavam sob estresse moderado, e permanecendo sob estresse severo (Tabela 3). A peroxidação de lipídeos também teve correlação negativa com a atividade das enzimas antioxidantes sob estresse severo, ao passo que peroxidação de lipídeos e conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiveram correlação positiva quando as plantas estavam sob estresse.

#### 4 DISCUSSÃO

A redução nos teores das clorofilas à medida que se intensificou o estresse hídrico sugere que a degradação dos pigmentos está ligada à desestruturação dos cloroplastos como resposta ao estresse, e pode ser associada com a tolerância à seca (JALEEL et al., 2009; CHEN et al., 2016). A manutenção dos teores das clorofilas na cultivar RB92579, e a degradação na RB72454 sob as condições de estresse hídrico indicam que as cultivares respondem distintamente ao estresse. A diminuição do teor de clorofila sob estresse hídrico é considerada um sintoma típico de estresse oxidativo, resultante da fotooxidação e degradação dos pigmentos (JUNG, 2004; FAROOQ et al., 2009), expressivamente em cultivares mais sensíveis (CHEN et al., 2016). Tal resposta, provavelmente, ocorreu na cultivar RB72454 que reduziu pronunciadamente o conteúdo de clorofilas.

Por outro lado, a manutenção do teor de clorofila na cultivar RB92579, foi uma importante resposta na tolerância ao estresse hídrico. Em cana-de-açúcar sob déficit hídrico, cultivares mais tolerantes têm respostas semelhantes ou pouca degradação das clorofilas em relação às plantas bem hidratadas (SILVA et al., 2012; 2014). Além de cana-de-açúcar, é relatado em outras gramíneas que o estresse hídrico também afeta o teor de clorofila, como em milho (KHOLOVÁ et al., 2011; CHEN et al., 2016) e trigo (NIKOLAEVA et al., 2010). Das inúmeras mudanças nas funções metabólicas das plantas causadas pelo estresse, uma das que mais reflete no rendimento das plantas é a alteração dos pigmentos, pois estes são

responsáveis pela absorção e transferência da energia luminosa para os fotossistemas (FAROOQ et al., 2009; JALEEL et al., 2009).

A degradação nos teores de clorofila *a* e *b*, e conseqüentemente de clorofila total, pode decorrer de perturbações fotoquímicas ocasionadas pelo excesso de luminosidade nos centros de reação do PSII (KHOLOVÁ et al., 2011; SALES et al., 2015), como observado em nossos resultados pela diminuição de  $F_v/F_m$  na cultivar RB72454. Isso pode estar relacionado à alta degradação dos pigmentos fotossintéticos e à baixa atividade das enzimas antioxidantes. A diminuição gradual dos teores de clorofila total causada pelo estresse hídrico em plantas de cana-de-açúcar é um dos principais fatores que limitam a atividade fotossintética por afetar a eficiência fotoquímica máxima (SILVA et al., 2014; SANTOS; SILVA, 2015). Em cultivares de cana-de-açúcar sensíveis ao estresse hídrico, a diminuição de  $F_v/F_m$  foi relacionada a perturbações nos centros de reação do PSII, comprometendo a produtividade da cultura pela dificuldade em alocar fotoassimilados (CARLIN et al., 2012; SALES et al., 2015).

A manutenção dos carotenoides na cultivar RB92579 sob estresse hídrico sugere que esta cultivar tem maior proteção contra oxidação fotoquímica durante o estresse oxidativo, minimizando a degradação das clorofilas. As correlações entre carotenoides e clorofilas sob estresse indicam que a manutenção dos carotenoides foi fundamental no auxílio contra os danos causados pelo estresse, pois estes pigmentos têm papéis adicionais nos cloroplastos como a absorção de luz e fotoproteção, ajudando as plantas na tolerância às adversidades do estresse (JALEEL et al., 2009; KHOLOVÁ et al., 2011). Dessa maneira, é esperado que cultivares que mantêm maiores quantidades de carotenoides durante o estresse possuem maior proteção contra a fotooxidação (SILVA et al., 2014) como observado na cultivar RB92579, e relatado também em cultivares de milho mais tolerantes à seca (KHOLOVÁ et al., 2011; CHEN et al., 2016). Por outro lado, a maior degradação de carotenoides associada à baixa razão  $F_v/F_m$ , baixa atividade enzimática e aumento da peroxidação de lipídeos pode indicar danos no aparato fotossintético, o que provavelmente aconteceu com a cultivar RB72454. Em cana-de-açúcar sob estresse hídrico houve maior degradação de carotenoides em cultivares sensíveis (SILVA et al., 2014). A degradação de carotenoides inibe a função fotoprotetora das plantas aumentando a chance de fotooxidação sob condição de estresse hídrico (SILVA et al., 2014; CHEN et al., 2016).

As respostas das enzimas SOD, APX E CAT variam dependendo da cultivar analisada, pois diversos mecanismos adaptativos são apresentados por diferentes cultivares (CIA et al., 2012), como constatado em nosso estudo. Em cana-de-açúcar sob estresse hídrico, a atividade de enzimas antioxidantes promove a fotoproteção do aparelho fotossintético (Sales et al.,

2013; BOARETTO et al., 2014), provavelmente por auxiliar na manutenção dos pigmentos, na razão Fv/Fm, e por inibir o aumento da peroxidação de lipídeos (CARVALHO, 2008; ANJUM et al., 2016).

O aumento da atividade de enzimas na limpeza de EROs tem sido relatado em cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico quando comparadas às sensíveis, sugerindo que o sistema antioxidante desempenha um papel importante na tolerância das plantas ao déficit hídrico como observado em arroz (LUM et al., 2014), milho (CHEN et al., 2016) e trigo (NIKOLAEVA et al., 2010; CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012).

A maior atividade da SOD em resposta ao estresse hídrico na cultivar RB92579 funciona como um indicativo do papel-chave dessa enzima na tolerância ao estresse (JUNG, 2004; SALES et al., 2015). O aumento da atividade de SOD na cultivar RB92579 também foi encontrado sob estresse salino (MEDEIROS et al., 2014). Em cultivares de cana-de-açúcar sob estresse hídrico, o conteúdo de SOD aumentou 28% na cultivar tolerante, e 6% na cultivar sensível à seca (SALES et al., 2015). O aumento da atividade de SOD também foi registrado em plantas de diferentes espécies sob estresse hídrico como milho (ANJUM et al., 2016), arroz (LUM et al., 2014), feijão-fava (SIDDIQUI et al., 2015) e trigo (CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012). Nessas plantas, a SOD atuou eficientemente na proteção dos danos oxidativos causados tanto pela duração quanto pela intensidade do déficit hídrico sendo, portanto, considerada como um indicativo de tolerância ao estresse hídrico (CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012; SIDDIQUI et al., 2015).

A alta atividade de APX na cultivar RB92579 indica bom desempenho desta cultivar contra o estresse oxidativo ocasionado pelo estresse hídrico, como visualizado também pela manutenção dos pigmentos, de Fv/Fm, além da baixa peroxidação de lipídeos. O aumento da atividade de APX na cultivar RB92579 também foi observado em plantas sob estresse salino (MEDEIROS et al., 2014). A atividade de APX parece ser rapidamente ativada em plantas estressadas, com o propósito de aliviar os danos fotoquímicos (SALES et al., 2013). Em cultivares de trigo, após três dias sob déficit hídrico, houve aumento da atividade de APX nas folhas das plantas estressadas, o que ajudou a diminuir a peroxidação de lipídeos (NIKOLAEVA et al., 2010). O aumento de APX tem sido observado em cultivares de cana-de-açúcar mais tolerantes ao déficit hídrico (NGAMHUI et al., 2015). Esses autores observaram que a atividade de APX, foi 15% maior na cultivar mais tolerante que na cultivar mais sensível.

Por outro lado, a baixa atividade de APX na cultivar RB72454 sob estresse pode ter contribuído para o aumento de danos fotoquímicos, como observado pelo aumento da

fotoinibição e do conteúdo de  $H_2O_2$ , o que induziu a maior degradação de clorofilas e peroxidação de lipídeos nessa cultivar. Fato que pode ser confirmado pelas correlações positivas de APX com Chl *a*, Chl total e Car em nosso trabalho. Essas correlações sugerem que a concentração de APX auxiliou na manutenção dos níveis de pigmentos sob as condições de estresse na cultivar RB92579, mas não na RB72454. Em outros estudos com cana-de-açúcar sob deficiência hídrica foram observados aumento de APX em cultivares mais tolerantes à seca sugerindo que essa enzima é eficiente no alívio do estresse oxidativo (NGAMHUI et al., 2015; SANTOS; SILVA, 2015).

Das enzimas antioxidantes avaliadas em nosso estudo, a CAT foi a que menos se alterou com a presença do estresse, o que pode ter ocorrido por esta enzima ser essencialmente dos peroxissomas. Em plantas C4, como a cana-de-açúcar, a fotorrespiração é mínima, e conseqüentemente há menor atividade de CAT do que em plantas C3 (CARMO-SILVA et al., 2008). Contudo, mesmo em baixa concentração, sugere-se que essa enzima teve participação essencial na remoção de EROs, em conjunto com a APX e a SOD, como observado na cultivar RB92579. A CAT é o segundo composto enzimático de defesa antioxidante, atuando principalmente na decomposição do  $H_2O_2$  produzido pela SOD (MITTLER, 2002). Em cultivares de milho, maior atividade de CAT foi encontrada na cultivar mais tolerante à seca (ANJUM et al., 2016), indicando que o aumento da atividade dessa enzima protege contra os danos oxidativos causados com o agravamento do estresse (CIA et al., 2012; BOARETTO et al., 2014).

A ação conjunta das enzimas SOD, APX e CAT pode ser visualizada pela correlação positiva da atividade delas, somente sob estresse moderado e severo. Além disso, as correlações de SOD, APX e CAT com Chl *a*, Chl total e Carot sob estresse severo, indicam que as enzimas são eficientes na proteção do aparelho fotossintético das plantas estressadas, ajudando a manter os pigmentos e membranas, com a baixa peroxidação de lipídeos. Dessa maneira, o aumento da atividade de SOD, APX e CAT pode indicar que a produtividade nas cultivares mais tolerantes, não seja drasticamente afetada pelo estresse, podendo ser associada à manutenção das clorofilas, dos carotenoides, e redução da peroxidação de lipídeos (JUNG, 2004; BOARETTO et al., 2014; SALES et al., 2015; ANJUM et al., 2016).

O  $H_2O_2$  é formado através da dismutação do  $O_2^{\cdot -}$  pela SOD, e pode ser eliminado por catalase e várias peroxidases, como a APX (MITTLER, 2002; BOARETTO et al., 2014). Assim, a concentração de  $H_2O_2$  também está relacionada com a atividade de SOD (WENG et al., 2015), como encontrado em nosso estudo, em que a cultivar RB92579 teve alta atividade de SOD e uma ligeira produção de  $H_2O_2$ , especificamente no estresse severo. Dessa maneira,

podemos sugerir que o conteúdo de  $H_2O_2$  nessa cultivar pode ter sido ainda maior, no entanto, parte dele foi decomposta pela ação de APX e CAT, ou ainda, que concentrações de  $H_2O_2$ , geralmente, são produzidas em condições estressantes, como sugerido por Cia et al. (2012). Esses autores observaram que em diferentes cultivares de cana-de-açúcar houve aumento do  $H_2O_2$  em todas elas no início do estresse. Além disso, o  $H_2O_2$  pode funcionar como um mensageiro secundário do estresse, no entanto, se a concentração for muito alta é necessária uma resposta rápida do sistema antioxidante (CARVALHO, 2008; SILVA et al., 2015).

O aumento de  $H_2O_2$  com a imposição do estresse pode estar relacionado à menor tolerância das cultivares ao déficit hídrico, como visto na cultivar RB72454, que teve alta produção de  $H_2O_2$  e, simultaneamente, exibiu degradação dos pigmentos, e menor atividade enzimática de CAT, APX e SOD. Em outros estudos foi observado que os teores de  $H_2O_2$  foram mais elevados em cultivares mais sensíveis do que em cultivares mais tolerantes à seca, como em cana-de-açúcar (BOARETTO et al., 2014; SALES et al., 2015), milho (ANJUM et al., 2016) e feijão-fava (SIDDIQUI et al., 2015).

A peroxidação lipídica interpretada pelo aumento de MDA e induzida pela produção de EROs pode levar a degradação de proteínas, a fragmentação do DNA, e a morte celular (SIDDIQUI et al., 2015; ANJUM et al., 2016), o que provavelmente ocorreu com a cultivar RB72454. De maneira semelhante, o aumento da peroxidação lipídica sob estresse hídrico foi encontrado em milho, mais notável na cultivar sensível (ANJUM et al., 2016), e em espécies lenhosas, em que a peroxidação lipídica foi proporcional à intensidade do estresse (LIU et al., 2011). As elevadas concentrações de MDA sugerem menor proteção das plantas contra a oxidação fotoquímica durante o estresse, associadas ao aumento do  $H_2O_2$  e à baixa atividade das enzimas APX, CAT e SOD como constatado em diferentes estudos (LIU et al., 2011; CHAKRABORTY; PRADHAN, 2012; BOARETTO et al., 2014; MEDEIROS et al., 2014; SIDDIQUI et al., 2015). O mesmo podemos inferir para a cana-de-açúcar, em que encontramos uma correlação inversa entre as atividades das enzimas antioxidantes e MDA em plantas sob estresse severo, e uma correlação positiva entre  $H_2O_2$  e MDA já em plantas sob estresse moderado.

Por outro lado, a cultivar RB92579 que exibiu a menor peroxidação de lipídeos entre as cultivares quando sob estresse severo, sugere que esta foi beneficiada pela manutenção dos pigmentos e pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes. Resultados semelhantes foram encontrados na mesma cultivar sob estresse salino, em que a baixa peroxidação de lipídeos foi atribuída ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes (MEDEIROS et al., 2014).

## 5 CONCLUSÕES

As cultivares de cana-de-açúcar são diferentes na tolerância à seca. Entre as cultivares utilizadas, a RB92579 apresenta mecanismos antioxidativos mais ativos quando submetida ao estresse hídrico. Essa tolerância ao déficit hídrico está associada ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes para manutenção de níveis baixos de EROs. Isso leva a menor peroxidação de lipídeos e manutenção de pigmentos fotossintéticos, fazendo com que haja menos fotoinibição do PSII nas cultivares mais tolerantes ao estresse hídrico, o que não ocorre em cultivares mais sensíveis à seca, como a RB72454. O sistema de defesa antioxidante desencadeado pelas enzimas superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase, bem como a manutenção da integridade das membranas e conteúdo de pigmentos fotossintéticos servem como critérios importantes na avaliação da tolerância à seca em cultivares de cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJUM, S. A.; TANVEER, M.; ASHRAF, U.; HUSSAIN, S.; SHAHZAD, B.; KHAN, I.; WANG, L. Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 17132-17141, 2016.

BOARETTO L.F.; CARVALHO G.; BORGIO, L.; CRESTE, S.; LANDELL, M. G. A.; MAZZAFERA, P.; AZEVEDO, R. A. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 74, p. 165-175, 2014.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-250, 1976.

CAKMAK I.; HORST W.J. Effect of aluminum on lipid-peroxidation, superoxide-dismutase, catalase and peroxidase- activities in toor-tips of soybean (*Glycine max*). **Plant Physiology**, v. 83, p. 463-468, 1991.

CARLIN, S. D.; RHEIN, A. F. L.; SANTOS, D. M. M. Simultaneous effect of water deficiency and aluminum toxicity in the soil in cultivar IAC91-5155 of sugarcane. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 553-564, 2012.

CARMO-SILVA A. E.; POWERS S.J.; KEYS A.J.; ARRABAÇA M.C.; PARRY, M.A.J. Photorespiration in C4 grasses remains slow under drought conditions. **Plant Cell Environment**, v. 31, p. 925-940, 2008.

CARVALHO M. H. C. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v.3, p. 156-165, 2008.

CHEN, D.; WANG, S.; CAO B.; CAO, D.; LENG, G.; LI, H.; YIN, L.; SHAN, L.; DENG, X. Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-15, 2016.

CHAKRABORTY U.; PRADHAN, B. Oxidative stress in five wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) exposed to water stress and study of their antioxidant enzyme defense system, water stress responsive metabolites and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, p. 117-130, 2012.

CIA, M.C.; GUIMARÃES, A.C.R.; MEDICI, L.O.; CHABREGAS, S.M.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant response to water deficit by drought-tolerant and sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, p. 313-324. 2012.

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**, Acompanhamento da safra brasileira://[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_04\\_18\\_14\\_27\\_1\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_1o\\_lev\\_-\\_16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_18_14_27_1_boletim_cana_portugues_-_1o_lev_-_16.pdf) (acessado em: setembro de 2016).

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Manual de Métodos de Análise de Solos. 2.ed. Rio de Janeiro, **Embrapa**, 1997. 212.p.

ENDRES, L.; SILVA, J. V.; FERREIRA, V. M.; BARBOSA, G. D. S. Photosynthesis and water relations in Brazilian sugarcane. **Open Agriculture Journal**, v. 4, n. 3, p. 31-37, 2010.

FAROOQ M.; WAHID A.; KOBAYASHI N.; FUJITA D.; BASRA S. M. A. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, p. 185-212, 2009.

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

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

JALEEL C. A.; MANIVANNAN, P.; WAHID, A.; FAROOQ, M.; AL-JUBURI, H. J.; SOMASUNDARAM, R.; PANNEERSELVAM, R. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 11, n.1, p. 100-105, 2009.

JUNG, S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. **Plant Science**, v. 166, p. 459-466, 2004.

KHOLOVÁ, J.; HASH, C. T.; KOČOVÁ, M.; VADEZ, V. Does a terminal drought tolerance QTL contribute to differences in ROS scavenging enzymes and photosynthetic pigments in pearl millet exposed to drought? **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 99-106, 2011.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Method Enzymology**, v. 148, 350-382, 1987.

LIU, C.; LIU, Y.; GUO, K.; FAN, D.; GUOQING LI, G.; ZHENG, Y.; YU, L.; YANG, R. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 174-183, 2011.

LUM, M. S.; HANAFI, M. M.; RAFII, Y. M.; AKMAR, A. S. N. Effect of drought stress on growth, proline and antioxidant enzyme activities of upland rice. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 24, n. 5, p. 1487-1493, 2014.

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

MEDEIROS, M. J. L.; SILVA, M. M. A.; GRANJA, M. M. C.; SILVA JÚNIOR, G. S.; CAMARA, T.; WILLADINO, L. Effect of exogenous proline in two sugarcane genotypes grown in vitro under salt stress. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, n. 2, p. 57-63, 2015.  
MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 09, p. 405-410, 2002.

MEDEIROS, C. D.; FERREIRA NETO, J. R. C.; MARCIEL T.; OLIVEIRA, M. T.; RIVAS, R.; PANDOLFI, V.; KIDO, E. A.; BALDANI, J. I.; SANTOS, M. G. Photosynthesis, antioxidant activities and transcriptional responses in two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars under salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, 36, p. 447-459, 2014.

NAKANO Y.; ASADA K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 05, p.867-880, 1981.

NGAMHUI, N.; TANTISUWICHWONG, N.; ROYTRAKUL, S.; ZHU, Y. J.; LI, Q. X.; AKKASAENG, C. Relationship between drought tolerance with activities of antioxidant enzymes in sugarcane. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 2, p. 145-150, 2015.

NIKOLAEVA, M. K.; MAEVSKAYA, S. N.; SHUGAEV, A. G.; BUKHOV, N. G. Effect of drought on chlorophyll content and antioxidant enzyme activities in leaves of three wheat cultivars varying in productivity. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 57, n. 1, p. 87-95, 2010.

RICHARDS, L. A. Physical conditions of water in soil. In: BLACK, C. A., EVANS, D. D.; WHITE, J. L.; CLARK, F. E. (ed.) **Methods of soil analysis - physical and mineralogical properties, including statistics of measurements and sampling**. Madison, ASASSSA, p.128-152, 1965.

RIDESA. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Catálogo nacional de novas variedades “RB” de cana-de-açúcar. **Ridesa**: Curitiba, 2010. 136p.

SALES, C. R. G.; RIBEIRO, R. V.; SILVEIRA, J. A. G.; MACHADO, E. C.; MARTINS, M. O.; LAGÔA, A. M. M. A. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 326-336, 2013.

SALES, C. R. G.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, R. S.; FONTENELE, A. V.; MACHADO, E. C.; SILVEIRA, J. A. G.; RIBEIRO, R. V. Photosynthetic and antioxidant responses to drought during the sugarcane ripening. **Photosynthetica**, v. 53, n. 4, p. 547-554, 2015.

SANTOS, C. M.; SILVA, M. A. Physiological and biochemical responses of sugarcane to oxidative stress induced by water deficit and paraquat. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 1-14, 2015.

SIDDIQUI, M. H.; AL-KHAISHANY, M. Y.; AL-QUTAMI, M. A.; AL-WHAIBI, M. H.; GROVER, A.; ALI, H. M.; AL-WAHIBI, M. S.; BUKHARI, N. A. Response of different

genotypes of faba bean plant to drought stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 10214-10227, 2015.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; SANTOS, C. M.; SHARMA, V. Relationships between physiological traits and productivity of sugarcane in response to water deficit. **The Journal of Agricultural Science**, v. 152, n. 01, p. 104-118, 2012.

SILVA, V. P. R.; OLIVEIRA, S. D.; SANTOS, C. A. C.; SILVA, M. T. Risco climático da cana-de-açúcar cultivada na região Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.2, p.180-189, 2013.

SILVA, M. A.; SANTOS, C. M.; VITORINO, H. S.; RHEIN, A. F. L. Pigmentos fotossintéticos e índice SPAD como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 173-181, 2014.

SILVA, K. I.; SALES, C. R. G.; MARCHIORIA, P. E. H.; SILVEIRA, N. M.; MACHADO, E. C.; RIBEIRO, R. V. Short-term physiological changes in roots and leaves of sugarcane varieties exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in root medium. **Journal of Plant Physiology**, v. 177, p. 93-99, 2015.

ST CLAIR S. B.; LYNCH J. P. The opening of Pandora's Box: climate change impacts on soil fertility and crop nutrition in developing countries. **Plant and Soil**, v. 335, p. 101-115, 2010.

VAN DILLEWIJN, C. Botany of sugarcane. **Chronica Botanica**, Waltham, 1952.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**. V. 151, p. 59-66, 2000.

VIEIRA, G. H. S.; MANTOVANI, E. C.; SEDIYAMA, G. C.; DELAZARI, F. T. Indicadores morfo-fisiológicos do estresse hídrico para a cultura da cana-de-açúcar em função de lâminas de irrigação. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 65-75, 2014.

WENG, M.; CUI, L.; LIU, F.; ZHANG, M.; SHAN, L.; YANG, S.; DENG, X. Effects of drought stress on antioxidant enzymes in seedlings of different wheat genotypes. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 1, p. 49-56, 2015.

## CAPÍTULO IV

### O ACÚMULO DE OSMOPROTETORES MINIMIZA OS EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO AUXILIANDO NA RECUPERAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTOQUÍMICA E TRANSPORTE DE ELÉTRONS EM CANA-DE-AÇÚCAR

#### RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande destaque mundial pela sua capacidade produtiva. Contudo, na maioria das regiões o déficit hídrico é apontado como o fator mais limitante à sua produção. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a relação entre osmoprotetores e a eficiência fotoquímica em cultivares de cana-de-açúcar sob estresse hídrico e reidratação. Utilizaram-se as cultivares RB72454, RB92579, submetidas aos regimes hídricos: irrigado adequadamente, controle; suspensão da irrigação, estresse; e retorno da irrigação, reidratação. A cultivar RB72454 se mostrou mais sensível ao déficit hídrico com baixo acúmulo de prolina e sem alteração nas concentrações de glicina betaína. Além disso, teve maior redução de  $F_v/F_m$ , ETR e  $\Phi_{PSII}$ , e maior aumento de  $q_N$ . Essas respostas fisiológicas resultaram em maiores danos fotoquímicos pelo estresse hídrico, provocando a demora na recuperação. Por outro lado, a cultivar RB92579 foi mais tolerante à seca, com maior acúmulo de prolina e glicina betaína sob estresse, menor redução de  $F_v/F_m$ , ETR e  $\Phi_{PSII}$ , e sem grandes aumentos de  $q_N$ . Isso fez com que essa cultivar sofresse menores distúrbios fisiológicos com o estresse, favorecendo a recuperação. O acúmulo de osmoprotetores sob déficit hídrico, e a sua manutenção durante a reidratação pode estar relacionado à proteção do aparelho fotoquímico e à capacidade de recuperação em cana-de-açúcar após um período de seca sazonal.

Palavras-chaves: Déficit hídrico. Prolina. Glicina Betaína. Recuperação.

#### 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta de metabolismo C<sub>4</sub>, com grande capacidade produtiva nas diversas regiões do mundo onde é cultivada. Entretanto, na maioria das regiões o déficit hídrico é apontado como o fator mais limitante à sua produtividade, sobretudo onde o cultivo não é irrigado (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; DANTAS NETO et al., 2006). Desse modo, a compreensão dos mecanismos de tolerância entre diferentes cultivares ao déficit hídrico contribui satisfatoriamente com os programas de melhoramento genético (JANGPROMMA et al., 2012). Além disso, a utilização de cultivares tolerantes é a maneira mais simples e adotada pelos produtores (SILVA et al., 2011; CHEN et al., 2016).

O déficit hídrico pode levar a perturbação de processos fisiológicos como a eficiência fotoquímica (SILVA et al., 2011). Sob essas condições, a capacidade fotossintética é progressivamente reduzida com alterações na atividade fotoquímica do PSII promovendo uma redução no transporte de elétrons e aumento simultâneo na dissipação de energia. Como consequência, as plantas têm menor aproveitamento da energia luminosa na produção de ATP e NADPH, aumentando a suscetibilidade à fotoinibição (LAWLOR; CORNIC, 2002; KATO et al., 2003; OUKARROUM et al., 2007; SALES et al., 2013).

A fotoinibição ocorre quando a energia luminosa excede a quantidade de energia usada pela fotossíntese, caracterizada por um declínio no rendimento efetivo do PSII. Em regiões tropicais, o déficit hídrico geralmente está associado com aumento da irradiância e temperatura que aumenta ainda mais a energia que chega aos fotossistemas, causando fotoinibição e redução da fotossíntese (SCHREIBER, 2004; LI et al., 2006; ZHANG et al., 2016). Essas respostas são facilmente quantificadas pela emissão de fluorescência das clorofilas, uma importante ferramenta para entender o funcionamento do maquinário fotossintético em resposta ao estresse hídrico (LI et al., 2006; GUO et al., 2016). A emissão de fluorescência dá informações rápidas e precisas sobre a condição do PSII, podendo mostrar quanto de energia é absorvida pela clorofila e a extensão pela qual o PSII está sendo afetado pelo estresse (SCHREIBER, 2004, LI et al., 2006).

A preservação da atividade fotoquímica com baixa fotoinibição e manutenção da assimilação de CO<sub>2</sub> após um período de deficiência hídrica é um mecanismo extremamente importante para retomar seu crescimento e desenvolvimento, sendo, portanto, interessante também avaliar a recuperação das plantas após o déficit hídrico (SALES et al., 2013; CHEN et al., 2016). Quando a fotossíntese é afetada apenas pelo fechamento estomático, há uma rápida recuperação na assimilação de CO<sub>2</sub> após o estresse, indicando que o aparato fotossintético não foi danificado (GUAN et al., 2015). O contrário pode ocorrer quando há limitação não estomática, como redução da atividade da Rubisco, disponibilidade de CO<sub>2</sub> nos cloroplastos e danos nos centros de reação do PSII (FLEXAS et al., 2006). Entretanto, a extensão dos efeitos do déficit hídrico sobre o aparelho fotoquímico dependerá da intensidade e duração do estresse, entre outros fatores, além do potencial de recuperação (SALES et al., 2013; TRUJILLO et al., 2013).

A capacidade das plantas se recuperarem do déficit hídrico após a reidratação está ligada aos mecanismos de tolerância desencadeados durante o período de estresse (ZHANG et al., 2016; TRUJILLO et al., 2013). Esses mecanismos podem ser investigados através dos *quenquings* fotoquímico e não fotoquímico, da taxa de transporte de elétrons, e da eficiência

fotoquímica efetiva do PSII (COLOM; VAZZANA, 2003; CHEN et al., 2016; GUO et al., 2016). Além disso, pode haver também a produção de osmoprotetores, como por exemplo, prolina e glicina betaína (ASHRAF; FOOLAD, 2007; ZHANG et al., 2014; ABID et al., 2016), auxiliando as plantas estressadas a sofrerem menos distúrbios no aparelho fotoquímico do PSII, e promovendo uma melhor recuperação após a seca. O acúmulo de osmoprotetores, a depender da concentração, é indicado como um mecanismo auxiliar na manutenção do turgor celular permitindo que as plantas continuem absorvendo água e mantendo a turgescência mesmo com baixo potencial hídrico (ASHRAF; FOOLAD, 2007; ZHANG et al., 2014).

A ação dos osmoprotetores sobre o aparato fotoquímico quando a cana-de-açúcar está sob déficit hídrico não é bem compreendida (CIA et al., 2012; ENDRES et al., 2016). No entanto, existem relatos de que o acúmulo destes solutos contribui com a tolerância de plantas de diferentes espécies quando submetidas ao déficit hídrico (ASHRAF; FOOLAD, 2007). Em milho, o acúmulo de prolina foi maior na cultivar mais tolerante à seca aumentando a estabilidade das membranas e a produção de antioxidantes (ANJUM et al., 2017). Semelhante, em *Panicum sumatrense*, o aumento na concentração de glicina betaína proporcionou a estabilização das membranas dos tilacoides melhorando a fotossíntese (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014). Dessa maneira, a compreensão da atuação de osmoprotetores em conjunto com as atividades fotoquímicas nas respostas das plantas de cana-de-açúcar ao estresse hídrico, pode identificar estratégias de tolerância que as permitam se desenvolver em condições ambientais adversas.

Nossa hipótese é que o aumento na concentração de osmoprotetores durante o déficit hídrico pode auxiliar na manutenção da integridade do aparelho fotoquímico em cana-de-açúcar sob estresse hídrico, além de melhorar na capacidade de recuperação. Dessa maneira, objetivou-se avaliar o teor dos osmoprotetores prolina e glicina betaína, a eficiência fotoquímica máxima e efetiva do PSII, os *quenchins* fotoquímico e não fotoquímico, e o transporte de elétrons em cultivares de cana-de-açúcar sob déficit hídrico e reidratação.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal, condições de crescimento e tratamentos**

O estudo foi realizado no Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas, Brasil (9° 28' S, 35° 49' W, 127 m de altitude), em condições de casa de vegetação. Neste estudo foram utilizadas as cultivares de cana-de-açúcar RB72454 e RB92579, ambas selecionadas e caracterizadas em experimento antecedente, como sensível e

tolerante, respectivamente, ao déficit hídrico. Os rebolos foram obtidos do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA/CECA/UFAL).

Foram utilizados vasos de 30 L, preenchidos com 23 kg de solo, o qual foi previamente corrigido com calcário dolomítico, e incubado por 60 dias. Posteriormente, o solo foi adubado com 0,46 g de ureia, 2,73 g de superfosfato triplo e 2,68 g de cloreto de potássio em cada vaso, conforme recomendações de Vitti et al. (2013), e baseado nas características químicas do solo (Tabela 1). Após a incubação, foram plantados quatro colmos com gemas individuais em cada vaso. Aos 30 dias realizou-se o desbaste deixando-se duas plantas por vaso, em que apenas dois perfilhos primários foram mantidos para as avaliações, para eliminar efeitos varietais de perfilhamento e ocupação desuniforme nos vasos. O solo foi mantido próximo à capacidade de campo durante todo o período de crescimento até a imposição do déficit hídrico, aos 105 dias após o plantio.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 2 x 2, sendo duas cultivares de cana-de-açúcar, RB72454 e RB92579, e duas condições hídricas, controle e déficit hídrico, com dez repetições por tratamento.

O teor de água do solo foi determinado pelo método gravimétrico. Para tanto, um vaso preenchido com solo foi posto à saturação por ascensão capilar durante 24 horas, e deixado sob drenagem livre por igual período. Posteriormente, uma amostra do solo úmido foi retirada, pesada e seca em estufa a 105 °C por 24 horas, e pesada novamente. A partir desses dados calculou-se o teor de água (%) com base no peso, como:  $Umidade = \frac{\text{peso do solo úmido} - \text{peso do solo seco}}{\text{peso do solo seco}} \times 100$ . A umidade da amostra foi de 24,6%. Conhecendo-se o volume de solo do vaso e o teor máximo de umidade retida pelo solo foi estipulado o volume de água a ser irrigado no tratamento adequado de água (controle).

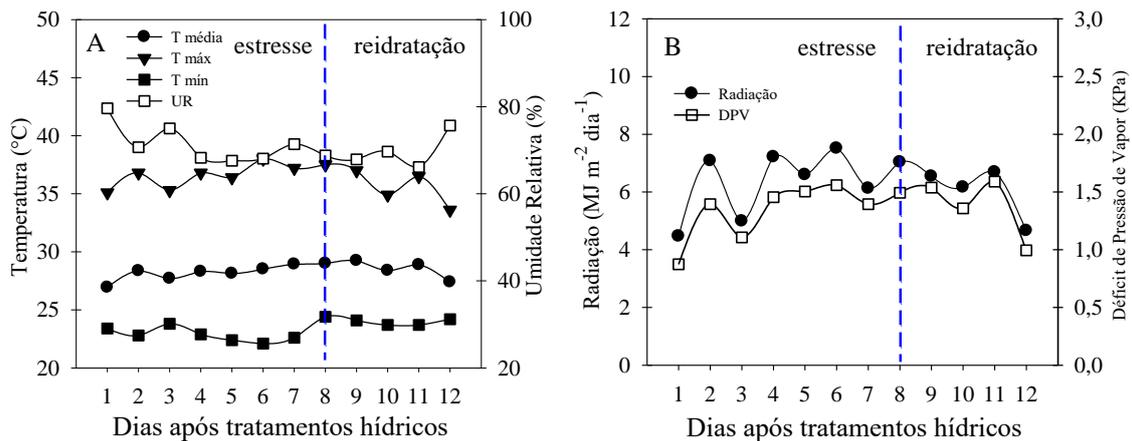
Aos 105 dias após o plantio, a irrigação foi suspensa nos tratamentos com déficit hídrico, enquanto o controle continuou irrigado. As condições microclimáticas da casa de vegetação (Figura 1) foram registradas por uma estação meteorológica automática (DELTA-T Devices, Cambridge – England). A umidade do solo foi monitorada a cada dois dias a partir do início do déficit hídrico até a reidratação (Figura 2), utilizando o sensor de umidade modelo SM200 (Delta T Device, England) a dez cm de profundidade.

**Tabela 1.** Caracterização físico-química do solo utilizado no experimento.

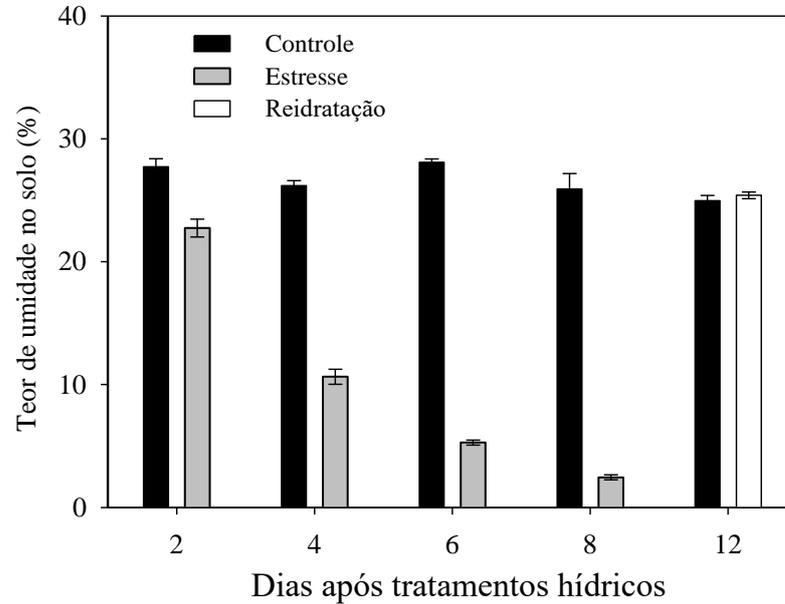
Características químicas															
pH	MO	P <sub>resina</sub>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	K	Ca	Mg	CTC	Na	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn
CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			-----				%	----- mg dm <sup>-3</sup> -----				
4,6	27,5	26,5	----	4,0	0,85	1,65	1,05	7,55	0,35	47	0,27	0,25	100	1,3	0,5
Características físicas															
Areia total			Argila			Silte			Classificação textural						
-----			g Kg <sup>-1</sup> -----			-----			Argilo arenoso						
599			368			33									

pH: potencial hidrogeniônico; MO: matéria orgânica; P: fósforo; Al<sup>3+</sup>: alumínio trocável; H: hidrogênio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; CTC: capacidade de troca catiônica; Na: sódio; V: saturação por bases; B: boro; Cu: cobre; Fe: ferro; Mn: manganês; Zn: zinco

O déficit hídrico permaneceu até a ocasião em que se visualizou a murcha e enrolamento das folhas+1, bem como o início da senescência nas folhas mais velhas, quando a umidade do solo chegou a 2,2% em média. A classificação das folhas foi de acordo com o sistema kujper (VAN DILLEWIJN, 1952). Aos oito dias após a suspensão da irrigação, as plantas sob déficit hídrico foram reidratadas durante quatro dias.

**Figura 1.** Temperaturas máxima, média e mínima do ar, umidade relativa média do ar (A), radiação média incidente e déficit de pressão de vapor do ar (B) durante o período de estresse hídrico e reidratação.

**Figura 2.** Monitoramento do teor de umidade no solo (%) durante o período dos tratamentos hídricos: controle, estresse e reidratação. As barras verticais indicam o erro padrão da média.



## 2.2 Fluorescência da clorofila

A cada dois dias a partir do início do déficit hídrico, e quatro dias após a reidratação foi avaliado o comportamento fotoquímico das plantas.

Entre as 8 e 12 horas, as folhas+1 de seis plantas por tratamento foram utilizadas para avaliação de curvas de resposta a luz (RLC) com o fluorômetro portátil (PAM 2500, WALZ) acoplado à câmara 2030-B. As folhas foram submetidas a pulsos saturantes de luz actínica que consistiram de 19 picos de intensidade (0, 5, 12, 28, 46, 65, 85, 112, 147, 190, 240, 305, 378, 460, 541, 637, 756, 905 e 1082  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). O tempo de exposição para cada nível de luz foi de 10 segundos. Na ocasião foram avaliados a taxa de transporte de elétrons (ETR), o *quenching* fotoquímico (qP), o *quenching* não fotoquímico (qN), e a eficiência fotoquímica efetiva do PSII ( $\Phi\text{PSII}$ ). A ETR foi calculada como  $\text{ETR} = \Phi\text{II} \times \text{PPFD} \times 0,5 \times 0,84$  (SCHREIBER et al., 1994), onde (PPFD) é a Densidade do Fluxo de Fótons Fotossintéticos incidente na folha; 0,5: fator que assume igual distribuição de energia entre os fotossistemas I e II; 0,84: absorção assumida na folha. qP e qN foram calculados de acordo com Van Kooten; Snel (1990), e  $\Phi\text{PSII}$  de acordo com Schreiber et al. (1994).

A eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) foi avaliada entre 12 e 13 horas, utilizando-se um fluorômetro portátil (PAM 2500, WALZ). As folhas +1 de uma planta por

repetição foram adaptadas ao escuro por 30 minutos com o auxílio de cliques específicos colocados na parte intermediária desviando-se a nervura central. A fluorescência mínima ( $F_0$ ) foi determinada pela aplicação de uma luz modulada fraca ( $<0,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e a fluorescência máxima ( $F_m$ ) por um curto pulso (0,8 s) de luz saturante ( $10000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) foi calculada de acordo com Maxwell; Johnson (2000).

### 2.3 Acúmulo de osmoprotetores

Sob déficit hídrico severo, oito dias após suspensão da irrigação, e quatro dias após a reidratação foram coletadas as folhas+1, priorizando-se a parte mediana com descarte da nervura central. As folhas selecionadas foram rapidamente congeladas em  $\text{N}_2$  líquido e armazenadas em freezer a  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ , para posterior avaliação dos teores de prolina e glicina betaína.

A prolina foi analisada com base no método de Bates et al. (1973). O material vegetal foi liofilizado, macerado (0,1 g) e homogeneizado em ácido sulfosalicílico aquoso a 3% e o homogeneizado foi centrifugado a 4000 g por 10 minutos. Posteriormente, foi coletado 1 mL de sobrenadante em tubo de ensaio e adicionados 2 mL de ninhidrina ácida e 2 mL de ácido acético glacial, e arrefecidos a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 h, paralisando-se a reação em banho de gelo. Após o término da reação, foram adicionados 2 mL de tolueno e agitados vigorosamente em vórtex. A leitura de absorvância foi realizada a 520 nm em espectrofotômetro tendo o tolueno como branco. O teor de prolina foi calculado utilizando L-prolina PA (Sigma-Aldrich) como padrão e expresso em  $\mu\text{mol prolina g MS}^{-1}$ .

A glicina betaína foi analisada com base no método de Grieve; Grattan (1983) com pequenas modificações. O material vegetal liofilizado, foi macerado (0,250 g) e homogeneizado em 10 mL de água deionizada sob agitação durante quatro horas a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os extratos foram centrifugados a 10000 g durante 5 min a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente, 1 mL de cada extrato foi diluído em igual proporção de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N, homogeneizados e mantidos por 1 hora a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, 500  $\mu\text{L}$  do extrato diluído foi homogeneizado com 200  $\mu\text{L}$  de iodeto de potássio ( $\text{KI-I}_2$ ). O iodeto foi previamente preparado, diluindo-se 15,7 g de iodo e 20 g de iodeto de potássio em 100 mL de água deionizada. Os tubos foram armazenados a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 16 h e depois centrifugados a 10000 x g durante 15 min a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado deixando os cristais de periodato formados, permanecendo em banho de gelo até a adição de 3 ml de 1,2 dicloroetano. Após adicionar o 1,2 dicloroetano os tubos foram ligeiramente agitados e mantidos em repouso durante 2 h e 30 min em

temperatura ambiente. As leituras foram realizadas a 365 nm em espectrofotômetro. O conteúdo de glicina betaína foi determinado através de uma curva usando glicina-betaína PA (Sigma-Aldrich) como padrão e os resultados expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ .

## 2.4 Análise estatística

A Eficiência fotoquímica máxima do PSII, Prolina e Glicina betaína foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$  (Sisvar 5.6).

ETR, qN, qP e  $\Phi\text{PSII}$  foram submetidas a análise de regressão como variáveis dependentes e os pulsos de luz actínica como independentes (SigmaPlot 11.0). Para ETR e qN foi utilizada uma função simples de hipérbole retangular [ $y = (a \times x) / (b + x)$ ] e para qP e  $\Phi\text{PSII}$  uma função exponencial de decaimento [ $y = a \times \exp(-b \times x)$ ]. O valor obtido na curva de ajuste da análise de regressão de cada variável foi utilizado para comparar os tratamentos através da análise de variância e comparados pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Fluorescência da clorofila

A cultivar RB72454 teve a taxa de transporte de elétrons superior à da cultivar RB92579 quando estava sob suprimento hídrico adequado (Tabela 2; Figura 3A). No entanto, a cultivar RB72454 teve as maiores reduções de ETR quando submetidas à deficiência hídrica, embora semelhante à da cultivar RB92579 aos oito dias de estresse. A ETR se recuperou totalmente na cultivar RB 92579 após a reidratação, mas não na RB72454.

Sob déficit hídrico, a ETR se correlacionou positivamente com prolina, glicina betaína e  $F_v/F_m$  e, negativamente com qN (Tabela 4). Essas mesmas correlações permaneceram na reidratação.

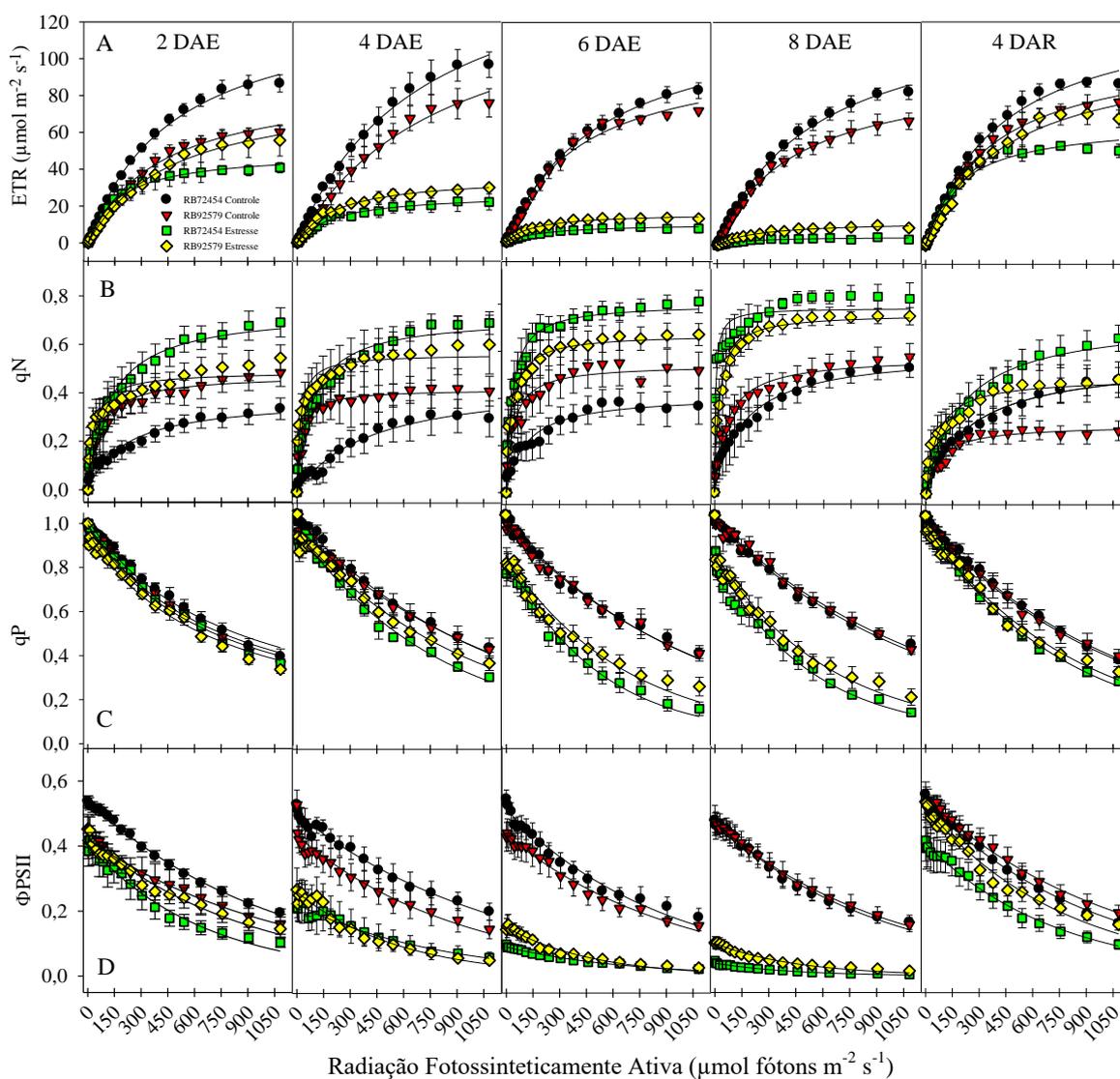
O qN aumentou em ambas as cultivares sob déficit hídrico (Tabela 2; Figura 3B). No entanto, a cultivar RB72454 teve maior aumento até os seis dias após o déficit hídrico se igualando a RB92579 aos oito dias de estresse. Após a reidratação, a cultivar RB72454 ainda manteve o qN maior que a RB92579. O qN também se correlacionou negativamente com  $F_v/F_m$  e  $\Phi\text{PSII}$  (Tabela 4).

**Tabela 2.** Valores médios e  $R^2$  obtidos pela curva de ajuste da análise de regressão para a taxa de transporte de elétrons (ETR), o *quenching* não fotoquímico (qN), o *quenching* fotoquímico (qP) e a eficiência fotoquímica efetiva do PSII ( $\Phi$ PSII) de duas cultivares de cana-de-açúcar em diferentes dias após tratamentos hídricos.

Dias	Trat	Cultivares	Parâmetros da fluorescência da clorofila							
			ETR	$R^2$	qN	$R^2$	qP	$R^2$	$\Phi$ PSII	$R^2$
2 DAE	Controle	RB72454	132,02	0,99	0,377	0,97	0,994	0,99	0,540	0,99
		RB92579	87,83	0,99	0,474	0,98	0,974	0,99	0,420	0,99
	Estresse	RB72454	49,35	0,99	0,741	0,98	0,967	0,99	0,405	0,99
		RB92579	84,64	0,99	0,486	0,95	0,939	0,99	0,426	0,98
	C		ns		ns		ns		ns	
	W		**		*		*		*	
	C x W		**		*		ns		ns	
4 DAE	Controle	RB72454	167,39	0,99	0,461	0,98	0,978	0,99	0,501	0,98
		RB92579	144,99	0,99	0,423	0,97	0,942	0,99	0,435	0,96
	Estresse	RB72454	26,64	0,99	0,722	0,98	0,927	0,98	0,224	0,97
		RB92579	36,11	0,99	0,569	0,96	0,917	0,98	0,262	0,97
	C		ns		ns		ns		ns	
	W		*		*		*		**	
	C x W		**		ns		ns		ns	
6 DAE	Controle	RB72454	126,11	0,99	0,413	0,97	0,972	0,98	0,507	0,98
		RB92579	104,87	0,99	0,542	0,97	0,957	0,98	0,430	0,99
	Estresse	RB72454	9,95	0,98	0,801	0,98	0,819	0,97	0,090	0,99
		RB92579	15,69	0,99	0,673	0,98	0,817	0,96	0,150	0,98
	C		ns		ns		ns		ns	
	W		**		**		**		**	
	C x W		**		*		ns		*	
8 DAE	Controle	RB72454	130,13	0,99	0,578	0,98	0,972	0,99	0,476	0,99
		RB92579	95,65	0,99	0,556	0,98	0,977	0,99	0,473	0,99
	Estresse	RB72454	4,42	0,96	0,759	0,95	0,808	0,97	0,040	0,98
		RB92579	12,58	0,98	0,735	0,97	0,826	0,97	0,100	0,98
	C		ns		ns		ns		ns	
	W		**		**		**		**	
	C x W		**		ns		ns		*	
4 DAR	Controle	RB72454	130,63	0,99	0,552	0,99	0,986	0,99	0,538	0,99
		RB92579	107,82	0,99	0,282	0,99	0,979	0,99	0,546	0,99
	Estresse	RB72454	66,38	0,99	0,719	0,99	0,961	0,99	0,409	0,99
		RB92579	106,24	0,99	0,475	0,97	0,950	0,99	0,518	0,99
	C		ns		**		ns		ns	
	W		**		**		ns		**	
	C x W		**		*		ns		*	

ns: não significativo; \*, \*\* significativo  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente; C:cultivar; W: Tratamento hídrico; DAE:dias após estresse; DAR: dias após reidratação.

**Figura 3.** Taxa de transporte de elétrons - ETR (A), *quenching* não fotoquímico - qN (B), *quenching* fotoquímico - qP (C) e eficiência fotoquímica efetiva do PSII -  $\Phi$ PSII (D) de duas cultivares de cana-de-açúcar em diferentes dias após tratamentos hídricos. DAE: dias após estresse; DAR: dias após reidratação. As linhas verticais indicam o erro padrão da média.



O qP reduziu com o aumento do estresse, mas se recuperou após a reidratação de maneira semelhante nas duas cultivares (Tabela 2; Figura 3C).

A eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) não foi afetada pelo déficit hídrico aos dois e quatro dias nas duas cultivares (Tabela 3; Figura 4). No entanto, aos seis dias de estresse, as cultivares reduziram a razão  $F_v/F_m$ , com maior redução na RB72454 de 20,7%, enquanto na RB92579 a redução foi de 10,3%. Esse dano ao aparato fotoquímico foi agravado após oito dias de estresse, chegando a 38,7 e 12% de redução nas duas cultivares,

respectivamente. Com a reidratação, Fv/Fm se recuperou na cultivar RB92579, enquanto na RB72454 se manteve 8% menor em relação às plantas controle.

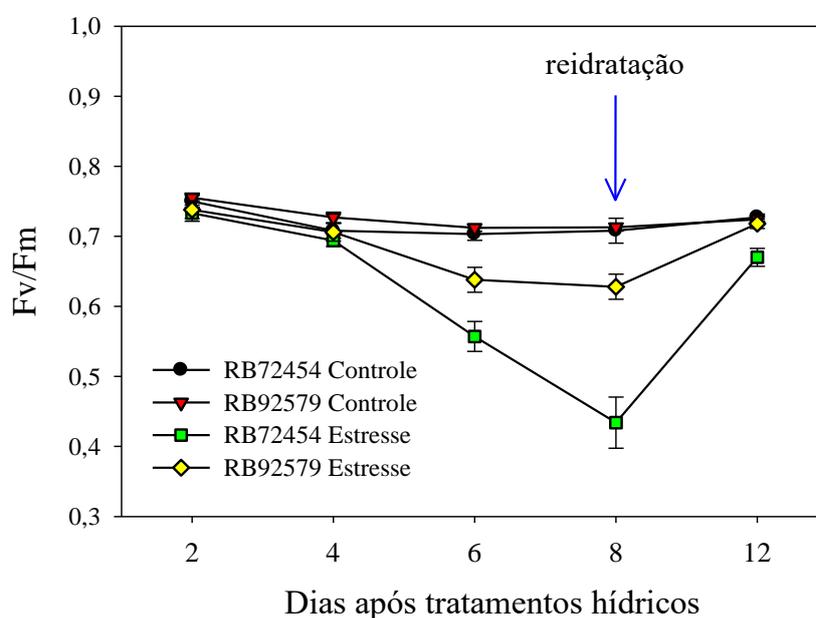
**Tabela 3.** Resumo da análise de variância da eficiência fotoquímica máxima do PSII e osmoprotetores em cultivares de cana-de-açúcar sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico e reidratação.

Parâmetros fisiológicos	Variáveis	FV	F	P
Eficiência máxima do PSII	Fv/Fm (2 DAE)	C	0,259	0,6150 <sup>ns</sup>
		W	3,258	0,0823 <sup>ns</sup>
		CxW	0,000	0,9958 <sup>ns</sup>
	(4 DAE)	C	2,582	0,1197 <sup>ns</sup>
		W	3,321	0,0795 <sup>ns</sup>
		CxW	0,118	0,7336 <sup>ns</sup>
	(6 DAE)	C	11,165	0,0025 <sup>**</sup>
		W	67,577	0,0000 <sup>***</sup>
		CxW	7,117	0,0127 <sup>*</sup>
	(8 DAE)	C	24,389	0,0000 <sup>***</sup>
		W	87,351	0,0000 <sup>***</sup>
		CxW	26,703	0,0000 <sup>***</sup>
	(4 DAR)	C	11,476	0,0022 <sup>**</sup>
		W	22,263	0,0001 <sup>***</sup>
		CxW	15,106	0,0006 <sup>***</sup>
Osmoprotetores	Pro (8 DAE)	C	162,372	0,0000 <sup>***</sup>
		W	811,234	0,0000 <sup>***</sup>
		CxW	163,160	0,0000 <sup>***</sup>
	(4 DAR)	C	30,882	0,0000 <sup>***</sup>
		W	66,112	0,0000 <sup>***</sup>
		CxW	14,277	0,0011 <sup>**</sup>
	GB (8 DAE)	C	11,521	0,0027 <sup>**</sup>
		W	19,381	0,0002 <sup>***</sup>
		CxW	12,223	0,0022 <sup>**</sup>
	(4 DAR)	C	3,926	0,0608 <sup>ns</sup>
		W	6,978	0,0153 <sup>*</sup>
		CxW	4,495	0,0461 <sup>*</sup>

FV: Fontes de variação, F: F calculado; P: Probabilidade de significância; Pro: Prolina; GB: Glicina betaína; C: Cultivar; W: Tratamento hídrico; DAE: dias após estresse; DAR: dias após reidratação; ns: não significativo; \*, \*\*, \*\*\* significativo p<0,05, 0,01 e 0,001, respectivamente.

A  $\Phi$ PSII reduziu de maneira semelhante nas duas cultivares até os quatro dias de estresse (Tabela 2; Figura 3D). Com o aumento do estresse até o oitavo dia, a cultivar RB72454 reduziu mais a  $\Phi$ PSII em relação a cultivar RB92579, sendo que a primeira não se recuperou totalmente após a reidratação.

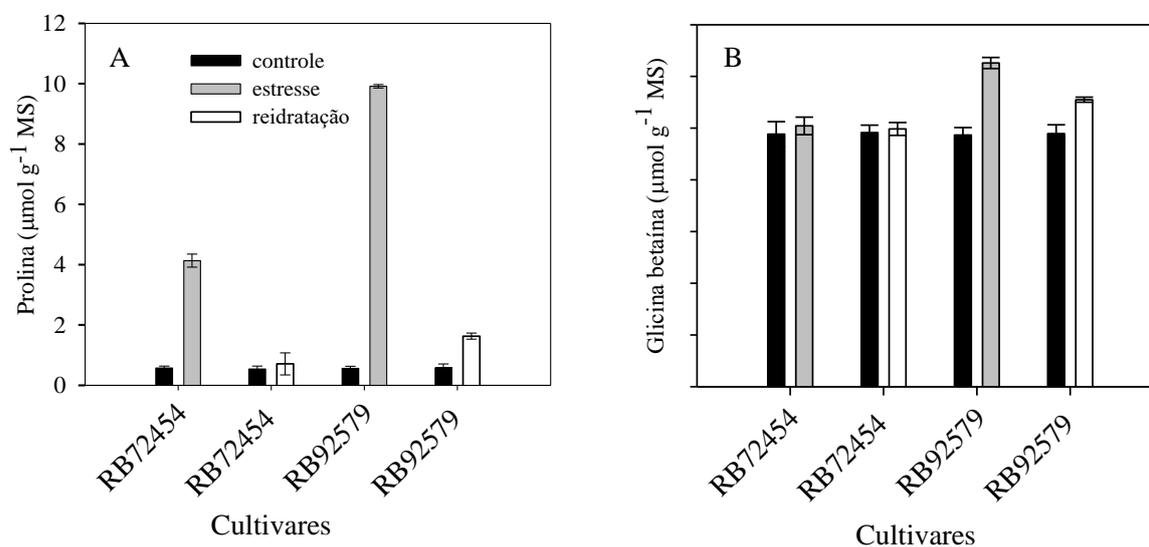
**Figura 4.** Eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm) de duas cultivares de cana-de-açúcar em diferentes dias após tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico e reidratação. As linhas verticais indicam o erro padrão da média.



### 3.2 Acúmulo de osmoprotetores

O estresse hídrico promoveu o aumento do acúmulo de prolina foliar em ambas as cultivares, com aumento de 623% na RB72454 e 1657% na RB92579 em relação às plantas do tratamento controle (Figura 5A). Após a reidratação, a concentração de prolina diminuiu na cultivar RB72454 se assemelhando ao tratamento controle, enquanto que, na cultivar RB92579 se manteve 184% acima do controle.

**Figura 5.** Concentrações de prolina (A) e glicina betaína (B) em duas cultivares de cana-de-açúcar sob diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico e reidratação. As linhas verticais indicam o erro padrão da média.



O estresse hídrico não alterou as concentrações de glicina betaína foliar da cultivar RB72454 (Figura 5B). Já a cultivar RB92579 aumentou a glicina betaína em 28% quando sob estresse, e manteve concentrações 13% acima das plantas controle, após a reidratação. Prolina e glicina betaína além de se correlacionarem com  $F_v/F_m$  e ETR, se correlacionaram mutuamente, tanto no estresse quanto na reidratação (Tabela 4).

**Tabela 4.** Coeficientes de correlação de Pearson entre prolina (Pro), glicina betaína (GB), eficiência fotoquímica máxima do PSII (Fv/Fm), taxa de transporte de elétrons (ETR), *quenching* não fotoquímico (qN), *quenching* fotoquímico (qP) e eficiência fotoquímica efetiva do PSII ( $\Phi$ PSII) de duas cultivares de cana-de-açúcar submetidas a diferentes tratamentos hídricos: controle, estresse hídrico e reidratação.

Trat. W	Var.	GB	Fv/Fm	ETR	qN	qP	$\Phi$ PSII
Controle	Pro	0,02	0,15	-0,34	0,00	0,01	0,13
	GB		0,22	0,15	0,40*	0,00	-0,13
	Fv/Fm			0,06	-0,20	0,22	0,17
	ETR				0,12	0,13	0,34
	qN					-0,12	-0,09
	qP						0,13
Estresse	Pro	0,69*	0,76**	0,93**	-0,49	0,27	0,29
	GB		0,50	0,69*	-0,37	0,39	0,50
	Fv/Fm			0,77**	-0,46	-0,05	0,26
	ETR				-0,61*	0,28	0,49
	qN					-0,46	-0,39
	qP						0,47
Reidratação	Pro	0,64*	0,64*	0,69*	-0,37	0,24	0,22
	GB		0,86**	0,71**	-0,57	-0,07	0,40
	Fv/Fm			0,76**	-0,74**	0,06	0,46
	ETR				-0,63*	0,13	0,36
	qN					-0,30	-0,75**
	qP						0,21

Trat. W: tratamentos hídricos; Var.: variáveis; ns: não significativo; \*, \*\* significativo p<0,05 e 0,01, respectivamente

#### 4 DISCUSSÃO

As adversidades induzidas pela seca nas plantas exige maior compreensão dos mecanismos de tolerância para superar perdas significativas de rendimento sob estresse hídrico (ABID et al., 2016, ANJUM et al., 2017). Nesse estudo, investigamos a acumulação de osmoprotetores e a condição do aparato fotoquímico em cana-de-açúcar sob estresse hídrico progressivo, e posterior reidratação.

As diferenças no acúmulo de osmoprotetores proporcionadas pelo estresse entre as duas cultivares de cana-de-açúcar indicam mecanismos contrastantes de tolerância à seca. Embora, a concentração de prolina em plantas sob déficit hídrico ainda gere muitas discussões sobre o seu papel (KAVI KISHOR et al., 2005), é bastante relatado que seu acúmulo com o estresse é benéfico às plantas, pois tem sido eficientemente associado ao aumento da tolerância ao

estresse hídrico em diversas culturas (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014; KAUR; ASTHIR, 2015; ANJUM et al., 2017). Esses benefícios possivelmente se devem a compartimentalização subcelular entre o citosol, os cloroplastos e as mitocôndrias, podendo assim, exercer funções específicas nos diferentes compartimentos celulares (KAUR; ASTHIR, 2015). Em *Periploca sepium* o transporte de prolina a partir de células do caule e das raízes contribuiu para a alta acumulação nas folhas durante a recuperação do estresse (AN et al., 2013). Portanto, devido a sua multicompartimentalização, a alta concentração de prolina nas plantas estressadas da cultivar RB92579 parece ter auxiliado a minimizar a redução da taxa de transporte de elétrons e da eficiência quântica do PSII como observado nas correlações, além de melhorar a recuperação. A alta concentração de prolina aumenta a osmolaridade celular contribuindo com a manutenção ou redução da saída de água dos tecidos (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014).

A prolina é comumente indicada como um eficiente ajustador osmótico (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014; ABID et al 2016). Em relatos mais recentes, a prolina também tem sido indicada como antioxidante (AN et al., 2013; ANJUM et al., 2016; SINGH et al., 2017), ou como osmoprotetor e antioxidante simultaneamente, sob condições de estresse (VANKOVÁ et al., 2012; SATBHAI; NAIK, 2014). Dessa maneira, a maior concentração de prolina na cultivar RB92579 indica uma estratégia de tolerância ao déficit hídrico, sugerindo que essa cultivar foi auxiliada pelos mecanismos de ajustamento osmótico e antioxidante. Esses resultados divergem dos encontrados por Cia et al. (2012) que observaram redução na concentração de prolina com o prolongamento do estresse hídrico de três a vinte dias, uma vez que o sistema antioxidante foi ativado. No entanto, condizem com os resultados de Rhein et al. (2011) e Abbas et al. (2014) em cana-de-açúcar induzida à seca, em que a concentração de prolina foi maior nas cultivares mais tolerantes ao estresse, provavelmente atuando como osmoprotetor celular. Resultados semelhantes também foram observados em milho (ANJUM et al., 2017), girassol (CANAVAR et al., 2014), e feijão-fava (ABID et al., 2016). Nessas culturas, o maior conteúdo de prolina foi encontrado nas cultivares mais tolerantes a escassez de água. Como consequência, essas cultivares tiveram melhor ajustamento osmótico, atividade antioxidante, manutenção da turgescência, e proteção das estruturas celulares levando a melhoria na tolerância à seca (ANJUM et al., 2016; 2017).

A concentração de prolina também está associada à capacidade das plantas se recuperarem após condições de estresse, que se deve tanto às suas funções quanto à expressão de genes envolvidos na sua síntese e degradação (VANKOVÁ et al., 2012; AN et al., 2013). Vanková et al. (2012) relataram que apesar das plantas reidratadas expressarem rapidamente

genes codificadores de proteínas que degradam a prolina, os genes codificadores da biossíntese de prolina também são mantidos até que a planta se recupere. Além disso, os autores observaram que as plantas com alta concentração de prolina também expressaram o gene envolvido na síntese do mRNA do cloroplasto, o que indicou a importância da prolina na restauração dos cloroplastos após o estresse. Em nosso trabalho, esses mecanismos parecem ter ocorrido na RB92579, uma vez que esta conseguiu recuperar as funções fotoquímicas, como ETR, Fv/Fm e  $\Phi$ PSII.

O aumento na concentração de glicina betaína também é bastante relatado em plantas sob déficit hídrico (AJITHKUMAR; PANNEERSELVAM, 2014; SINGH et al., 2017). Em nossos resultados, observamos que não houve aumento deste soluto nas plantas estressadas da cultivar RB72454. Da mesma forma, também não foi observado aumento desse osmoprotetor em cultivares sensíveis sob déficit hídrico, em trigo (WANG et al., 2010) e lentilha (SINGH et al., 2017). Em contraste, a RB92579 aumentou a concentração de glicina betaína sob estresse hídrico, como relatado também em estudo com cana-de-açúcar, em que a concentração de glicina betaína aumentou nas cultivares mais tolerantes ao estresse hídrico (ABBAS et al., 2014) e salino (SATBHAI; NAIK, 2014). Do mesmo modo, o acúmulo de glicina betaína aumentou significativamente em plantas de trigo sob estresse hídrico, desempenhando papéis na regulação osmótica, manutenção do pH citoplasmático e proteção das membranas celulares sob condições de escassez de água (HUSEYNOVA et al., 2016). Além disso, o acúmulo de glicina betaína durante o estresse hídrico, também levou à estabilização das membranas dos tilacoides e supressão da degradação das clorofilas em plantas de trigo (WANG et al., 2010). Dessa forma, sugerimos que a glicina betaína ajudou na tolerância ao estresse na RB92579 levando a menores danos no aparato fotoquímico, mas não na RB72454.

Além do auxílio na tolerância ao estresse, a glicina betaína está envolvida na recuperação de plantas estressadas (WANG et al., 2010; CHENG et al., 2013). Assim como a prolina, a glicina betaína também parece depender da expressão de genes envolvidos na sua biossíntese (CHENG et al., 2013). Em batata doce, as plantas que expressaram genes codificadores da biossíntese de glicina betaína sob estresse hídrico, melhoraram a capacidade fotossintética e antioxidante, a turgescência e a integridade celular, que ajudaram na recuperação (CHENG et al., 2013). Resultados semelhantes, também foram encontrados em plantas transgênicas de trigo sob estresse hídrico (WANG et al., 2010). Nessas plantas, o acúmulo de glicina betaína auxiliou na integridade dos cloroplastos, o que possivelmente ocorreu em nosso estudo com a RB92579, fazendo com que recuperasse Fv/Fm, ETR e

$\Phi$ PSII. Além disso, melhorou indiretamente a capacidade antioxidante pelo aumento da atividade enzimática, e o ajustamento osmótico associado a outros osmoprotetores, como a prolina.

Em nossos resultados, a correlação existente entre prolina e glicina betaína indica que estes osmoprotetores atuaram simultaneamente, ajudando no processo de tolerância ao estresse hídrico em cana-de-açúcar. O acúmulo de prolina e glicina betaína contribuiu na manutenção do conteúdo de água na folha, da integridade das membranas, e das clorofilas em cultivar de lentilha tolerante à seca (SINGH et al., 2017). O mesmo pode ter ocorrido com a cultivar de cana-de-açúcar RB92579, em nosso estudo, por ter aumentado a concentração dos dois osmoprotetores sob estresse, enquanto a RB72454 aumentou apenas a concentração de prolina, e em menor proporção. De fato, o acúmulo simultâneo desses osmoprotetores aumentou o ajustamento osmótico e a capacidade fotossintética em plantas de arroz (CHA-UM et al., 2013) e trigo (WANG et al., 2010) sob estresse hídrico.

A fotoproteção do aparelho fotossintético de cultivares de cana-de-açúcar em resposta ao estresse hídrico pode ser associada a um eficiente mecanismo de osmoproteção, que foi mais eficaz na cultivar RB92579. Essa eficiência do mecanismo de dissipação de calor é indicada pela manutenção de  $F_v/F_m$ , de ETR e redução de  $q_N$  (CHA-UM; KIRDMANEE, 2009; LIU et al., 2012; ABID et al., 2016). A eficiência fotoquímica efetiva do PSII e a taxa de transporte de elétrons diminuem, enquanto o  $q_N$  aumenta em plantas sob estresse (KATO et al., 2003; LIU et al., 2012; GUAN et al., 2015; ABID et al., 2016). Em nosso estudo, a ETR,  $F_v/F_m$  e  $\Phi$ PSII foram severamente reduzidas pela progressão da escassez de água. Contudo, observamos que essas reduções foram mais intensificadas na cultivar RB72454 que na RB92579. Resultados semelhantes foram observados em feijão-fava, em que  $F_v/F_m$ ,  $\Phi$ PSII e ETR foram significativamente mais afetados na cultivar sensível ao estresse hídrico (ABID et al., 2016). Embora as cultivares de cana-de-açúcar tenham apresentado reduções semelhantes da ETR no estresse máximo, a RB92579 teve melhor recuperação quando reidratada. Estudos anteriores, relatam que o transporte de elétrons no PSII diminuiu gradualmente com o estresse hídrico, como em cana-de-açúcar (SALES et al., 2013) e trigo (ZIVCAK et al., 2013). Conseqüentemente, as plantas têm menor aproveitamento da energia luminosa na produção de ATP e NADPH, além de aumentar a chance de fotoinibição (LAWLOR; CORNIC, 2002; KATO et al., 2003; OUKARROUM et al., 2007). No entanto, podem se recuperar com o fim do estresse (JANGPROMMA et al., 2012), como ocorreu com a RB92579.

Além de ETR, Fv/Fm e  $\Phi$ PSII também recuperaram após a reidratação na RB92579. Isso indica que essa cultivar desencadeou mecanismos de aclimação e tolerância ao estresse, que lhe proporcionaram melhor recuperação. Esses resultados indicam a importância de investigar a capacidade de recuperação das plantas ao estresse, como sugerido em diferentes culturas (JANGPROMMA et al., 2012; SALES et al., 2013; TRUJILLO et al., 2013; CHEN et al., 2016). Em milho, por exemplo, a capacidade de manter Fv/Fm foi correlacionada com a adaptabilidade e recuperação a seca (CHEN et al., 2016). Resultados semelhantes foram observados em nosso trabalho, em que a cultivar RB92579 teve baixa redução de Fv/Fm e conseguiu recuperar após o estresse. Em diversos estudos, foi relatado que o aparelho fotossintético de cultivares tolerantes à seca é rapidamente recuperado após o estresse (COLOM; VAZZANA, 2003; HUSEYNOVA et al., 2016).

O qN indica a energia de excitação gerada na condição de estresse hídrico e absorvida pelo PSII fechado. No entanto, ela não foi aproveitada na atividade fotoquímica e nem foi dissipada como calor (KATO et al., 2003; LIU et al., 2012). O aumento do qN em plantas sob déficit hídrico se relacionou com a diminuição do conteúdo de água na folha em trigo (ZIVCAK et al., 2013), e com a redução dos pigmentos fotossintetizantes e das trocas gasosas em cana-de-açúcar (CHA-UM; KIRDMANEE, 2009). Dessa maneira, podemos sugerir que a cultivar RB72454 teve baixo ajustamento osmótico, devido as menores concentrações de prolina e glicina betaína nas plantas estressadas. Isso fez com que o qN aumentasse afetando a ETR, Fv/Fm e  $\Phi$ PSII, além de não recuperarem até quatro dias após a reidratação, como visualizado nas correlações negativas entre esses parâmetros. Isso indica que a acumulação de energia de excitação no PSII fechado da RB72454, pode ter gerado estados excitados de Chl triplete ( $^3\text{Chl}^*$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (KATO et al., 2003), o que impediu a recuperação da ETR, Fv/Fm e  $\Phi$ PSII. Dessa maneira, aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio, e que devido a menor concentração de prolina sob estresse e completa degradação na reidratação, ela não teve o sistema antioxidante ativado. Em *Periploca sepium* foi encontrada relação estreitamente positiva entre a concentração de prolina e a atividade antioxidante, tanto no estresse quanto na reidratação (AN et al., 2013).

## 5 CONCLUSÕES

A cultivar RB92579 apresenta mecanismos de proteção do aparelho fotoquímico sob condição de deficiência hídrica, como menor redução da ETR, Fv/Fm e  $\Phi$ PSII sem aumentar o qN no início do déficit hídrico. Esses mecanismos mais ativos na RB92579 do que na RB72454, provavelmente ajudam a minimizar os efeitos prejudiciais do estresse. Além disso,

o acúmulo dos osmoprotetores prolina e glicina betaína na RB92579, sob condição de estresse hídrico, contribui na proteção e recuperação do aparelho fotoquímico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S. R.; AHMAD S. D.; SABIR S. M.; SHAH A. H. Detection of drought tolerant sugarcane genotypes (*Saccharum officinarum*) using lipid peroxidation, antioxidante activity, glycine-betaine and proline contentes. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 14, p. 233-243, 2014.

ABID, G.; M'HAMDI, M.; MINGEOT, D.; AOUIDA, M.; AROUA, I.; MUHOVSKI, Y.; SASSI, K.; SOUISSE, F.; MANNAI, K.; JEBARA, M. Effect of drought stress on chlorophyll fluorescence, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in faba bean (*Vicia faba* L.). **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 63, n. 4, p. 536-552, 2016.

AJITHKUMAR, I. P.; PANNEERSELVAM, R. ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of panicum sumatrense roth under drought stress. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, p. 587-595, 2014.

AN, Y.; ZHANG, M.; LIU, G.; HAN, R.; LIANG, Z. Proline accumulation in leaves of *periploca sepium* via both biosynthesis up-regulation and transport during recovery from severe drought. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 1-10, 2013.

ANJUM, S. A.; ASHRAF, U.; TANVEER, M.; KHAN, I.; HUSSAIN, S.; SHAHZAD, B.; WANG, L. C. Drought induced changes in growth, osmolyte accumulation and antioxidant metabolism of three maize hybrids. **Frontiers in plant science**, v. 8, n. 69, p. 1-11, 2017.

ANJUM, S. A.; TANVEER, M.; ASHRAF, U.; HUSSAIN, S.; SHAHZAD, B.; KHAN, I.; WANG, L. Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 17, p. 17132-17141, 2016.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.

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

CANAVAR, O.; GÖTZ, K.; ELLMER, F.; CHMIELEWSKI, F.; KAYNAK, M. A. Determination of the relationship between water use efficiency, carbon isotope discrimination and proline in sunflower genotypes under drought stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 2, p. 232-242, 2014.

CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of sugarcane (*saccharum officinarum* l.) Plantlets in response to iso-osmotic salt and water-deficit stress. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, p. 51-58, 2009.

CHA-UM, S.; SAMPHUMPHUANG, T.; KIRDMANEE, C. Glycinebetaine alleviates water deficit stress in indica rice using proline accumulation, photosynthetic efficiencies, growth performances and yield attributes. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, p. 213-218, 2013.

CHEN, D.; WANG, S.; CAO B.; CAO, D.; LENG, G.; LI, H.; YIN, L.; SHAN, L.; DENG, X. Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re-watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-15, 2016.

CHENG, Y.; DENG, X.; KWAK, S.; CHEN, W.; ENEJI, A. E. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing choline oxidase in chloroplasts against water stress. **Botanical Studies**, v. 54, n. 30, p. 1-9, 2013.

CIA, M. C.; GUIMARÃES, A. C. R.; MEDICI, L. O.; CHABREGAS, S. M.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant response to water deficit by drought-tolerant and sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, p. 313-324. 2012.

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

DANTAS NETO, J.; FIGUEIRÊDO, J. L. C.; FARIAS, C. H. A.; AZEVEDO, H. M.; AZEVEDO, C. A. V. Resposta da cana-de-açúcar, primeira soca, a níveis de irrigação e adubação de cobertura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.10, p.283-288, 2006.

ENDRES, L.; OLIVEIRA, N. G.; FERREIRA, V. M.; SILVA, J. V.; BARBOSA, G. V. S.; MAIA JUNIOR, S. O. Morphological and physiological response of sugarcane under abiotic stress to neonicotinoid insecticides. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 28, p. 347-355, 2016.

FLEXAS, J.; RIBAS-CARBO, M.; BOTA, J.; GALMES, J.; HENKLE, M.; MARTINEZ-CANELLAS, S.; MEDRANO, H. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. **New Phytologist**, v. 172, p. 73-82, 2006.

GRIEVE, C. M.; GRATAN, S. R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and Soil**, v. 70, p. 303-307, 1983.

GUAN, X. K.; SONG, L.; WANG, T. C.; TURNER, N. C.; LI, F. M. Effect of Drought on the Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence and Yield of Six Different-Era Spring Wheat Cultivars. **Journal of agronomy and crop science**, v. 201, n. 4, p. 253-266, 2015.

GUO, Y. Y.; YU, H. Y.; KONG, D. S.; YAN, F.; ZHANG, Y. J. Effects of drought stress on growth and chlorophyll fluorescence of *Lycium ruthenicum* Murr. Seedlings, **Photosynthetica**, v. 54, n. 4, p. 524-531, 2016.

HUSEYNOVA, I. M.; RUSTAMOVA, S. M.; SULEYMANOV, S. Y.; ALIYEVA, D. R.; MAMMADOV, A. C.; ALIYEV, J. A. Drought-induced changes in photosynthetic apparatus and antioxidant components of wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties. **Photosynthesis Research**, v. 130, p. 215-223, 2016.

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.

JANGPROMMA, N.; THAMMASIRIRAK, S.; JAISIL, P.; SONGSRI, P. Effects of drought and recovery from drought stress on above ground and root growth, and water use efficiency in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 8, p. 1298-1304, 2012.

KATO, M. C.; HIKOSAKA, K.; HIROTSU, N.; MAKINO, A.; HIROSE, T. The excess light energy that is neither utilized in photosynthesis nor dissipated by photoprotective mechanisms determines the rate of photoinactivation in photosystem II. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, p. 318-325, 2003.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 4, p. 609-619, 2015.

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; SREENATH R.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its

implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, p. 275-294, 2002.

LI R.; GUO P.; BAUMZ, M.; GRAND S.; CECCARELLI, S. Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. **Agricultural Sciences in China**, v. 5, n. 10, p. 751-757, 2006.

LIU, M.; QI, H.; ZHANG, Z. P.; SONG, Z. W.; KOU, T. J.; ZHANG, W. J.; YU, J. L. Response of photosynthesis and chlorophyll fluorescence to drought stress in two maize cultivars. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 34, p. 4751-4760, 2012.

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

OUKARROUMA, A.; MADIDI, S. E.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence *OLKJIP* under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 438-446, 2007.

RHEIN, A. F. L.; SANTOS, D. M. M.; CARLIN, S. D. Atividade da enzima redutase do nitrato e teores de prolina livre em raízes de cana-de-açúcar sob os estresses hídrico e ácido no solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1345-1360, 2011.

SALES, C. R. G.; RIBEIRO, R. V.; SILVEIRA, J. A. G.; MACHADO, E. C.; MARTINS, M. O.; LAGÔA, A. M. M. A. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 326-336, 2013.

SATBHAI, R. D.; NAIK, R. M. Osmolytes accumulation, cell membrane integrity, and antioxidant enzymes in sugarcane varieties differing in salinity tolerance. **Sugar Tech**, v. 16, n. 1, p. 30-35, 2014.

SCHREIBER, U. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. – In: Papageorgiou G.C., Govindjee (ed.): Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. p. 279-319. **Springer Publications**, Dordrecht, 2004.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: *Ecophysiology of Photosynthesis*. Edited by Schulze, E.D. and Caldwell M.M. pp. 49-70. **Springer**, 1994.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SHARMA, V.; SILVA, J. A. G.; CAPUTO, M. M.; DAMAJ, M. B.; GUIMARÃES, E. R.; FERRO, M. I. T. Use of physiological parameters in screening drought tolerance in sugarcane genotypes. **Sugar Tech**, v. 13, p. 191-197, 2011.

SINGH, D.; SINGH, C.K.; TAUNK, J.; TOMAR, R. S. S.; CHATURVEDI, A. K.; GAIKWAD, K.; PAL, M. Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress. **BMC Genomics**, v. 18, n. 206, p. 1-20, 2017.

TRUJILLO, I.; RIVAS, M.; CASTRILLO, M. Leaf recovery responses during rehydration after water deficit in two bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 4, p. 360-369, 2013.

VAN DILLEWIJN, C. Botany of sugarcane. **Chronica Botanica**, Waltham, 1952.

VAN KOOTEN, O.; SNEL, J. F. H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25, p. 147-150, 1990.

VANKOVÁ, R.; DOBRÁ, J.; ŠTORCHOVÁ, H. Recovery from drought stress in tobacco: an active process associated with the reversal of senescence in some plant parts and the sacrifice of others. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 1, p. 19-21, 2012.

VITTI, G. C.; LUZ, P. H. C.; ALTRAN, W. S. Nutrição e adubação. In: SANTOS F.; BORÉM, A. (eds) **Cana-de-açúcar: do plantio à colheita**. UFV, Viçosa, 2013.

WANG, G. P.; ZHANG, X.Y.; LI, F.; LUO, Y.; WANG, W. Overaccumulation of glycine betaine enhances tolerance to drought and heat stress in wheat leaves in the protection of photosynthesis. **Photosynthetica**, v. 48, n. 1, p. 117-126, 2010.

ZHANG, L. X.; LAI, J. H.; LIANG, Z. S.; ASHRAF, M. Interactive effects of sudden and gradual drought stress and foliar-applied glycinebetaine on growth, water relations, osmolyte accumulation and antioxidant defence system in two maize cultivars differing in drought tolerance. **Journal Agronomy Crop Science**, v. 200, p. 425-433, 2014.

ZHANG, C.; ZHAN, D. X.; LUO, H. H.; ZHANG, Y. L.; ZHANG, W. F. Photorespiration and photoinhibition in the bracts of cotton under water stress. **Photosynthetica**, v. 54, n. 1, p. 12-18, 2016.

ZIVCAK, M.; BRESTIC, M.; BALATOVA, Z.; DREVENAKOVA, P.; OLSOVSKA, K.; KALAJI, H. M.; YANG, X.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. **Photosynthesis Research**, v. 117, n. 1-3, p. 529-546, 2013.

## CAPÍTULO V

### A APLICAÇÃO FOLIAR DE GLICINA BETAÍNA EM CANA-DE-AÇÚCAR MINIMIZA OS DANOS CAUSADOS PELO DÉFICIT HÍDRICO NAS TROCAS GASOSAS, EFICIÊNCIA FOTOQUÍMICA E RELAÇÕES HÍDRICAS

#### RESUMO

A cana-de-açúcar está entre as culturas agrícolas mais importantes do mundo. No entanto, enfrenta quedas de produção causada por secas esporádicas durante o cultivo. Diante disso, vem sendo utilizadas diferentes estratégias para atenuar essa condição, como a aplicação exógena de glicina betaína. Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação foliar de glicina betaína sobre as trocas gasosas, fluorescência da clorofila e condição hídrica da cana-de-açúcar sob déficit hídrico e reidratação. O experimento foi realizado em casa de vegetação utilizando-se a cultivar RB92579. O delineamento foi em blocos casualizados em esquema fatorial 3 x 2. Os fatores consistiram, respectivamente, de três aplicações de glicina betaína: G0 - sem GB, G1 - uma aplicação de GB, e G2 - duas aplicações de GB, e dois tratamentos hídricos: irrigado adequadamente (controle) e suspensão da irrigação (estresse). A aplicação foliar de glicina betaína ajudou na manutenção das trocas gasosas, da eficiência fotoquímica do PSII, de água nos tecidos, além de favorecer no menor excesso de energia no PSII e fotoinibição. Isso não foi observado nas plantas sem glicina betaína. A glicina betaína foliar atenua os efeitos negativos do estresse na fisiologia da cana-de-açúcar, além de auxiliar na recuperação.

Palavras-chaves: *Saccharum officinarum*. Estresse hídrico. Osmoproteção. Fotossíntese. Fotoinibição.

#### 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) está entre as culturas agrícolas mais importantes do mundo. Há muitos anos, destaca-se na produção de açúcar e álcool, sendo que, ultimamente, a cultura também tem ganhado espaço no cenário da geração de energias renováveis, com o aproveitamento máximo da biomassa (SILVA et al., 2012; BARBOSA et al., 2015). No entanto, o déficit hídrico é um dos fatores que mais tem prejudicado o desenvolvimento e a produção da cultura, principalmente em regiões tropicais (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; SILVA et al., 2011; JANGPROMMA et al., 2012), afetando

negativamente processos primordiais ao crescimento e produção das plantas, como as trocas gasosas e a eficiência do PSII (COLOM; VAZZANA, 2003; ZIVCAK et al., 2013).

O déficit hídrico prejudica a condutância estomática, transpiração, fotossíntese, eficiência fotoquímica máxima e o rendimento efetivo do PSII (GUAN et al., 2015; GUO et al., 2016; ZHANG et al., 2016). O fechamento dos estômatos é uma das primeiras respostas ocasionadas pela deficiência hídrica. Essa estratégia busca diminuir a perda de água com a redução da transpiração, mas pode ser revertida a depender da intensidade do estresse sem causar maiores danos (INMAM-BAMBER et al., 2012; JANGPROMMA et al., 2012; GUAN et al., 2015). Contudo, se o estresse for muito severo e as plantas permanecerem com os estômatos fechados, a taxa fotossintética é reduzida pela limitação difusiva de CO<sub>2</sub> (ZIVCAK et al., 2013). Portanto, com a redução das trocas gasosas o acúmulo final de biomassa pode ser efetivamente prejudicado (MEDEIROS et al., 2013; BARBOSA et al., 2015).

O déficit hídrico também induz a fotoinibição e fotodestruição dos complexos pigmentos-proteínas do PSII, além da desestabilização das membranas fotossintéticas. Esses fotodanos podem ser resultados do excesso de energia que não é aproveitado pelo processo fotossintético, causando danos ao aparato fotoquímico com a fotoinativação dos centros de reação do PSII (KATO et al., 2003; SALES et al., 2013). Essas informações são obtidas com a análise da fluorescência da clorofila que pode indicar até que ponto o PSII está usando a energia absorvida pela clorofila e, a maneira como está sendo afetado pelo excesso de luz (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Em regiões tropicais, onde o déficit hídrico geralmente está associado com aumento da irradiância e da temperatura, pode ocorrer excesso de energia nos fotossistemas causando a fotoinibição e redução da fotossíntese (SCHREIBER, 2004; SALES et al., 2013). Além disso, as relações hídricas das plantas também são afetadas, como o teor relativo e o potencial de água da folha (ZHANG et al., 2014). O teor relativo de água representa um indicador do balanço hídrico da planta expressando a quantidade de água que a planta requer para atingir a turgescência. Dessa maneira, o teor relativo indica o nível de água das células ideal para o metabolismo fisiológico das plantas (FAROOQ et al., 2008; ZHANG et al., 2014). A diminuição no teor relativo de água altera as funções fisiológicas, como a integridade do aparelho fotossintético de plantas de cana-de-açúcar (MEDEIROS et al., 2013).

A capacidade da planta para suportar a deficiência hídrica, bem como a recuperação fotossintética após a reidratação, é uma expressão dependente da tolerância à seca que pode impedir a redução do rendimento das culturas (JANGPROMMA et al., 2012; ANJUM et al., 2016). Contudo, é importante ressaltar que a tolerância à seca é um mecanismo altamente

complexo, que varia significativamente entre as espécies de plantas, além de depender da duração da limitação hídrica e da capacidade de recuperação (FAROOQ et al. 2009; JANGPROMMA et al., 2012; TRUJILLO et al., 2013).

Nos últimos anos, tem se recorrido a diferentes estratégias tanto para atenuar quanto para recuperar os efeitos causados pelo estresse hídrico nas plantas. Entre elas, está a aplicação foliar de glicina betaína, como relatado nas culturas de milho (ANJUM et al., 2011; 2012), girassol (IQBAL et al., 2008), arroz (FAROOQ et al., 2008; CHA-UM et al., 2013), trigo (MA et al., 2006; WANG et al., 2010) e tabaco (MA et al., 2007), com o intuito de minimizar as perdas na produção. Ademais, a aplicação foliar de glicina betaína tem sido mais eficiente do que outros meios como, por exemplo, via sementes (FAROOQ et al., 2008).

A glicina betaína é o composto de amônio quaternário mais conhecido em plantas superiores, sintetizado endogenamente nos cloroplastos em resposta a vários estresses abióticos, como a seca. Em diversas culturas a sua concentração é correlacionada com a capacidade de tolerância ao estresse (ASHARAD; FOOLAD, 2007; DAWOOD, 2016).

O uso de glicina betaína em plantas sob déficit hídrico pode aumentar a síntese de solutos compatíveis, melhorando o status de água dos tecidos e as trocas gasosas (FAROOQ et al., 2008). Além disso, a aplicação de glicina betaína também pode reduzir a peroxidação de lipídeos e a degradação das membranas celulares em plantas estressadas, melhorando assim o crescimento e a adaptação ao déficit hídrico (ANJUM et al., 2012).

Nossa hipótese é que a glicina betaína atue positivamente atenuando os danos causados pelo déficit hídrico em cana-de-açúcar, além de melhorar a capacidade de recuperação. Portanto, objetivou-se com esse trabalho avaliar a aplicação foliar de glicina betaína no comportamento fisiológico de cana-de-açúcar sob déficit hídrico e reidratação.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal e condições de crescimento**

O experimento foi conduzido no Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Brasil (9° 28' S, 35° 49' W, e 127 m de altitude) em condições de casa de vegetação. O plantio foi realizado em vasos com capacidade de 13,58 dm<sup>3</sup> e preenchidos com 15 kg de solo, cujas características físico-químicas encontram-se na Tabela 1.

O solo foi previamente corrigido com calcário dolomítico, e incubado por 60 dias. Posteriormente, foi adubado com 0,625 g de ureia, 1,80 g de superfosfato simples e 1,75 g de cloreto de potássio em cada vaso, conforme Vitti et al. (2013). Para o plantio foram utilizados rebolos da cultivar RB92579, contendo uma gema cada, obtidos do Programa de

Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar (PMGCA/CECA/UFAL). Os rebolos foram plantados três por vaso. Aos 30 dias realizou-se o desbaste deixando-se uma planta por vaso, em que apenas o perfilho primário foi mantido para a avaliação, para eliminar a possível ocupação desuniforme nos vasos.

**Tabela 1.** Caracterização físico-química do solo utilizado no experimento.

Características químicas															
pH	MO	P <sub>resina</sub>	Al <sup>3+</sup>	H+Al	K	Ca	Mg	CTC	Na	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn
CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	-----	-----	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	-----	-----	-----	-----	%	-----	-----	mg dm <sup>-3</sup>	-----	-----
4,6	27,5	26,5	----	4,0	0,85	1,65	1,05	7,55	0,35	47	0,27	0,25	100	1,3	0,5
Características físicas															
Areia total				Argila		Silte		Classificação textural							
-----				g Kg <sup>-1</sup>		-----		Argilo arenoso							
599				368		33									

pH: potencial hidrogeniônico; MO: matéria orgânica; P: fósforo; Al<sup>3+</sup>: alumínio trocável; H: hidrogênio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; CTC: capacidade de troca catiônica; Na: sódio; V: saturação por bases; B: boro; Cu: cobre; Fe: ferro; Mn: manganês; Zn: zinco

## 2.2 Tratamentos hídricos e aplicação foliar de glicina betaína

As plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas com suprimento adequado de água até os 90 dias e então foram submetidas aos seguintes tratamentos: G0C = irrigado e sem aplicação de glicina betaína (GB), G0E = déficit hídrico e sem aplicação de GB, G1C = irrigado e com uma aplicação de GB, G1E = déficit hídrico e com uma aplicação de GB, G2C = irrigado e com duas aplicações de GB, G2E = déficit hídrico e com duas aplicações de GB. Glicina Betaína PA (Sigma Aldrich) foi utilizada na concentração de 100 mM (IQBAL et al., 2008; ANJUM et al., 2012), e aplicada aos 63 dias (G1 e G2) e aos 73 dias após o plantio (G2). A aplicação foi realizada individualmente por folha até o escoamento (ANJUM et al., 2012). Nas aplicações sem glicina betaína (G0 aos 63, e G0 e G1 aos 73 dias) foi aplicada água deionizada. Os tratamentos foram organizados em delineamento de blocos casualizados, em arranjo fatorial 3 x 2, com sete repetições.

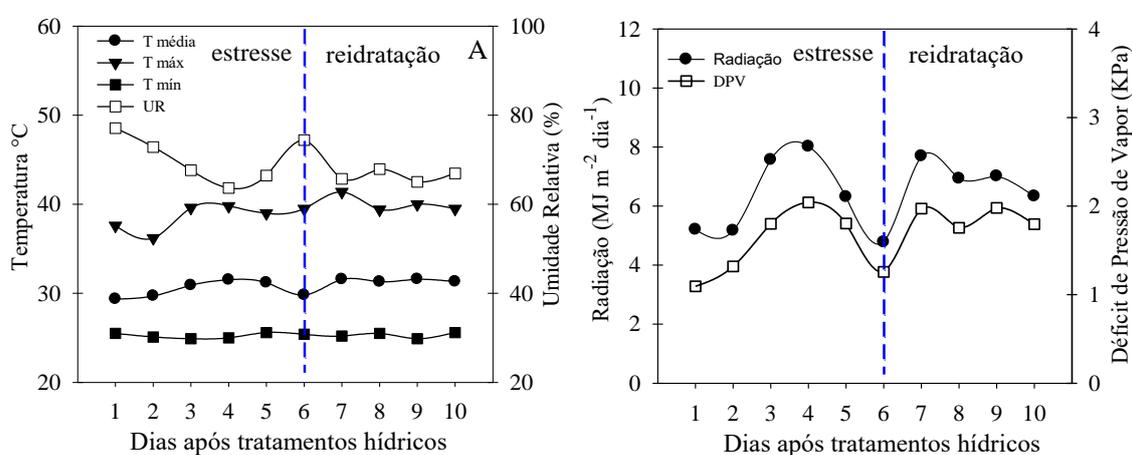
Os tratamentos hídricos consistiram da suspensão da irrigação nos tratamentos de estresse, enquanto o tratamento controle foi mantido irrigado como referência para comparação. O teor de água no solo (Figura 2) foi monitorado regularmente por um medidor de umidade SM200 (Delta T Device, England) a dez cm de profundidade. O período de estresse ocorreu até a ocasião em que se visualizou a murcha e enrolamento das folhas+1,

bem como o início da senescência nas folhas mais velhas. A classificação das folhas foi feita de acordo com o sistema Kuijper (VAN DILLEWIJN, 1952).

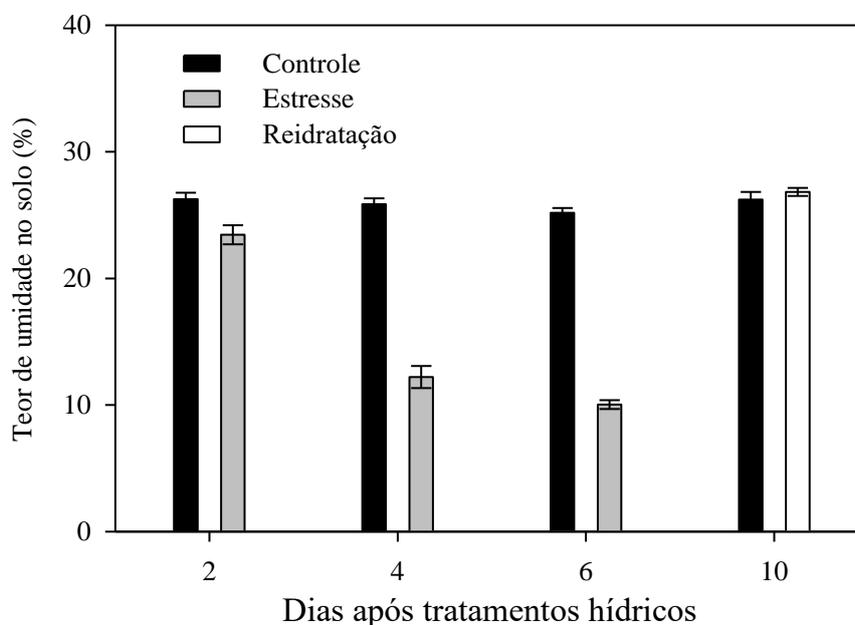
O teor de água do solo foi determinado pelo método gravimétrico. Para tanto, um vaso preenchido com solo foi posto à saturação por ascensão capilar durante 24 horas, e deixado sob drenagem livre por igual período. Posteriormente, uma amostra do solo úmido foi retirada, pesada e seca em estufa a 105 °C por 24 horas, e pesada novamente. A partir desses dados calculou-se o teor de água (%) com base no peso, como:  $Umidade = (\text{peso do solo úmido} - \text{peso do solo seco}) / \text{peso do solo seco} \times 100$ . A umidade da amostra foi de 24,6%. Conhecendo-se o volume de solo do vaso e o teor máximo de umidade retida pelo solo foi estipulado o volume de água a ser irrigado no tratamento adequado de água (controle).

As condições microclimáticas da casa de vegetação (Figura 1) foram registradas por uma estação meteorológica automática (DELTA-T Devices, Cambridge – England).

**Figura 1.** Temperaturas máxima, média e mínima do ar, umidade relativa média do ar (A), radiação média incidente e déficit de pressão de vapor do ar (B) durante o período de estresse hídrico e reidratação.



**Figura 2.** Monitoramento do teor de umidade no solo (%) nos diferentes dias após os tratamentos hídricos: controle, estresse e reidratação. As barras verticais indicam o erro padrão da média.



### 2.3 Trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas foliares foram avaliadas entre 9 e 11 horas do dia após dois, quatro e seis dias da imposição do estresse hídrico, e quatro dias após a reidratação. As avaliações foram mensuradas na primeira folha totalmente expandida (folha +1) usando um analisador de gás infravermelho modelo LI-6400XT (Licor, EUA). A taxa de fluxo da amostra foi ajustada para  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e a temperatura da câmara para  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ . A intensidade de luz transmitida pela fonte de luz LED 6400-02B foi de  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD. Foram avaliadas a taxa fotossintética ( $A$ ), a taxa de transpiração ( $E$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ), a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), a eficiência instantânea de carboxilação ( $E_iC$ ) e a eficiência instantânea no uso da água ( $EUA$ ).  $E_iC$  e  $EUA$  foram obtidas relacionando a fotossíntese líquida com a concentração interna de  $\text{CO}_2$  e com a transpiração, respectivamente.

### 2.4 Fluorescência da clorofila

A fluorescência da clorofila foi avaliada no pré-amanhecer e ao meio-dia utilizando um fluorômetro portátil (PAM 2500, WALZ). A fluorescência inicial ( $F_o$ ) e máxima ( $F_m$ ) foram medidas nas folhas adaptadas ao escuro durante 30 min.  $F_o$  foi medida por uma luz modulada de baixa intensidade ( $<0,6 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de modo a não induzir nenhuma fluorescência variável significativa.  $F_m$  foi estimada pela iluminação com um pulso de  $10.000 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  por 0,8 s. A eficiência fotoquímica máxima do PSII foi calculada por  $F_v/F_m$  (MAXWELL; JOHNSON, 2000). A eficiência fotoquímica efetiva ( $\Phi\text{PSII}$ ) foi quantificada nas mesmas folhas às 10:00 da manhã (BAKER, 2008). A fotoinibição (Fot) foi calculada como: Fotoinibição (%) =  $100 - (F_v/F_m \text{ meio-dia}/F_v/F_m \text{ amanhecer} \times 100)$  (DODD et al., 1998; KOYRO et al., 2013). O excesso relativo de PPFD (EXC) foi calculado como a diferença entre  $F_v/F_m$  meio-dia e  $\Phi\text{PSII}$ , relacionados com  $F_v/F_m$  meio-dia (BILGER et al., 1995).

## 2.5 Status hídrico foliar

O potencial hídrico foliar ( $\Psi_w$ ) e o teor relativo de água da folha (TRA) foram mensurados após seis dias de estresse e quatro da reidratação.

O  $\Psi_w$  foi avaliado na primeira folha totalmente expandida (folha +1) usando uma câmara de pressão (modelo 3005, Santa Barbara, EUA). As medições foram realizadas às 4:30 h (pre-dawn) e às 12 horas (meio-dia).

O TRA foi determinado como descrito por Zhang et al. (2014). Dez discos de folhas de 0,6 cm de diâmetro foram retirados das folhas+1 de uma planta de cada repetição. Primeiro, a massa fresca (MF) foi registrada e, em seguida, as amostras foram submersas em água destilada durante 24 h para obter a saturação. A massa túrgida (MT) foi então obtida, e os discos foliares foram colocados em estufa com circulação de ar a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 h, para determinação da massa seca. O teor relativo de água foi calculado por:  $\text{TRA (\%)} = [(MF - MS)/(MT - MS)] \times 100$ .

## 2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a  $p < 0,05$  (Sisvar 5.6). A correlação de Pearson ( $r$ ) foi utilizada para verificar a relação entre as variáveis analisadas em cada condição hídrica. Todo o conjunto de dados também foi submetido à análise de componentes principais (PCA), para obter uma ampla visão sobre a atuação das aplicações de GB em cada condição hídrica.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Trocas gasosas

A suspensão da irrigação reduziu a  $g_s$  a partir do segundo dia de estresse (Tabela 2, Figura 3A). No quarto dia de estresse as plantas tratadas com G1 e G2 mantiveram a  $g_s$  maior 81,5 e 84%, respectivamente, que as plantas G0. O mesmo ocorreu com a transpiração em que nas plantas tratadas com G1 e G2, a  $E$  foi maior 74 e 75,4%, respectivamente, que as plantas G0 (Tabela 2, Figura 3B). No entanto, após a reidratação tanto  $g_s$  quanto  $E$  se recuperaram, independentes da aplicação de GB.

A fotossíntese foi severamente afetada pelo estresse hídrico, de forma que as plantas não conseguiram se recuperar após quatro dias de reidratação (Tabela 2, Figura 3C). A GB se mostrou eficiente na manutenção da fotossíntese das plantas a partir do quarto dia de estresse, em que no sexto dia G1 e G2 conseguiram manter uma fotossíntese 79 e 80% acima de G0, respectivamente, nas plantas sob estresse. Essa diferença entre os tratamentos de GB se manteve inclusive após a reidratação, em que nas plantas do tratamento G0 a  $A$  foi em média 30% menor que G1 e G2, sendo estes últimos completamente recuperados. A fotossíntese se correlacionou com  $E$ ,  $EiC$  e  $EUA$ , sob estresse hídrico, e com  $g_s$ ,  $E$ ,  $EiC$ ,  $EUA$ ,  $\Phi PSII$  (positivamente) e  $EXC$  (negativamente), na reidratação (Tabela 3).

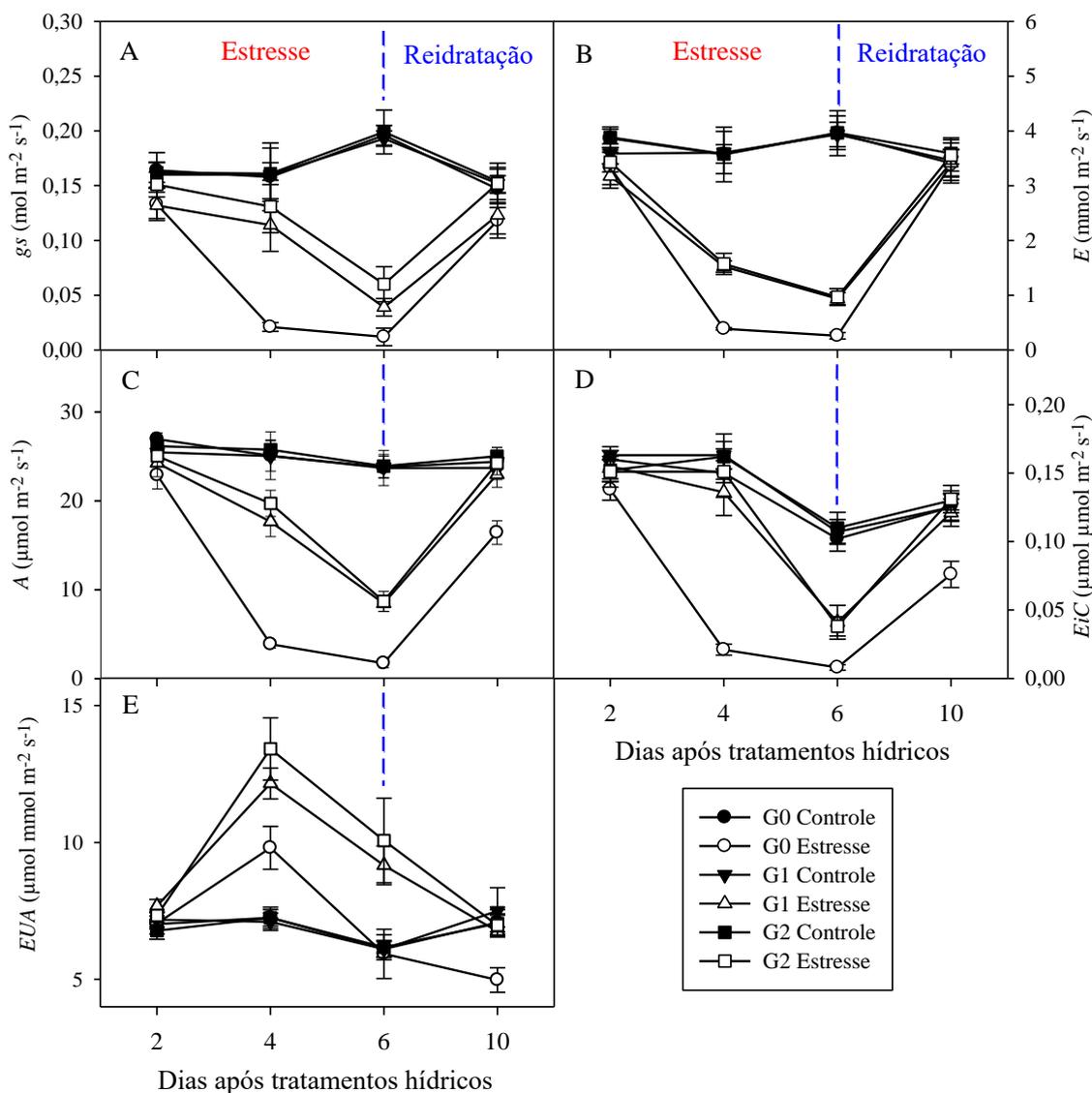
De outra maneira, a concentração interna de dióxido de carbono ( $C_i$ ) não foi influenciada pelo estresse hídrico, tampouco pela aplicação de GB (Tabela 2). Já a  $EiC$ , após quatro dias de estresse, foi maior 84 e 86% nas plantas G1 e G2 respectivamente, em relação a G0 (Tabela 2, Figura 3D). Essa redução da  $EiC$  em G0 não foi recuperada após a reidratação, ficando 39% menor que no controle, enquanto G1 e G2 recuperaram completamente. De maneira semelhante, a  $EUA$  aumentou nas plantas G1 e G2 a partir dos quatro dias de estresse (Tabela 2), sendo que no sexto dia, a  $EUA$  nessas plantas foi maior 54 e 70%, respectivamente, que nas plantas G0 (Figura 3E). No entanto, a redução em G0 se recuperou após a reidratação, ficando a diferença apenas entre as plantas estressadas e controle, independente da aplicação de GB. Após a reidratação tanto a  $EiC$  quanto a  $EUA$  se correlacionaram positivamente com  $F_v/F_m$  e  $\Phi PSII$ , e negativamente com  $EXC$  e  $Fot$  (Tabela 3).

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância dos parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila e relações hídricas em cana-de-açúcar com aplicação foliar de glicina betaína, e submetida a déficit hídrico e reidratação.

Var	FV	2 DAE		4 DAE		6 DAE		4 DAR	
		F	P	F	P	F	P	F	P
gs	G	0,437	0,650 <sup>ns</sup>	3,719	0,036*	2,312	0,116 <sup>ns</sup>	0,863	0,432 <sup>ns</sup>
	W	5,183	0,030*	15,256	0,000***	267,21	0,000***	2,283	0,141 <sup>ns</sup>
	GxW	0,360	0,700 <sup>ns</sup>	3,400	0,046*	1,910	0,165 <sup>ns</sup>	0,477	0,625 <sup>ns</sup>
E	G	0,913	0,412 <sup>ns</sup>	3,585	0,040*	1,500	0,239 <sup>ns</sup>	0,183	0,833 <sup>ns</sup>
	W	6,919	0,013*	135,58	0,000***	259,55	0,000***	0,023	0,879 <sup>ns</sup>
	GxW	0,038	0,962 <sup>ns</sup>	3,343	0,048*	1,550	0,228 <sup>ns</sup>	0,000	0,999 <sup>ns</sup>
Ci	G	1,655	0,208 <sup>ns</sup>	3,872	0,031*	0,105	0,900 <sup>ns</sup>	1,002	0,378 <sup>ns</sup>
	W	1,368	0,251 <sup>ns</sup>	1,303	0,262 <sup>ns</sup>	1,879	0,180 <sup>ns</sup>	0,293	0,592 <sup>ns</sup>
	GxW	0,286	0,753 <sup>ns</sup>	1,785	0,185 <sup>ns</sup>	0,028	0,972 <sup>ns</sup>	1,434	0,254 <sup>ns</sup>
A	G	0,252	0,779 <sup>ns</sup>	19,065	0,000**	5,151	0,011*	6,057	0,006 <sup>ns</sup>
	W	4,979	0,033*	97,533	0,000***	289,28	0,000***	7,860	0,008**
	GxW	1,045	0,364 <sup>ns</sup>	17,198	0,000**	4,684	0,017*	3,328	0,049*
A/Ci	G	0,686	0,511 <sup>ns</sup>	16,767	0,000**	3,149	0,057 <sup>ns</sup>	7,152	0,002**
	W	0,428	0,518 <sup>ns</sup>	25,288	0,000**	116,29	0,000***	6,947	0,013*
	GxW	1,546	0,229 <sup>ns</sup>	11,441	0,000**	1,446	0,251 <sup>ns</sup>	5,605	0,008**
A/E	G	1,437	0,253 <sup>ns</sup>	3,759	0,034*	4,023	0,028*	2,716	0,082 <sup>ns</sup>
	W	2,737	0,108 <sup>ns</sup>	71,805	0,000**	12,735	0,001**	5,366	0,027*
	GxW	0,589	0,561 <sup>ns</sup>	3,881	0,031*	3,858	0,032*	2,015	0,151 <sup>ns</sup>
Fv/Fm 4:30h	G	1,857	0,173 <sup>ns</sup>	0,127	0,880 <sup>ns</sup>	1,117	0,340 <sup>ns</sup>	0,697	0,506 <sup>ns</sup>
	W	1,246	0,273 <sup>ns</sup>	7,226	0,011*	24,682	0,000**	5,392	0,027*
	GxW	0,325	0,725 <sup>ns</sup>	0,041	0,959 <sup>ns</sup>	0,534	0,591 <sup>ns</sup>	0,182360	0,700 <sup>ns</sup>
Fv/Fm 12h	G	0,055	0,946 <sup>ns</sup>	6,691	0,004**	6,641	0,004**	2,164	0,132 <sup>ns</sup>
	W	0,699	0,409 <sup>ns</sup>	55,404	0,000**	106,61	0,000***	13,184	0,001**
	GxW	0,676	0,516 <sup>ns</sup>	5,482	0,009**	5,853	0,007**	1,563	0,226 <sup>ns</sup>
ΦPSII	G	0,304	0,739 <sup>ns</sup>	2,863	0,072 <sup>ns</sup>	14,436	0,000***	8,397	0,001**
	W	3,015	0,092 <sup>ns</sup>	43,859	0,000**	386,23	0,000***	1,052	0,313 <sup>ns</sup>
	GxW	0,021 <sup>ns</sup>	0,979 <sup>ns</sup>	2,612	0,090 <sup>ns</sup>	16,906	0,000***	8,308	0,001**
EXC	G	0,210 <sup>ns</sup>	0,811 <sup>ns</sup>	1,783	0,185 <sup>ns</sup>	12,217	0,000***	5,699	0,008*
	W	2,151 <sup>ns</sup>	0,152 <sup>ns</sup>	25,902	0,000**	266,18	0,000***	0,070	0,792 <sup>ns</sup>
	GxW	0,110 <sup>ns</sup>	0,896 <sup>ns</sup>	1,725	0,195 <sup>ns</sup>	14,809	0,000***	3,774	0,007*
Fot	G	0,357 <sup>ns</sup>	0,702 <sup>ns</sup>	7,259	0,002**	8,014	0,001**	4,618	0,017*
	W	1,815 <sup>ns</sup>	0,187 <sup>ns</sup>	42,951	0,000**	108,44	0,000***	7,332	0,011*
	GxW	0,837 <sup>ns</sup>	0,442 <sup>ns</sup>	7,163	0,002**	8,576	0,001**	3,446	0,045*

Var.: variáveis; FV: Fontes de variação; G: tratamento com glicina betaína; W: tratamento hídrico; DAE: dias após estresse; DAR: dias após reidratação; F: F calculado; P: probabilidade de significância; ns: não significativo; \*, \*\*, \*\*\* significativo a p<0,05, 0,01 e 0,001, respectivamente.

**Figura 3.** Condutância estomática -  $g_s$  (A); transpiração -  $E$  (B); fotossíntese -  $A$  (C); eficiência de carboxilação -  $EiC$  (D); e eficiência no uso da água -  $EUA$  (E) em cana-de-açúcar com aplicação foliar de glicina betaína, e submetida a déficit hídrico e reidratação.



G0: sem aplicação de glicina betaína; G1: com uma aplicação de glicina betaína e G2: com duas aplicações de glicina betaína. As barras verticais indicam o erro padrão da média.

### 3.2 Fluorescência da clorofila

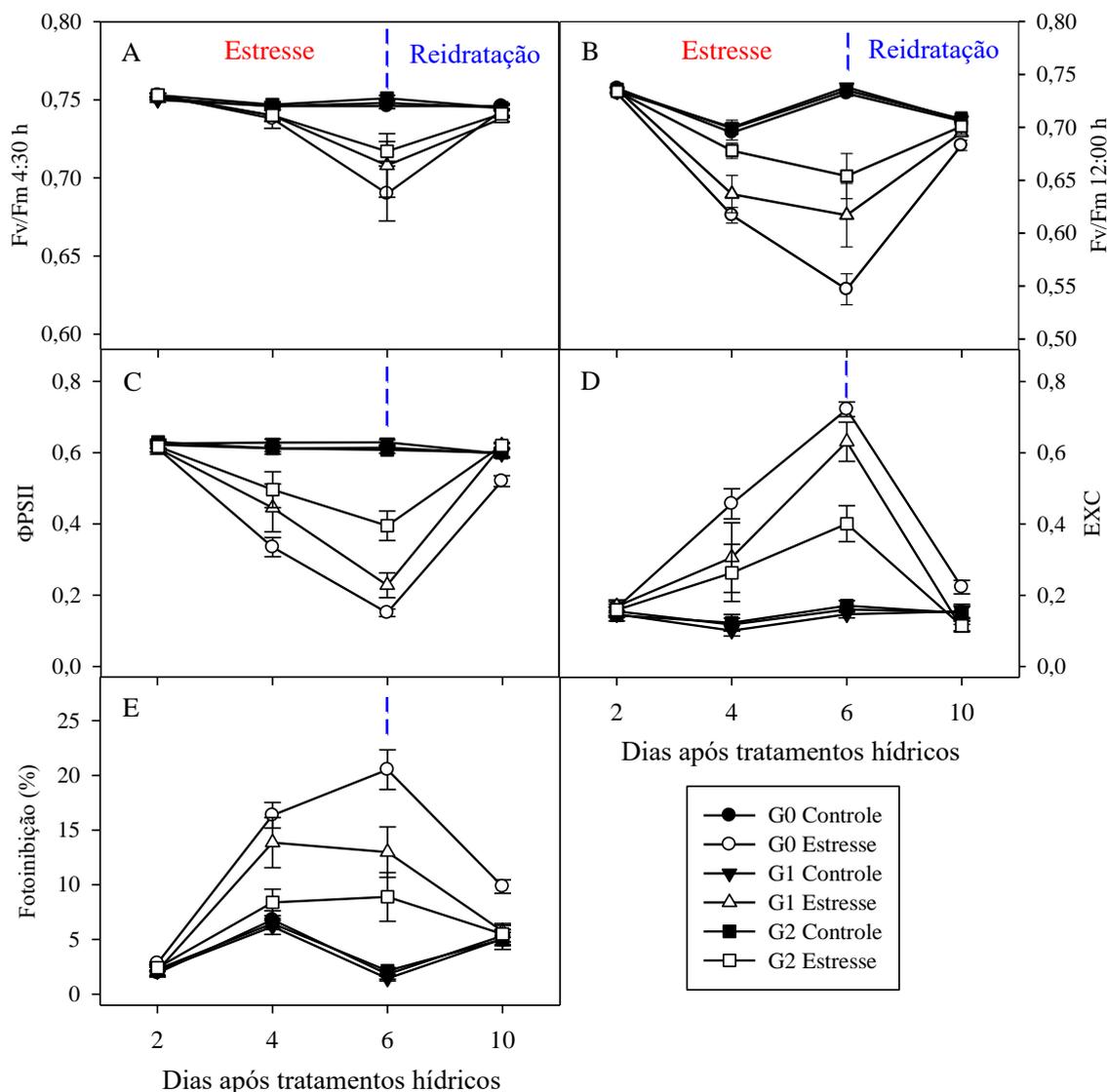
A razão  $F_v/F_m$  ao amanhecer foi influenciada apenas pela suspensão da irrigação, a partir do quarto dia de estresse até a reidratação (Tabela 2), sendo ligeiramente inferior nas plantas estressadas em relação às plantas do tratamento controle (Figura 4A). Já a razão  $F_v/F_m$  ao meio-dia foi maior nas plantas estressadas de G1 e G2, no quarto e sexto dia de estresse (Tabela 2), sendo que aos seis dias, as plantas G1 e G2 tiveram  $F_v/F_m$  11 e 16%

acima de G0, respectivamente (Figura 4B). No entanto, G0 se recuperou após a reidratação, ficando a diferença apenas entre as plantas estressadas e controle, independente da aplicação de GB. A razão Fv/Fm se correlacionou negativamente com EXC e Fot, sob estresse, e com Fot na reidratação (Tabela 3).

A  $\Phi$ PSII foi afetada pelo estresse hídrico a partir dos quatro dias (Tabela 2). No sexto dia de estresse, a  $\Phi$ PSII nas plantas G1 e G2 foi 34 e 61% acima de G0, respectivamente (Figura 4 C). Após a reidratação, essa diferença diminuiu para 16% em média, de G1 e G2 em relação a G0. A  $\Phi$ PSII se correlacionou negativamente com EXC e Fot, tanto no estresse, quanto na reidratação (Tabela 3).

Como observado nas correlações, as reduções provocadas pelo estresse hídrico em Fv/Fm e  $\Phi$ PSII influenciaram diretamente no EXC e na Fot. Por sua vez, o EXC foi afetado pelo estresse hídrico a partir dos quatro dias (Tabela 2), sendo que aos seis dias de estresse, o EXC nas plantas G1 e G2 foi 12,6 e 44,5% menor que em G0, respectivamente (Figura 4D). Após a reidratação, o EXC em G0 ainda foi maior 50% em média, que G1 e G2. Do mesmo modo, a Fot também foi afetada pelo estresse hídrico a partir dos quatro dias (Tabela 2), sendo que aos seis dias de estresse, a Fot nas plantas G1 e G2 foi 37 e 57% menor que em G0, respectivamente (Figura 4E). Após a reidratação, a Fot em G1 e G2 ainda foi menor 42 e 44% que G0, respectivamente. EXC e Fot se correlacionaram positivamente, quando as plantas estavam sob condição de estresse hídrico (Tabela 3).

**Figura 4.** Eficiência fotoquímica máxima do PSII -  $F_v/F_m$ , ao amanhecer (A) e ao meio-dia (B), eficiência fotoquímica efetiva do PSII -  $\Phi_{PSII}$  (C), excesso relativo de energia no PSII - EXC (D), e fotoinibição - Fot (E) em cana-de-açúcar com aplicação foliar de glicina betaína, e submetida a déficit hídrico e reidratação.



G0: sem aplicação de glicina betaína; G1: com uma aplicação de glicina betaína e G2: com duas aplicações de glicina betaína. As barras verticais indicam o erro padrão da média.

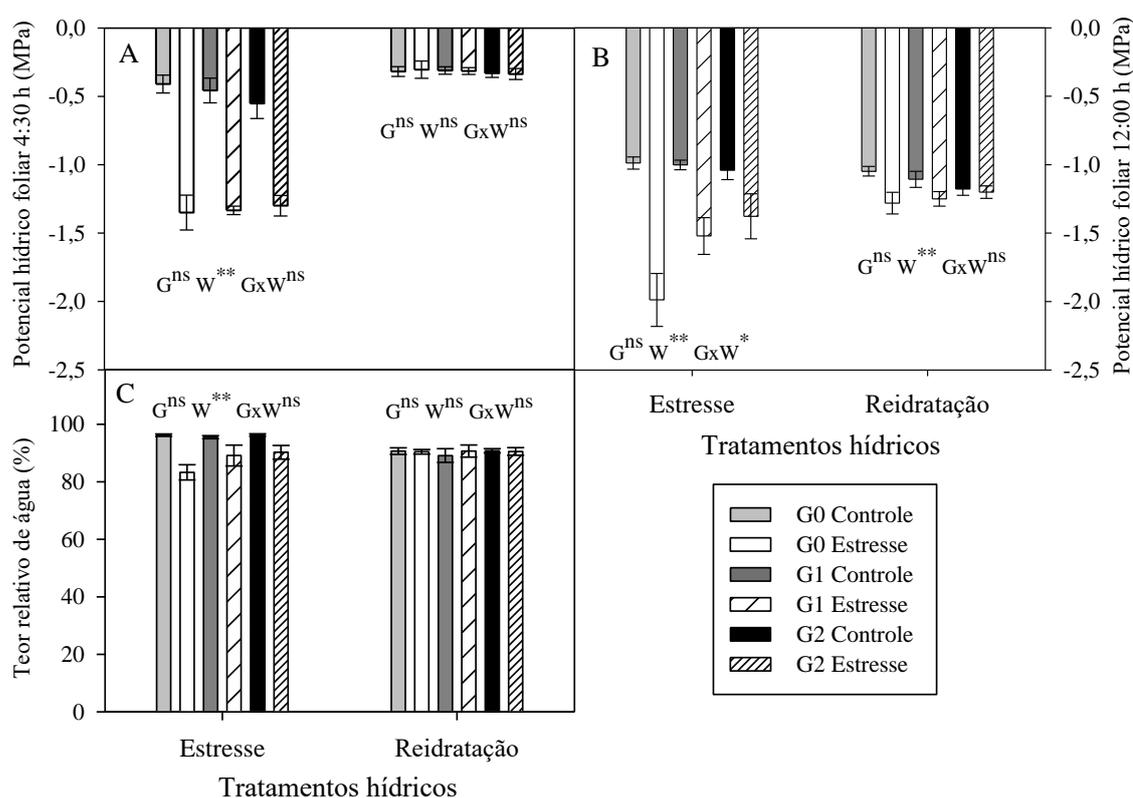
### 3.3 Status hídrico foliar

Aos seis dias de estresse, o  $\Psi_w$  ao amanhecer diminuiu nas plantas estressadas independente da aplicação de GB, mas se recuperou após a reidratação (Figura 5A). Já o  $\Psi_w$  ao meio-dia foi menor 3 e 7% nas plantas G0 que nas G1 e G2, respectivamente (Figura 5B).

Após a reidratação, todas as plantas reidratadas ainda tiveram o  $\Psi_w$  menor que no controle, independente da aplicação de GB. O  $\Psi_w$  se correlacionou positivamente com  $g_s$ ,  $E$ ,  $EiC$ ,  $Fv/Fm$  e  $TRA$ , no estresse hídrico, e negativamente com  $Fot$ , na reidratação (Tabela 3).

O  $TRA$ , no sexto dia de estresse, foi menor nas plantas estressadas em relação às do tratamento controle, recuperando-se completamente após a reidratação (Figura 5C). O  $TRA$  se correlacionou positivamente com  $g_s$ ,  $EiC$  e  $Fv/Fm$ , sob estresse hídrico, e com  $g_s$  na reidratação (Tabela 3).

**Figura 5.** Potencial hídrico da folha ao amanhecer (A) e ao meio-dia (B), e teor relativo de água na folha (C) em cana-de-açúcar com aplicação foliar de glicina betaína, e submetida a déficit hídrico e reidratação.



G: tratamento com glicina betaína; W: tratamento hídrico; GxW: interação entre o tratamento com glicina betaína e o tratamento hídrico; G0: sem aplicação de glicina betaína; G1: com uma aplicação de glicina betaína e G2: com duas aplicações de glicina betaína; ns: não significativo; \*, \*\*, significativo a  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente.

**Tabela 3.** Coeficientes de correlação entre as variáveis: condutância estomática (*gs*), transpiração (*E*), fotossíntese (*A*), eficiência de carboxilação (*EiC*), eficiência no uso da água (*EUA*), eficiência fotoquímica máxima do PSII ao meio-dia (*Fv/Fm*), eficiência fotoquímica efetiva do PSII ( $\Phi$ PSII), excesso de energia no PSII (*EXC*), fotoinibição (*Fot*), potencial hídrico da folha ao meio-dia ( $\Psi_w$ ) e teor relativo de água (*TRA*) nos diferentes tratamentos hídricos: Controle (*C*), estresse hídrico (*E*) e reidratação (*R*).

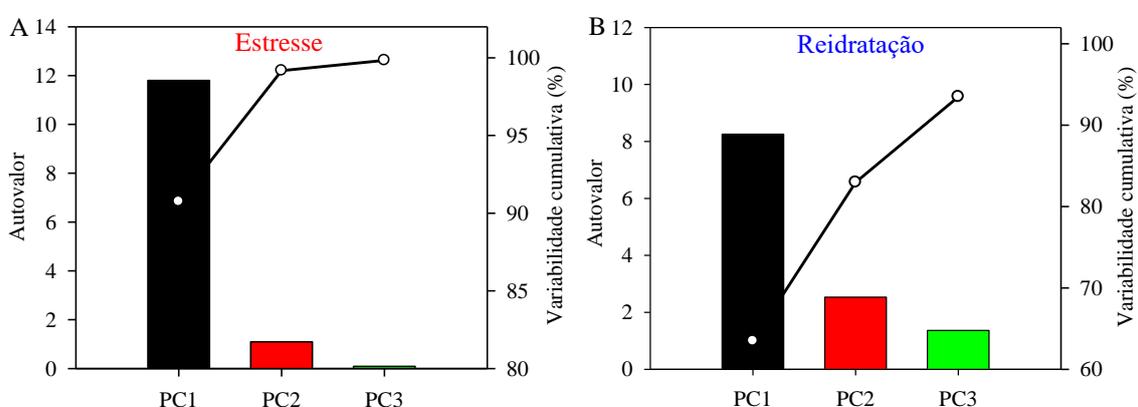
Trat	Var	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>EiC</i>	<i>EUA</i>	<i>Fv/Fm</i>	$\Phi$ PSII	<i>EXC</i>	<i>Fot</i>	$\Psi_w$	<i>TRA</i>
<b>C</b>	<i>gs</i>	0,77**	0,31*	-0,31*	0,60*	0,50**	0,17	0,10	-0,52*	0,27	0,49**
	<i>E</i>		0,59**	-0,01	-0,67	0,23	0,11	0,01	-0,25	0,18	0,26
	<i>A</i>			0,64**	0,15	-0,05	0,22	-0,25	-0,00	-0,26	0,05
	<i>EiC</i>				0,52*	-0,34*	0,22	-0,41*	0,30	-0,46**	-0,21
	<i>EUA</i>					-0,33*	0,04	-0,22	-0,29	-0,47**	-0,28
	<i>Fv/Fm</i>						0,23	0,32*	-0,96**	0,36*	0,49*
	$\Phi$ PSII							-0,84**	-0,21	-0,21	0,19
	<i>EXC</i>								-0,33*	0,40**	0,08
	<i>Fot</i>									-0,34*	-0,49**
	$\Psi_w$										0,18
<b>E</b>	<i>gs</i>	0,29	0,42	0,31	0,76**	0,46*	0,41	-0,39	-0,43*	0,59**	0,57**
	<i>E</i>		0,91**	0,72**	0,17	0,43*	0,36	-0,34	-0,44*	0,45*	0,33
	<i>A</i>			0,75**	0,48*	0,39	0,35	-0,34	-0,38	0,42	0,38
	<i>EiC</i>				0,31	0,24	0,30	-0,31	-0,19	0,49*	0,46*
	<i>EUA</i>					0,33	0,29	-0,28	-0,31	0,34	0,39
	<i>Fv/Fm</i>						0,69**	-0,55**	-0,89**	0,45*	0,55**
	$\Phi$ PSII							-0,98**	-0,63**	0,38	0,34
	<i>EXC</i>								0,50*	-0,34	-0,30
	<i>Fot</i>									-0,41	-0,36
	$\Psi_w$										0,69**
<b>R</b>	<i>gs</i>	0,69**	0,57**	0,39	-0,02	-0,00	0,30	-0,36	0,04	0,07	0,57**
	<i>E</i>		0,54*	0,18	-0,33	-0,06	0,15	-0,22	0,11	0,36	0,35
	<i>A</i>			0,80**	0,60**	0,34	0,51*	-0,48*	-0,38	0,41	0,17
	<i>EiC</i>				0,73**	0,45*	0,68*	-0,64**	-0,51*	0,25	0,03
	<i>EUA</i>					0,50*	0,43*	-0,31	-0,59**	0,15	-0,15
	<i>Fv/Fm</i>						0,63**	-0,36	-0,96**	0,50*	-0,06
	$\Phi$ PSII							-0,94**	-0,57*	0,10	0,10
	<i>EXC</i>								0,30	0,06	-0,15
	<i>Fot</i>									-0,49*	0,07
	$\Psi_w$										0,12

Trat.: Tratamentos hídricos; Var.: variáveis; ns: não significativo; \*, \*\* significativo a  $p < 0,05$  e  $0,01$ , respectivamente.

### 3.4 Análise de componentes principais

Foram extraídos três componentes principais (PC1-3) e, em conjunto, essas dimensões explicaram mais de 99 e 92% da variabilidade total sob estresse hídrico e reidratação, respectivamente (Figura 6). As dimensões dos dados foram, portanto, reduzidas de doze para três para o processamento de dados.

**Figura 6.** Variância explicada por cada fator do componente principal, durante o estresse hídrico (A) e a reidratação (B). PC1-PC3: do primeiro ao terceiro componente principal.

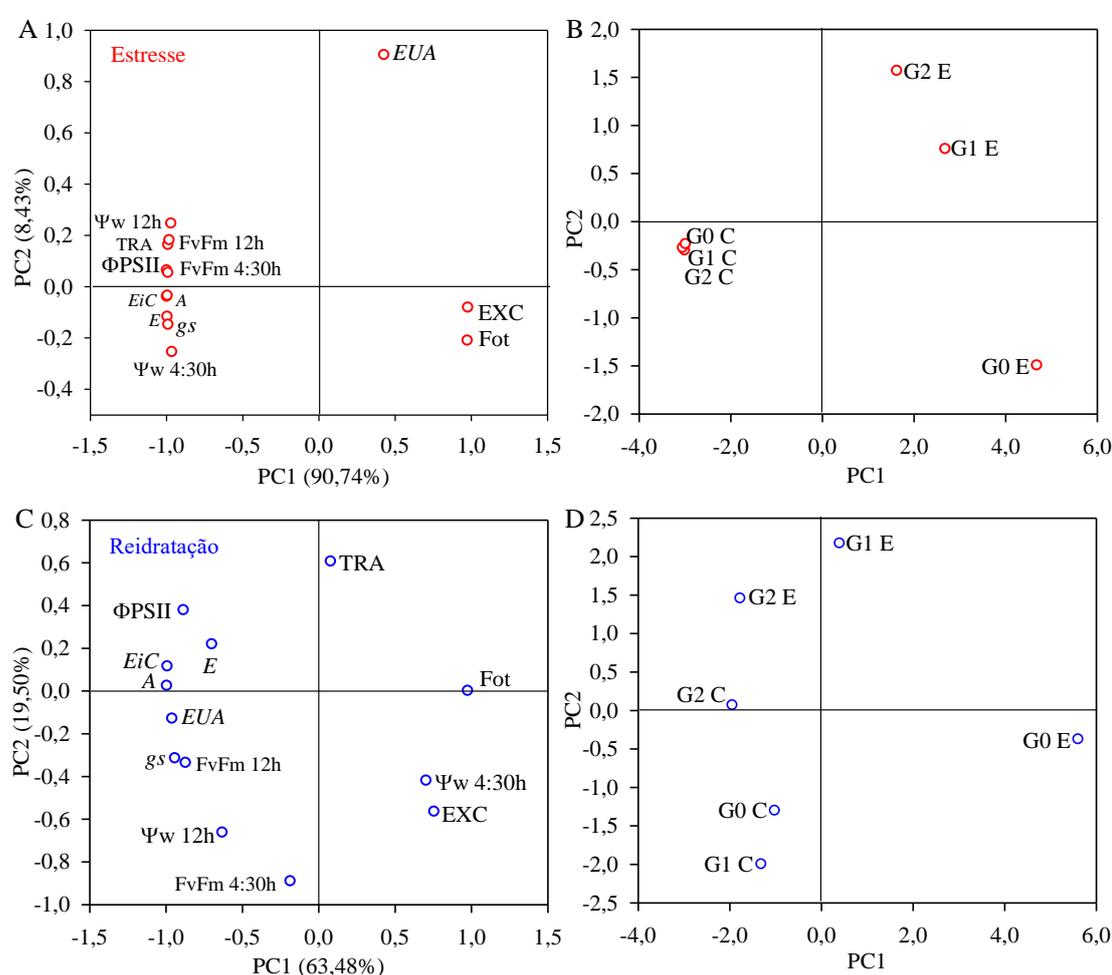


Sob estresse hídrico, o PC1 estava associado positivamente ao EXC, Fot, e *EUA*, e negativamente ao  $\Psi_w$  4:30h,  $\Psi_w$  12h, TRA,  $\Phi$ PSII, Fv/Fm 4:30h, Fv/Fm 12h, *gs*, *E*, *A* e *EiC*; enquanto o PC2 estava associado positivamente a *EUA*,  $\Psi_w$  12h, TRA,  $\Phi$ PSII, Fv/Fm 4:30h, Fv/Fm 12h, e negativamente a *EiC*, *gs*, *E*, *A*,  $\Psi_w$  4:30h e Fot (Figura 7A). Esses resultados indicam que as plantas estressadas sem aplicação de GB estavam relacionadas ao EXC e Fotoinibição, e as com uma e duas aplicações de GB estavam média e fortemente relacionadas, respectivamente, a *EUA* (Figura 7B). De outra maneira, as plantas controle sem e com GB se agruparam e estavam relacionadas a todo o conjunto de variáveis, exceto *EUA*, EXC e Fot.

Na reidratação, o PC1 estava positivamente associado ao  $\Psi_w$  4:30, EXC, Fot e TRA, e negativamente ao Fv/Fm 4:30h,  $\Psi_w$  12, Fv/Fm 12h, *gs*, *EUA*, *E*, *A*, *EiC* e  $\Phi$ PSII; enquanto O PC2 estava associado positivamente a *E*, *A*, *EiC*,  $\Phi$ PSII, TRA e Fot, e negativamente a *EUA*, *gs*, Fv/Fm 12h,  $\Psi_w$  12h, Fv/Fm 4:30h,  $\Psi_w$  4:30 e EXC (Figura 7C). Esses resultados indicam que as plantas reidratadas sem aplicação de GB estavam relacionadas com a Fot. Enquanto, as

plantas com uma e duas aplicações de GB estavam relacionadas ao TRA e  $\Phi$ PSII, respectivamente (Figura 7D).

**Figura 7.** Análise de componentes principais (PCA) das respostas fisiológicas em cana-de-açúcar com aplicação foliar de glicina betaína. PC1 e PC2 representam a projeção das variáveis e a distribuição dos tratamentos durante o estresse hídrico (A, B) e a reidratação (C, D). PC1-PC2: o primeiro e segundo componente principal. Parâmetros de fluorescência da clorofila (Fv/Fm,  $\Phi$ PSII, EXC, Fotoinibição), de trocas gasosas ( $g_s$ ,  $E$ ,  $A$ ,  $EiC$ ,  $EUA$ ) e de relações hídricas ( $\Psi_w$ , TRA).



C: controle; E: estresse; G0: sem GB; G1: com uma aplicação de GB; G2: com duas aplicações de GB.

#### 4 DISCUSSÃO

A aplicação foliar de GB em plantas cultivadas tem auxiliado na melhoria ao déficit hídrico em diferentes culturas (MA et al., 2007; IQBAL et al., 2008; ANJUM et al., 2011; GUPTA; THIND, 2015). Isso, possivelmente, ocorre porque a GB pode penetrar rapidamente

através da superfície foliar e ser transportada para outros órgãos da planta, contribuindo para a melhoria na tolerância ao estresse (ANJUM et al., 2011; OSMAN, 2015). Isto condiz com os resultados encontrados em trigo, em que as plantas transgênicas acumuladoras de GB melhoraram as trocas gasosas quando submetidas a déficit hídrico, possivelmente pela capacidade de translocação da GB (WANG et al., 2010). Portanto, nossos resultados indicam que a GB aplicada na folha melhorou as trocas gasosas, especialmente a fotossíntese, da cana-de-açúcar durante o estresse hídrico. Resultados semelhantes foram encontrados em milho (ANJUM et al., 2011) e arroz (CHA-UM et al., 2013), em que a GB exógena melhorou as trocas gasosas das plantas estressadas em relação às sem GB. A eficiência na manutenção da fotossíntese por GB exógena pode ser refletida sobre a produção de fotoassimilados nas plantas estressadas, servindo como matéria-prima para manter o crescimento das plantas sob condições limitantes de água (ANJUM et al., 2012; OSMAN, 2015).

Em plantas sob déficit hídrico e tratadas com GB, menores reduções da  $g_s$ ,  $E$  e  $A$  têm sido relacionadas ao auxílio da GB (ANJUM et al., 2011). Em nosso estudo, no sexto dia de estresse e na reidratação,  $g_s$  e  $E$  não tiveram o mesmo comportamento que a fotossíntese. Por sua vez, a  $A$  foi menor nas plantas sem GB no quarto e no sexto dia de estresse, além de não se recuperar completamente após quatro dias de reidratação. Esses resultados diferem dos observados em plantas sob déficit hídrico, em que a manutenção da  $g_s$  é comumente relacionada com a  $A$  (MEDEIROS et al., 2013; GUAN et al., 2015). Possivelmente, esses resultados se devem às condições climáticas do sexto dia de estresse em que houve aumento da umidade do ar e redução da radiação, e/ou ao efeito proporcionado pela GB sobre a fotossíntese (MA et al., 2007), como encontrado em milho (ANJUM et al., 2011) e trigo (GUPTA; THIND, 2015). A manutenção da  $A$  em plantas estressadas de milho dependeu, além da  $g_s$ , da integridade das estruturas dos cloroplastos auxiliada pela GB (ANJUM et al., 2011), sugerindo que a limitação da  $A$  se deve também a fatores não estomáticos, como a degradação da Rubisco (MA et al., 2007; KOYRO et al., 2013). Contudo, a degradação da Rubisco pode ter sido minimizada pela aplicação de GB, já que apenas as plantas com GB se recuperaram após a reidratação. De fato, a  $A$  das plantas com GB reduziu menos que das sem GB com a severidade do déficit hídrico, e isso pode ser resultado de menores danos na atividade da Rubisco, a qual pode ser alterada pela intensidade do déficit hídrico (TRUJILLO et al., 2013).

A  $EiC$  e a  $EUA$  são frequentemente relatadas como indicadores de tolerância ao déficit hídrico (JANGPROMMA et al., 2012; CANAVAR et al., 2014). Contudo, não existem relatos do papel da GB sobre esses parâmetros em cana-de-açúcar. Mas, é conhecido que a

manutenção da *EiC*, e o aumento da *EUA* em plantas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico são indicativos de tolerância (MACHADO et al., 2009). O déficit hídrico aumentou a *EUA* em plantas estressadas de girassol (CANAVAR et al., 2014) e cana-de-açúcar (JANGPROMMA et al., 2012) mais tolerantes à seca. Nesse último, a *EUA* foi mais relacionada à capacidade de recuperação. Dessa maneira, podemos sugerir em nosso trabalho, que a maior *EUA* nas plantas de cana-de-açúcar com GB sob estresse hídrico, ajudou na recuperação da *A*, como indicada pela correlação entre *EUA* e *A* na reidratação. A *EUA* também foi correlacionada com a *A* em plantas de trigo sob déficit de água, e aplicada GB (GUPTA; THIND, 2015).

Em nosso estudo, a GB também auxiliou na turgescência das plantas estressadas, como observado pelo maior  $\Psi_w$  ao meio dia e baixa redução do TRA. A manutenção da turgescência celular devido a aplicação de GB também foi observada em milho (ZHANG et al., 2014) e arroz (FAROOQ et al., 2008). A manutenção da turgescência das células pela GB ajuda a manter outros mecanismos fisiológicos, reduzindo os efeitos do estresse e melhorando a capacidade de recuperação (MA et al., 2006; ZHANG et al., 2014). Essas condições são confirmadas pelo  $\Psi_w$  e TRA que tiveram importantes correlações quando as plantas estavam sob estresse. Por exemplo, ambos se correlacionaram com *g<sub>s</sub>* e *EUA*, os quais estão diretamente relacionados ao estado de água das células (WANG et al., 2010; CANAVAR et al., 2014). Dessa maneira, sugerimos que essa melhor conservação de água nos tecidos contribuiu para que as plantas de cana-de-açúcar com GB tivessem menor prejuízo na capacidade fotossintética e melhor recuperação após a reidratação.

A GB proporciona osmoproteção às plantas através da diminuição do potencial osmótico que ajuda a manter a absorção adequada de água e o aumento da pressão de turgescência celular, protegendo as células da desidratação durante o déficit hídrico (ASHARAF; FOLAAD, 2007; ANJUM et al. 2011; ZHANG et al., 2014). Além disso, a GB também auxilia indiretamente na retenção de água nos tecidos das plantas, através da prevenção da saída de íons  $K^+$  induzida pelo estresse (MA et al., 2007), e pela atuação antioxidante promovendo o aumento de atividades enzimáticas (WANG et al., 2010). Acredita-se, que esses mecanismos indiretos da GB exógena ajudaram a manter a integridade do PSII de plantas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico, semelhante ao que ocorreu em plantas de trigo (MA et al., 2006) e milho (ANJUM et al., 2012).

Em nosso estudo, observamos que as plantas de cana-de-açúcar em que não se aplicou GB sofreram maiores danos no aparato fotossintético com o déficit de água. Esses danos foram observados pelas reduções de *F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>* ao meio-dia e  $\Phi_{PSII}$ , que inclusive este último não se recuperou após o estresse. A redução da eficiência efetiva do PSII é relatada como uma

resposta sensível à seca (SILVA et al., 2007; SALES et al., 2013). Por outro lado, as plantas com GB foram menos afetadas pelo estresse. Cha-Um et al. (2013) também observaram que Fv/Fm e  $\Phi$ PSII foram pouco afetados em plantas de arroz sob estresse hídrico, pré-tratadas com GB. De maneira semelhante, Ma et al. (2006) encontraram menor redução de Fv/Fm em plantas de trigo tratadas com GB sob déficit hídrico, além de recuperarem após o estresse. Em nosso trabalho, como  $\Phi$ PSII foi completamente restaurado nas plantas com GB após a reidratação, podemos sugerir que os danos causados pelo estresse hídrico ao PSII nessas plantas, foram reversíveis.

A diminuição de Fv/Fm leva ao aumento acentuado da fotoinibição (LI et al., 2014), como ocorreu nas plantas de cana-de-açúcar sem GB e submetidas ao déficit hídrico, no presente estudo. Além disso, essas plantas não recuperaram após a reidratação, ao contrário do que ocorreu com as que tiveram uma ou duas aplicações de GB. A aplicação de GB aliviou os danos causados pelo calor em tomate, aumentando a reorganização da proteína D1 e diminuindo a fotoinibição no PSII (LI et al., 2014). De maneira semelhante, a GB foi capaz de diminuir a suscetibilidade do PSII à fotoinibição causada pelo estresse hídrico em folhas de trigo (MA et al. (2006), o que parece ter ocorrido também em nosso estudo, nas plantas de cana-de-açúcar com GB.

A fotoinibição é determinada pelo excesso de energia luminosa no PSII, que não foi utilizada nem dissipada (KATO et al., 2003). De fato, observamos correlação entre esses dois parâmetros, indicando danos de fotoinibição causados pelo EXC nas plantas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico. Essa relação foi comprovada na análise de componentes principais, que indicou a contribuição de Fot e EXC no agrupamento das plantas sem GB sob déficit hídrico. Além disso, na reidratação também observamos que essas plantas permaneceram agrupadas, provavelmente indicando que não se recuperaram do EXC e da fotoinibição. Por outro lado, as plantas em que foram feitas uma ou duas aplicações de GB, além de terem menor EXC e fotoinibição em detrimento do estresse, conseguiram se recuperar após a reidratação. Em cana-de-açúcar, a diminuição da fotoinibição está relacionada aos mecanismos de manutenção de Fv/Fm e  $\Phi$ PSII, e redução do EXC (SALES et al., 2013; ENDRES et al., 2016). Sales et al. (2013) relataram que a proteção do PSII de cana-de-açúcar sob estresse hídrico está associada a um eficiente mecanismo de dissipação de calor, intermediado pela atividade de enzimas antioxidantes. Em nosso estudo, isso pode ter ocorrido pela ação da GB atuando indiretamente na proteção antioxidativa, como relatado em plantas de trigo (WANG et al., 2010) e milho (ANJUM et al., 2012; 2016). Isso fez com que as plantas que tiveram a aplicação de GB tivessem maior  $\Phi$ PSII, e menor EXC e Fot. No

entanto, não existem relatos até então sobre esses mecanismos em cana-de-açúcar com aplicação de GB, e submetida à condição de déficit hídrico.

## 5 CONCLUSÕES

A aplicação foliar de glicina betaína tem efeitos benéficos sobre as trocas gasosas, a maquinaria fotossintética do PSII e o *status* hídrico em plantas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico. A GB, independente de uma ou duas aplicações, minimiza os efeitos do estresse com a melhoria na manutenção da condutância estomática, transpiração, fotossíntese, Fv/Fm,  $\Phi$ PSII e potencial hídrico da folha. Além disso, diminui os danos causados ao PSII, com menor excesso de energia e fotoinibição. Esses mecanismos melhorados pela GB contribuem para a recuperação das plantas de cana-de-açúcar após a reidratação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJUM, S. A.; TANVEER, M.; ASHRAF, U.; HUSSAIN, S.; SHAHZAD, B.; KHAN, I.; WANG, L. Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 17, p. 17132-17141, 2016.

ANJUM, S.A.; FAROOQ, M.; WANG, L.C.; XUE, L.L.; WANG, S.G.; WANG, L.; ZHANG, S.; CHEN, M. Gas exchange and chlorophyll synthesis of maize cultivars are enhanced by exogenously-applied glycinebetaine under drought conditions. **Plant, Soil and Environment**, v. 57, p. 326-331, 2011.

ANJUM, S.A.; SALEEM, M. F.; WANG, L.; BILAL, M. F.; SAEED, A. Protective role of glycinebetaine in maize against drought-induced lipid peroxidation by enhancing capacity of antioxidative system. **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 4, p. 576-583, 2012.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.

BAKER N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 89-113, 2008.

BARBOSA, A. M.; GUIDORIZI, K. A.; CATUCHI, T. A.; MARQUES, T. A.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, G. M. Biomass and bioenergy partitioning of sugarcane plants under water deficit. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 1-8, 2015.

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field, **Oecologia**, v. 102, p. 425-432, 1995.

CANAVAR, O.; GÖTZ, K.; ELLMER, F.; CHMIELEWSKI, F.; KAYNAK, M. A. Determination of the relationship between water use efficiency, carbon isotope discrimination and proline in sunflower genotypes under drought stress. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 2, p. 232-242, 2014.

CHA-UM, S.; SAMPHUMPHUANG, T.; KIRDMANEE, C. Glycinebetaine alleviates water deficit stress in indica rice using proline accumulation, photosynthetic efficiencies, growth performances and yield attributes. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, p. 213-218, 2013.

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

DAWOOD, M. G. Influence of osmoregulators on plant tolerance to water stress. **Scientia Agriculturae**, v. 13, p. 42-58, 2016.

DODD, I.; CRITCHLEY, C.; WOODALL, G.; STEWART, G. Photoinhibition in differently coloured juvenile leaves of *Syzygium* species. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 1437-1445, 1998.

ENDRES, L.; OLIVEIRA, N. G.; FERREIRA, V. M.; SILVA, J. V.; BARBOSA, G. V. S.; MAIA JUNIOR, S. O. Morphological and physiological response of sugarcane under abiotic stress to neonicotinoid insecticides. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 28, p. 347-355, 2016.

FAROOQ M.; BASRA S.M.A.; WAHID A.; CHEEMA Z.A.; CHEEMA M.A.; KHALIQ A. Physiological role of exogenously applied glycinebetaine to improve drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, p. 325-333, 2008.

GUAN, X. K.; SONG, L.; WANG, T. C.; TURNER, N. C.; LI, F. M. Effect of Drought on the Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence and Yield of Six Different-Era Spring Wheat Cultivars. **Journal of agronomy and crop science**, v. 201, n. 4, p. 253-266, 2015.

GUO, Y. Y.; YU, H. Y.; KONG, D. S.; YAN, F.; ZHANG, Y. J. Effects of drought stress on growth and chlorophyll fluorescence of *Lycium ruthenicum* Murr. Seedlings, **Photosynthetica**, v. 54, n. 4, p. 524-531, 2016.

GUPTA, N.; THIND, S. K. Improving photosynthetic performance of bread wheat under field drought stress by foliar applied glycine betaine. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 17, p. 75-86, 2015.

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-BAMBERA, N.G.; LAKSHMANANB, P.; PARKC, S. Sugarcane for water-limited environments: Theoretical assessment of suitable traits. **Field Crops Research**, v. 134, p. 95-104, 2012.

IQBAL N.; ASHRAF M.; ASHRAF, M.Y. Glycinebetaine, an osmolyte of interest to improve water stress tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.): water relations and yield. **South African Journal of Botany**, v. 74, p. 274-281, 2008.

JANGPROMMA, N.; THAMMASIRIRAK, S.; JAISIL, P.; SONGSRI, P. Effects of drought and recovery from drought stress on above ground and root growth, and water use efficiency in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 8, p. 1298-1304, 2012.

KATO, M. C.; HIKOSAKA, K.; HIROTSU, N.; MAKINO, A.; HIROSE, T. The excess light energy that is neither utilized in photosynthesis nor dissipated by photoprotective mechanisms determines the rate of photoinactivation in photosystem II. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, p. 318-325, 2003.

KOYRO, H.; HUSSAINA, T.; HUCHZERMEYERC, B.; KHANA, M. A. Photosynthetic and growth responses of a perennial halophytic grass *Panicum turgidum* to increasing NaCl concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, v. 91, p. 22-29, 2013.

LI, M.; LI, Z.; LI, S.; GUO, S.; MENG, O.; LI, G.; YANG, X. Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis reduces heat-enhanced photoinhibition by enhancing antioxidative defense and alleviating lipid peroxidation in tomato. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, p. 42-51, 2014.

MA, Q. Q.; WANG, W.; LI, Y. H.; LI, D. Q.; ZOU, Q. Allevation of photoinhibition in drought-stressed wheat (*Triticum aestivum*) by foliar-applied glycinebetaine. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 165-175, 2006.

MA, X. L.; WANG, Y. J.; XIE, S. L.; WANG, C.; WANG, W. Glycinebetaine application ameliorates negative effects of drought stress in tobacco. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, p. 472-479, 2007.

MACHADO, R. S.; RIBEIRO, R. V.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, D. F. S. P.; MACHADO, E. C.; LANDELL, M. G. A. Respostas biométricas e fisiológicas ao déficit hídrico em cana-de- açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1575-1582, 2009.

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

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

OSMAN, H. S. Enhancing antioxidant–yield relationship of pea plant under drought at different growth stages by exogenously applied glycine betaine and proline. **Annals of Agricultural Science**, v. 60, n. 2, p. 389-402, 2015.

SALES, C. R. G.; RIBEIRO, R. V.; SILVEIRA, J. A. G.; MACHADO, E. C.; MARTINS, M. O.; LAGÔA, A. M. M. A. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 326-336, 2013.

SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: *Ecophysiology of Photosynthesis*. Edited by Schulze, E.D. and Caldwell M.M. pp. 49-70. **Springer**, 1994.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 193-201, 2007.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SHARMA, V.; SILVA, J. A. G.; CAPUTO, M. M.; DAMAJ, M. B.; GUIMARÃES, E. R.; FERRO, M. I. T. Use of physiological parameters in screening drought tolerance in sugarcane genotypes. **Sugar Tech**, v. 13, p. 191-197, 2011.

TRUJILLO, I.; RIVAS, M.; CASTRILLO, M. Leaf recovery responses during rehydration after water deficit in two bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Journal of Plant Interactions**, v. 8, n. 4, p. 360-369, 2013.

VAN DILLEWIJN, C. Botany of sugarcane. **Chronica Botanica**, Waltham, 1952.

VITTI, G. C.; LUZ, P. H. C.; ALTRAN, W.S. Nutrição e adubação. In: SANTOS F, BOREM, A. (eds) **Cana-de-açúcar: do plantio à colheita**. UFV, Viçosa, 2013.

WANG, G. P.; ZHANG, X. Y.; LI, F.; LUO, Y.; WANG, W. Overaccumulation of glycine betaine enhances tolerance to drought and heat stress in wheat leaves in the protection of photosynthesis. **Photosynthetica**, v. 48, n. 1, p. 117-126, 2010.

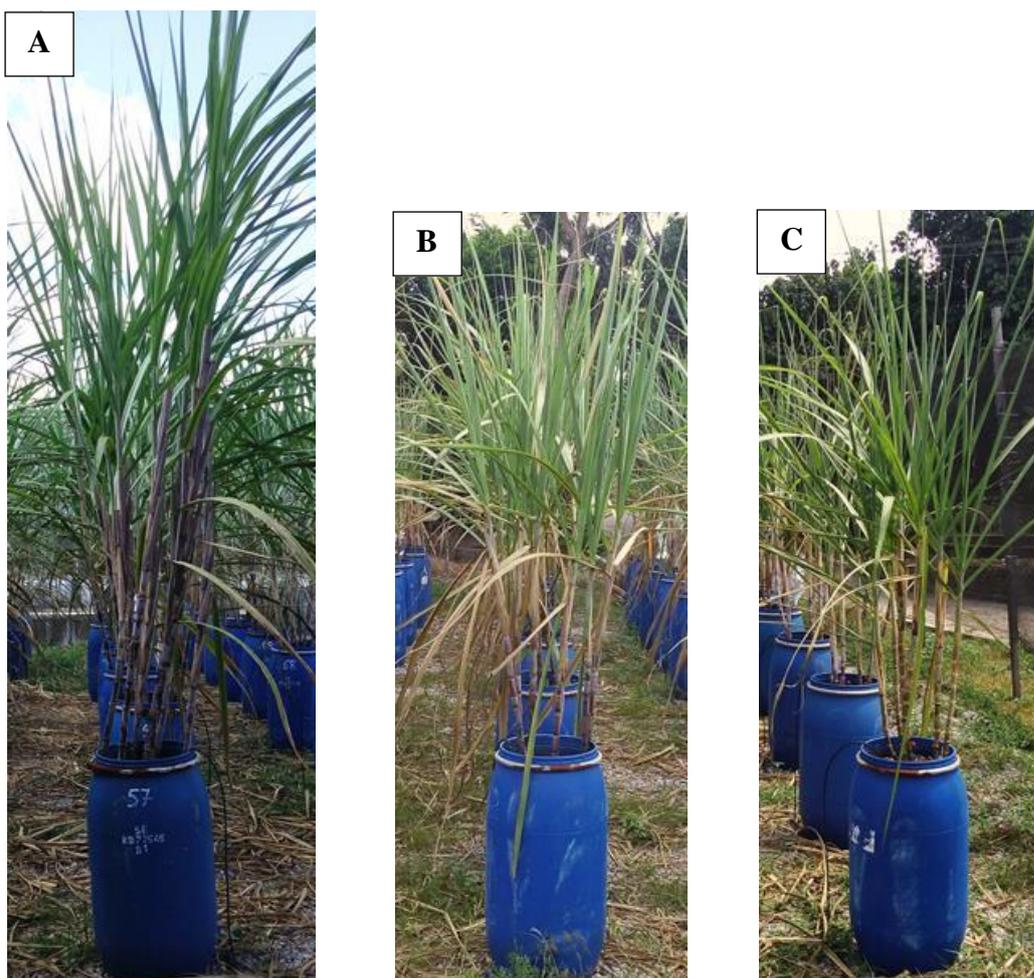
ZHANG, L. X.; LAI, J. H.; LIANG, Z. S.; ASHRAF, M. Interactive effects of sudden and gradual drought stress and foliar-applied glycinebetaine on growth, water relations, osmolyte accumulation and antioxidant defence system in two maize cultivars differing in drought tolerance. **Journal Agronomy Crop Science**, v. 200, p. 425-433, 2014.

ZHANG, C.; ZHAN, D. X.; LUO, H. H.; ZHANG, Y. L.; ZHANG, W. F. Photorespiration and photoinhibition in the bracts of cotton under water stress. **Photosynthetica**, v. 54, n. 1, p. 12-18, 2016.

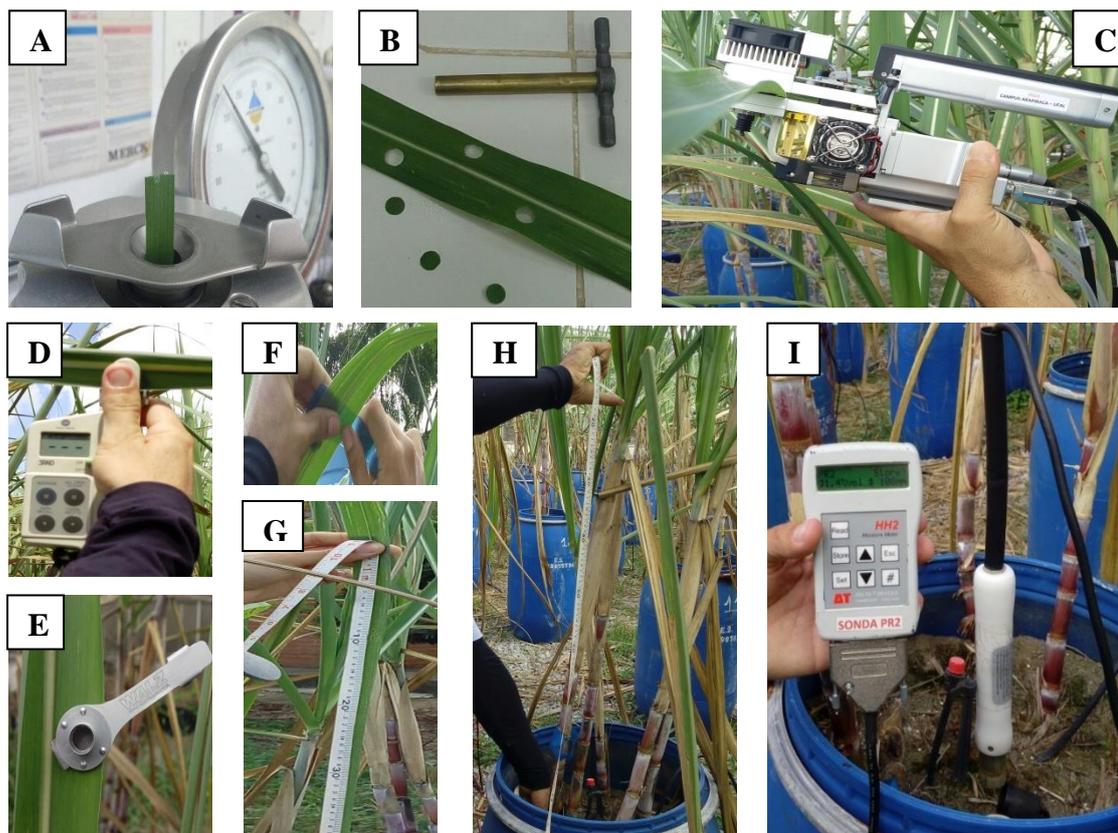
ZIVCAK, M.; BRESTIC, M.; BALATOVA, Z.; DREVENAKOVA, P.; OLISOVSKA, K.; KALAJI, H. M.; YANG, X.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photosynthetic electron transport and specific photoprotective responses in wheat leaves under drought stress. **Photosynth Research**, v. 117, p. 529-546, 2013.

**APÊNDICES**

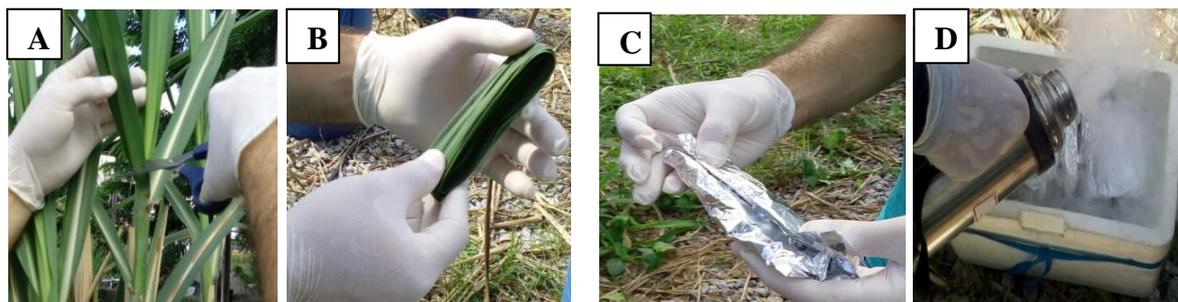
**APÊNDICE 1.** Vista parcial da cana-planta aos 120 dias após o plantio, com detalhe à esquerda de quebra-vento instalado, Rio Largo-AL, 2014.



**APÊNDICE 2.** Caracterização das plantas de cana-de-açúcar aos 90 dias após a implantação dos tratamentos hídricos no experimento I: controle (A), estresse hídrico moderado (B) e estresse hídrico severo (C), Rio Largo-AL, 2015.



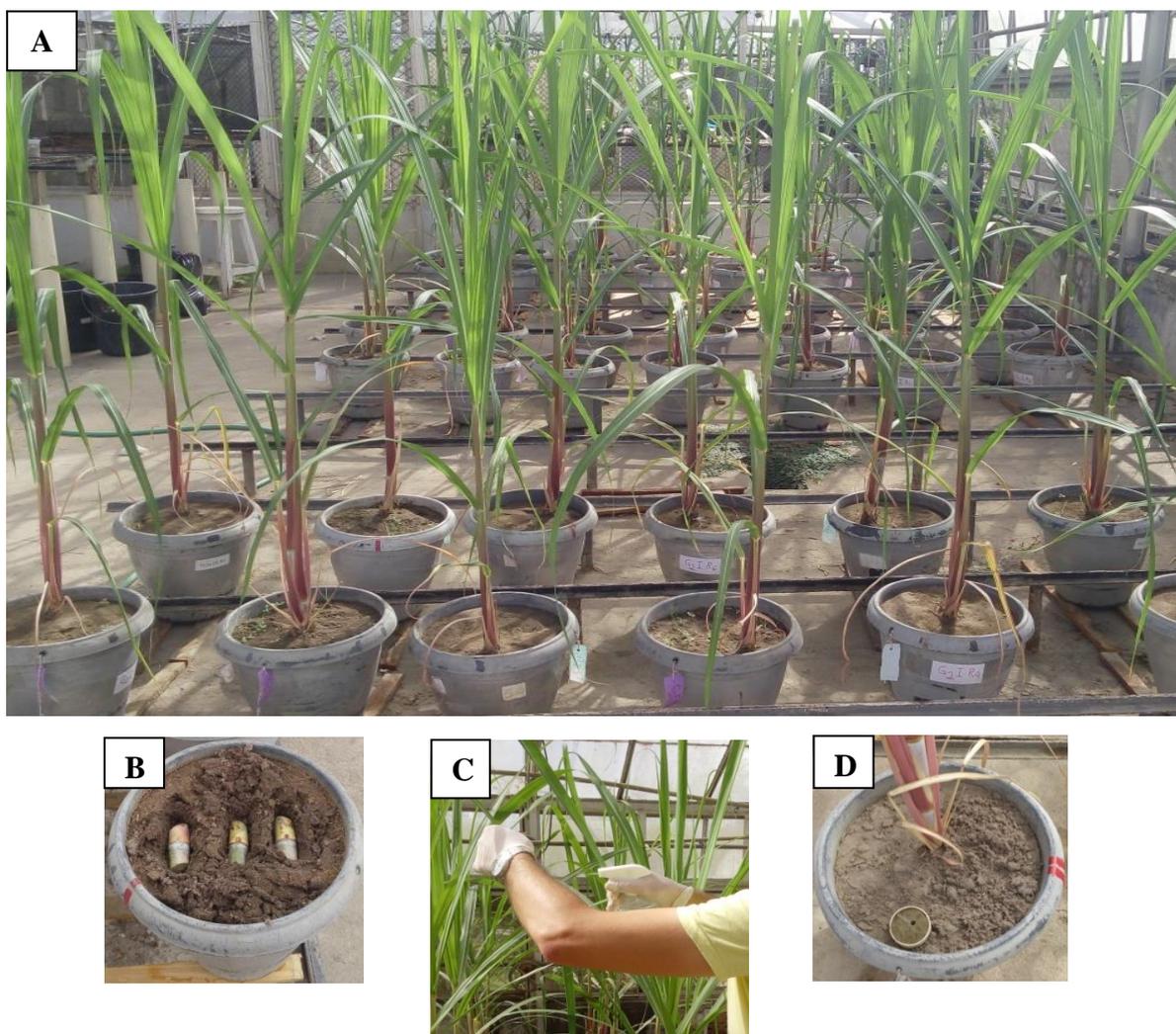
**APÊNDICE 3.** Avaliação do potencial hídrico da folha, com detalhe da exudação de água na extremidade do corte (A); extração de discos foliares para obtenção do teor relativo de água (B), mensuração das trocas gasosas com o analisador de gas por infravermelho – IRGA, com detalhe da folha inserida na câmara (C), avaliação do índice relativo de clorofila com o clorofilômetro SPAD-502 (D), clipe foliar específico, para relaxamento do PSII e posterior medida da eficiência fotoquímica (E), medidas da largura e comprimento da folha+3 (F e G), medida da altura da planta (H) e leitura da umidade do solo com a sonda PR2 - Delta T Devices (I), Rio Largo-AL, 2015.



**APÊNDICE 4.** Extração da folha+1 para as análises bioquímicas: corte da folha (A), seleção da parte mediana (B), posterior embalagem em papel alumínio (C) e acondicionamento em caixa térmica com nitrogênio líquido (D), Rio Largo-AL, 2015.



**APÊNDICE 5.** Vista parcial do experimento II com as plantas de cana-de-açúcar aos 90 dias após o plantio (A) e detalhe da câmara 2030-B acoplada na folha para avaliação da curva de luz (B), Rio Largo-AL, 2016.



**APÊNDICE 6.** Vista parcial do experimento III com as plantas de cana-de-açúcar aos 65 dias após o plantio (A), plantio dos rebolos por vaso (B), aplicação foliar de glicina betaína (C) e vaso caracterizando o déficit hídrico (D), Rio Largo-AL, 2017.