

EDUARDO DE ALMEIDA SOARES

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E METABÓLICA EM FOLHAS DE  
CULTIVARES DE CANA DE AÇÚCAR CONTRASTANTES PARA  
TOLERÂNCIA À SECA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

EDUARDO DE ALMEIDA SOARES

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E METABÓLICA EM FOLHAS DE  
CULTIVARES DE CANA DE AÇÚCAR CONTRASTANTES PARA  
TOLERÂNCIA À SECA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de novembro de 2012.

---

PhD. Thomas Christopher Rhys Williams

---

Prof. Adriano Nunes Nesi

---

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro  
(Orientador)

A Deus e à minha família,

*Dedico*

À minha mãe Maria e ao meu  
irmão Renato,

*Ofereço*

## AGRADECIMENTOS

À Deus e minha família, mãe Maria, irmão Renato, à cunhada Bruna, aos tios e tias, aos primos, em particular ao Rômulo (Tico) que comigo conviveu em Viçosa. E à minha nova família, Maria do Céu, Miguel e Emanuel, pela grandiosa força concedida ao longo de mais esta jornada.

Ao orientador professor Marcelo Ehlers Loureiro, por toda oportunidade e confiança concedidas.

Aos membros da banca, Thomas Rhys e Adriano Nunse Nesi pela orientação, disponibilidade, comprometimento, valiosas considerações e confiança em mim depositada.

Aos demais professores do programa pela disponibilidade de equipamentos e auxílio direto ou indireto para o desenvolvimento desta pesquisa. E aos funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, pelo constante auxílio, disponibilidade e atenção.

Ao núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol) por toda colaboração com o espaço físico e equipamentos.

À equipe do projeto, em especial ao Camilo, pela infinita ajuda, companheirismo e amizade.

A amiga Rosilene, por toda cumplicidade, ensinamentos e incentivo.

Aos demais amigos da graduação, do laboratório, da república Toca-gado, do alojamento e a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte do meu caminho em Viçosa e que estarão sempre nas lembranças felizes que daqui levarei.

À Carolina, namorada dedicada, por toda paciência, carinho e amor.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, e à Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal pela oportunidade oferecida.

## **BIOGRAFIA**

**EDUARDO DE ALMEIDA SOARES**, filho de José Cláudio Soares e Maria de Almeida Soares, nasceu em Aimorés-MG, no dia 06 de maio de 1985. Concluiu seu ensino médio em dezembro de 2002, na Escola de Ensino Médio União de Professores, em Vitória-ES. Em 2005 deu início aos estudos no curso de Bioquímica, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa-MG, onde se graduou em julho de 2009. Ingressou, em março de 2010, no curso de Pós-Graduação, mestrado em Fisiologia Vegetal, na UFV, obtendo o título de Magister Scientiae em Fisiologia Vegetal em 14 de novembro de 2012.

# ÍNCIDE

<b>RESUMO</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
3.1. CONDIÇÕES DE CULTIVO E APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	6
3.2. VARIÁVEIS ANALISADAS.....	7
3.2.1. <i>Teor relativo de água (TRA)</i> .....	7
3.2.2. <i>Trocas gasosas e Fluorescência da Clorofila a</i> .....	7
3.2.3. <i>Ácido Abscísico (ABA)</i> .....	8
3.2.4. <i>Composição isotópica de carbono</i> .....	9
3.2.5. <i>Pigmentos</i> .....	9
3.2.6. <i>Aldeído Malônico (MDA)</i> .....	9
3.2.7. <i>Extravasamento de eletrólitos</i> .....	10
3.2.8. <i>Açúcares (Glicose, Frutose e Sacarose) e Malato</i> .....	10
3.2.9. <i>Amido</i> .....	10
3.2.10. <i>Proteínas solúveis totais e Aminoácidos livres</i> .....	11
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	11
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>12</b>
4.1. TEOR RELATIVO DE ÁGUA (TRA).....	12
4.2. EXTRAVASAMENTO DE ELETRÓLITOS E ALDEÍDO MALÔNICO (MDA).....	12
4.3. TROCAS GASOSAS E COMPOSIÇÃO ISOTÓPICA DE CARBONO.....	13
4.4. FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A.....	15
4.5. CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS.....	18
4.6. METABÓLITOS.....	19
4.7. ÁCIDO ABCSÍCIO (ABA).....	21
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
5.1. CULTIVAR TOLERANTE APRESENTA RETARDAMENTO DA DESIDRATAÇÃO FOLIAR COM REDUÇÃO DA CONDUTÂNCIA ESTOMÁTICA E MAIOR EFICIÊNCIA DO USO DA ÁGUA.....	22
5.2. ESTRESSE HÍDRICO PROMOVE UMA INIBIÇÃO BIOQUÍMICA DA FOTOSÍNTESE.....	22
5.3. VARIEDADES APRESENTAM EFEITOS CONTRASTANTES DO ESTRESSE HÍDRICO NA FASE FOTOQUÍMICA DA FOTOSÍNTESE E NO DANO OXIDATIVO.....	23
5.4. MAIOR TOLERÂNCIA À SECA É ASSOCIADA A MAIORES NÍVEIS DE ABA NA FOLHA SOB ESTRESSE HÍDRICO SEVERO.....	24
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>25</b>

<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>26</b>
--	-----------

## RESUMO

SOARES, Eduardo de Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2012. **Caracterização Fisiológica e Metabólica de folhas de cultivares de Cana de açúcar contrastantes para tolerância à seca.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro.

O estresse hídrico é um dos estresses de maior importância na produtividade das plantas. Objetivando fornecer evidências de possíveis mecanismos de tolerância à seca, no presente trabalho caracterizou-se a fisiologia e o metabolismo de folhas de plantas de cana de açúcar, de cultivares contrastantes para a tolerância à seca. Para tal, plantas das cultivares RB867515 e RB855536, com características de tolerância e sensibilidade, respectivamente, foram crescidas em vasos de 30L até aproximadamente 50 cm de altura, quando foram submetidas aos potenciais hídricos de 0 MPa (controle), -0,5 MPa (défice moderado) e -1 MPa (défice severo). A cultivar tolerante apresentou retardamento da desidratação foliar com redução da condutância estomática e maior eficiência do uso da água sob estresse hídrico severo, momento no qual observou-se uma inibição bioquímica da fotossíntese semelhante entre genótipos, como pode ser deduzido do aumento da razão  $C_i/C_a$  e  $A/C_i$ . O menor dano oxidativo no cultivar tolerante pode ser inferido pela presença de menor extravasamento de eletrólitos, mas o teor de MDA foi semelhante entre as duas cultivares nos dois níveis de estresse. Os dados de fluorescência da clorofila *a* permitem sugerir que a cultivar tolerante pode apresentar mais fotodanos na presença de estresse hídrico, visto que esta possui maior redução do rendimento quântico máximo potencial do FSII ( $F_v/F_m$ ), maior elevação na fluorescência mínima em folhas adaptadas ao escuro ( $F_o$ ), e menor coeficiente de extinção não fotoquímico ( $q_N$ ). O fato de não haver diferenças no rendimento quântico da conversão fotoquímica da energia no fotossistema II ( $\Phi_{II}$ ) indica que o genótipo tolerante compensou o menor  $\Phi_{NPQ}$  (rendimento quântico de dissipação de energia regulada) com um maior  $\Phi_{NO}$  (rendimento quântico de perda de energia não regulada do FSII). O maior  $\Phi_{NO}$  pode ser um mecanismo que contribui para a tolerância à seca, visto que pode ajudar a reduzir a formação de clorofilas e a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Alterações no metabolismo sugerem um papel da osmorregulação no mecanismo de tolerância à seca, visto que a variedade tolerante apresentou maiores níveis de malato e aminoácidos livres sob estresse moderado e maiores níveis de glicose, frutose, malato e aminoácidos sob estresse severo. Foi possível observar um aumento em cerca de 10X nos níveis de ABA foliar em ambos os genótipos sob estresse moderado, mas sob estresse hídrico severo, estes altos níveis são mantidos somente no genótipo tolerante. Os resultados permitiram observar que a maior

tolerância à seca observada a campo para a variedade RB 867515 também pode ser observada em pequenos vasos, onde a taxa de imposição do déficit hídrico é muito mais rápida do que em condições naturais. Entre os fenótipos de tolerância, concluímos que a composição isotópica seria o método de seleção mais apropriado para selecionar progênies portadoras de tolerância à seca.

## ABSTRACT

SOARES, Eduardo de Almeida, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, november de 2012. **Physiological and Metabolic Characteristics in leaves of Sugarcane cultivars contrasting for drought tolerance.** Advisor: Marcelo Ehlers Loureiro.

Water deficit is the more preeminent stress that reduce crop productivity. Aiming to identify drought tolerance mechanisms in sugarcane, we have characterized the physiological and metabolic responses in greenhouse of two varieties with contrasting tolerance to water deficit under field conditions: RB867515 tolerant and RB855536, drought sensible. Plants were growth in pots of 30L until plants reached 50 cm in height, when they were submitted to water stress by irrigation suspension until leaf water potential reached -0,5 MPa (moderate water deficit) and -1 MPa (severe water deficit). The tolerant cultivar showed a dehydration postponement in parallel to decreased stomata conductance and higher instantaneous water use efficiency under severe water stress, treatment that also result in a biochemical inhibition of photosynthesis, as deduced from the decrease in  $C_i/C_a$  and  $A/C_i$  ratios. Lower oxidative damage was observed in RB867515 due to smaller electrolyte leakage, although no differences for lipid peroxidation was observed between genotypes. Chlorophyll *a* fluorescence data allow us to detect a small photodamage exclusively in the tolerant genotype, since the higher  $F_v/F_m$ ,  $F_o$  and  $q_N$  values measured. This damage could be relate to the rapid water stress applied (five days for severe water stress), which could not be observed under natural conditions, where the dehydration rate is slower under water shortage. The absence of differences in  $\Phi_{II}$  between the genotypes under drought could be explained by the fact that the RB867515 variety compensate the lower  $\Phi_{NPQ}$  with a higher  $\Phi_{NO}$ . The higher  $\Phi_{NO}$  could be a mechanism that contributes to drought tolerance in sugarcane, since that this increase could be linked with a reduction in triplet chlorophyll and free radicals. Contrasting changes in metabolism suggest an important role of osmoregulation for drought tolerance in sugarcane, since tolerant variety has higher levels of malate and free aminoacids under moderate stress, and higher levels of glucose, fructose, malate and free aminoacids under severe drought stress. Moderate water stress produce an average increase of ten times in leaf ABA for both genotypes, however this high level of ABA was observed only for RB867515 leaves under severe water stress, and could be a mechanism to explain the dehydration postponement, smaller stomata conductance and lower electrolyte leakage. The results allow us to conclude that the water deficit tolerance of RB867515 could be observed under different water shortage regimes, and that isotopic composition will be the more practical and

accurate phenotypic evaluation for selection of drought tolerance traits in progenies that use this cultivar as a parent, fact a quite usual in sugarcane in Brazil, since this cultivar is the more cultivated variety in this country.

## 1. INTRODUÇÃO

A cana de açúcar é pertencente à família *Poaceae* e ao gênero *Saccharum*, que abrange várias espécies. Entretanto as canas atualmente cultivadas, na sua maioria, são híbridas, perenes e próprias para cultivo em climas tropicais e subtropicais (Bidóia, 2009). Nestes híbridos procura-se aliar a rusticidade e resistência aos estresses bióticos e abióticos às boas qualidades de riqueza em açúcar (Aguirre Junior, 1936).

Seu país de origem não é conhecido, porém os pesquisadores apontam a Ásia como seu centro de origem (Roach e Daniels, 1987). Sua introdução no continente americano ocorreu em 1493, na segunda viagem de Cristóvão Colombo, o qual levou colmos de cana da ilha de Madeira para a região onde atualmente é a República Dominicana. Porém seu cultivo ficou esquecido na história até que em 1509, no início da colonização espanhola, foi lembrado em São Domingos (Stevenson, 1965). Este movimento colonizador a levou, em 1520, para o México e daí para toda a América (Cairo, 1924).

O início de seu cultivo no Brasil data-se do ano de 1502 (Corrêa, 1926) provindo de mudas originárias da Ilha de Madeira (Calmon, 1935). Porém o cultivo comercial teve início apenas em 1532, na Capitania de São Vicente, São Paulo, onde a indústria açucareira teve grande sucesso (De Carli, 1936).

Até o final do século XIX, as variedades de cana de açúcar mundialmente cultivadas eram clones de *Saccharum officinarum*, a cana nobre, muito rica em açúcar. No início do século XX surgiram as “pragas” da lavoura canavieira, e em razão da alta suscetibilidade das canas até então cultivadas, tiveram início no mundo os primeiros programas de melhoramento genético de cana de açúcar.

Em 1894 o melhoramento da cana de açúcar chegou ao Brasil, no estado de São Paulo por iniciativa do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) (Landell e Alvarez, 1993). No entanto, o grande avanço no melhoramento genético ocorreu com a descoberta da fertilidade sexual, quando os melhoristas iniciaram programas de hibridação interespecífica entre *S. officinarum* e a espécie selvagem, *S. spontaneum*, caracterizada pelo elevado vigor vegetativo e resistência aos estresses bióticos e abióticos (Hogarth, 1987).

Os principais fatores que determinam o sucesso da cultura canavieira no Brasil e sua exploração econômica são a temperatura e a precipitação pluvial nele existentes (Bacchi e Souza, 1980).

Em condições de estresse hídrico a cana pode sofrer ajustes metabólicos e perder a sensibilidade aos seus limites térmicos, afetando assim sua maturação e produtividade (Fagliata, 1966), sendo considerado ideal, um balanço hídrico de armazenamento de 125 mm de água no solo (Thorntwaite e Mather, 1955).

Durante o período de déficit hídrico, ocorre senescência de folhas acompanhada pela morte das raízes superficiais e das raízes mais jovens e tenras que se desidratam, ocorrendo perda do turgor nas células e ressecamento dos tecidos mais novos (Vasconcelos, 2004). Fato que pode ocasionar diminuição da produtividade ou a morte da planta, dada a irreversibilidade das alterações estruturais nas raízes em resposta à seca e a necessidade de formação de novas raízes laterais após reidratação (Stasovski, 1993).

Um dos principais mecanismos fisiológicos utilizados para evitar a seca é o fechamento estomático, limitando assim a transpiração (Lisson et. al., 2005). Mecanismo este, que pode variar consideravelmente entre os genótipos de cana de açúcar (Inman-Bamber e Smith, 2005). Sendo assim, é de grande importância o estudo do mecanismo de controle estomático das cultivares de cana de açúcar, para avaliação de tolerância em função da disponibilidade hídrica.

Outros mecanismos fisiológicos, adicionais ao fechamento estomático, vêm sendo atribuídos a tolerância à seca em cana de açúcar, como é o caso da osmorregulação, na qual a planta eleva sua quantidade de solutos compatíveis. Com a osmorregulação a quantidade de água retida pela célula se eleva de forma a favorecer a continuidade de seus processos bioquímicos mesmo sob déficit hídrico (Morgan, 1984).

Com o agravamento do déficit hídrico, as reações bioquímicas da fotossíntese podem ser afetadas. Fato este que acarreta limitações de origem não estomática na assimilação de carbono, para alguns cultivares de cana de açúcar quando mantidos sob déficit hídrico severo (Cornic et al., 2002). Como resultado tem-se um excesso de poder redutor, o que potencializa o aparecimento de danos oxidativos (Tambussi et al., 2000), tornando o mecanismo antioxidativo mais um mecanismo relacionado à tolerância à seca em alguns cultivares de cana de açúcar, como foi verificado por Vilela et al. (2011).

Dada influencia do regime hídrico na produtividade da cana de açúcar, a importância econômica da mesma para o Brasil e as variações fisiológicas e metabólicas para diferentes cultivares. Este trabalho objetivou um melhor entendimento da fisiologia e do metabolismo de folhas de cana de açúcar contrastantes para tolerância à seca

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Muitas publicações têm sido feitas caracterizando a resposta das plantas a deficiência hídrica, e também várias publicações existem para quais destas respostas contribuem para a tolerância diferencial a este estresse abiótico. Seu efeito na fotossíntese tem sido um dos principais aspectos estudados. Entretanto, a grande maioria destes estudos tem sido feitos em plantas C3. Em contraste, a resposta da fotossíntese das plantas C4 ao estresse hídrico tem sido muito menos estudada (Guanoum, 2009). Embora as plantas C4 representem somente 4 % das espécies, elas contribuem em cerca de 20% da produtividade da biomassa primária global, e representam um importante grupo de alimentos consumidos pelos seres humanos e animais (milho, sorgo, milheto, cana-de-açúcar, pastagens, entre outros) (Lloyd e Farquhar, 1994; Ehleringer et al., 1991).

A rota fotossintética das plantas C4 tem sido considerada como uma resposta evolucionária a altos níveis de fotorrespiração resultantes de várias combinações de estresses ambientais incluindo baixo nível de CO<sub>2</sub> atmosférico, alta temperatura, deficiência hídrica e/ou salinidade (Ehleringer et al., 1991; Tipple e Pagani, 2007).

A resposta a seca varia muito entre os subtipos de plantas C4, ou entre diferentes espécies do mesmo grupo. Por exemplo, várias plantas do subtipo NAD-ME possuem maior eficiência do uso da água (WUE) do que plantas NADP-ME (cana, milho e sorgo) (Ghannoum et al., 2002). Desta forma, a cana pertencente ao grupo NADP-ME, se enquadra em um dos grupos mais sensíveis a seca dentro das plantas C4.

Uma visão mais detalhada da literatura sobre os efeitos da seca nas plantas C4 mostra que a concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*) diminui somente nas fases iniciais do estresse hídrico, como descrito para o milho (Becker e Fock, 1986; Lal e Edwards, 1996; Leakey et al., 2004), sorgo (Williams et al., 2001), cana (Du et al., 1996), e amaranto (Lal e Edwards, 1996). Durante estágios posteriores da seca, quando há maior desidratação foliar, tem sido descrito em todas estas espécies citadas que *C<sub>i</sub>* aumenta, enquanto a assimilação líquida de carbono continua seu declínio, indicando que nesta fase existe uma limitação bioquímica da fotossíntese (Becker e Fock, 1986; Du et al., 1996; Kalapos et al., 1996; Lal e Edwards, 1996). Em contraste, várias plantas C4 não apresentam mudanças em *C<sub>i</sub>* sob estresse hídrico (Saliendra et al., 1996, Ripley et al., 2007), ou mesmo até aumento tem sido detectado (Kalapos et al., 1996; Lal and Edwards, 1996).

O efeito negativo da seca na fase bioquímica da fotossíntese também tem sido sustentado com os dados mostrando o aumento do vazamento de CO<sub>2</sub> das células da

bainha em plantas C4 sob seca (Bowman et al., 1989; Saliendra et al., 1996). O mecanismo de concentração de CO<sub>2</sub> em plantas C4 tem um custo energético equivalente a 2 ATPs, consumidos na reação de síntese do fosfoenolpiruvato (PEP) (Hatch, 1987). Como resultado, qualquer CO<sub>2</sub> que escapa das células da bainha significa uma redução da eficiência energética da fotossíntese C4.

Outros fatores não estomáticos também podem ter papel na maior sensibilidade da fase bioquímica da fotossíntese das plantas C4. Alguns estudos mostram que a assimilação e absorção do nitrato (Becker e Fock, 1986; Foyer et al., 1998) pode estar associado a diminuições no teor de proteínas e clorofila observados para a cana-de-açúcar (Du et al., 1996) e outras espécies de plantas C4 (Foyer et al., 1998; Marques da Silva e Arrabaça, 2004; Carmo-Silva et al., 2007). Esta diminuição no teor de clorofilas e proteínas sob estresse hídrico pode ser provocada por uma degradação de proteínas generalizada, resultante de um aumento na senescência e na concentração de aminoácidos livres (Becker e Fock, 1986).

Adicionalmente, a seca tem sido proposta como redutora da síntese de ATP (Weiner et al., 1988; Ghannoum, 2009; Lawlorand Tezara, 2009), o que pode tornar as plantas C4 relativamente mais vulneráveis, considerando que elas gastam 2 ATPs a mais por cada CO<sub>2</sub> fixado, comparado com as plantas C3 (Taiz e Ziegler, 2008).

A seca pode ainda, reduzir a condutância ao CO<sub>2</sub> nas células da bainha vascular ou do mesófilo, afetando, além da atividade da Rubisco, a regeneração da ribulose 1,5-difosfato (RuBP) (Krieg e Hutmacher, 1986; von Caemmerer, 2000). Dois trabalhos feitos com cana-de-açúcar têm mostrado que o aumento de CO<sub>2</sub> pode aumentar a fotossíntese da cana e melhorar a sua tolerância a seca (Vu et al, 2006; Souza et al, 2008).

Alterações nas concentrações de carboidratos podem refletir diferenças genotípicas na regulação e na aclimatação do metabolismo de carbono em resposta ao déficit hídrico (Lawlor e Cornic, 2002). À medida que a fotossíntese decresce sob condições de seca, independentemente da natureza dessa redução, a intensidade de irradiância interceptada pode exceder largamente àquela necessária para saturar a fotossíntese. Considerando-se que a limitação da assimilação do CO<sub>2</sub> precede a inativação das reações de transferência de elétrons nos cloroplastos, um excesso de poder redutor é normalmente gerado nas plantas sob déficit hídrico. Parte desse excesso pode ser usada para reduzir o oxigênio molecular, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), potencialmente capazes de resultar em danos fotoinibitórios e fotooxidativos (Zao et al., 2006).

A intensidade do estresse oxidativo em uma célula é determinada pela abundância de EROs, principalmente nas formas de superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil. Portanto, o equilíbrio entre as enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), entre outras, é crucial para regulação dos níveis de EROs nas células. Nos mecanismos enzimáticos de destoxificação de EROs, a SOD atua como a primeira linha de defesa contra EROs, transformando o superóxido em peróxido de hidrogênio. Este peróxido de hidrogênio produzido pode ser convertido em água e oxigênio pela CAT (catalase) ou, somente em água, pela ação do ascorbato peroxidase. O ascorbato pode reduzir radical livre de oxigênio com ou sem a catálise da APX e pode indiretamente regenerar antioxidantes ligados à membrana como o  $\alpha$ - tocoferol (Noctor e Foyer, 1998).

O desequilíbrio entre EROs e a atividade das enzimas antioxidantes pode gerar, portanto, um excesso de radicais livres que pode causar peroxidação de lipídeos, desnaturação de proteínas e mutação do DNA, entre outros efeitos. Além disso, a peroxidação de lipídeos de membrana pode resultar na perda de compartimentalização celular e aumento do extravasamento de eletrólitos (Noctor e Foyer, 1998).

A quantidade de informação existente sobre os mecanismos de tolerância à seca em plantas C3 é largamente superior àquela encontrado para plantas C4, apesar de as plantas C4 contribuírem em cerca de 20% da produtividade da biomassa primária global, e representarem um importante grupo de alimentos consumidos pelos seres humanos e animais como no caso da cana de açúcar (Lloyd e Farquhar, 1994; Ehleringer et al., 1991). Faz-se necessário maior investimento no estudo destes mecanismos de tolerância à seca para plantas C4, como forma de predição dos impactos das alterações climáticas sobre a produtividade das plantas cultivadas e dos ecossistemas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Condições de cultivo e aplicação dos tratamentos

Colmos de uma cultivar com características de tolerância à seca RB867515 (desenvolvida pela UFV e com certificado 0271 concedido em 16 de abril de 2001) e outra com características de sensibilidade RB855536 (desenvolvida pela UFSCar e com certificado 0096 concedido em 16 de abril de 1999) foram plantados em vasos de 30L contendo 28kg de solo e esterco bovino curtido, na proporção de 2:1.

Todo o experimento foi conduzido em casa de vegetação sem controle de temperatura ou umidade, cujas variações foram semelhantes às obtidas em campo.

A irrigação foi mantida durante todo o período de crescimento até a obtenção de plantas com aproximadamente 50 cm de altura, momento no qual ocorreu a imposição dos tratamentos de déficit hídrico, ou não (grupo controle irrigado), sendo mantidas 3 unidades das mesmas por vaso.

Os tratamentos consistiram na imposição do déficit hídrico severo e intermediário, por suspensão da irrigação de todos os indivíduos, salvo grupo controle (irrigado) das duas cultivares.

A umidade relativa do solo foi monitorada com a utilização de eletrodo de umidade (EC-5 Soil Moisture Sensor) até obtenção de aproximadamente 20% de umidade para as unidades experimentais de déficit intermediário e de cerca de 14% para as unidades de déficit severo, de acordo com testes preliminares.

Após obtenção destas umidades de solo correspondentes aos tratamentos de déficit hídrico, foi acompanhado o potencial hídrico foliar, em folhas +3 pelo sistema Kuyper (terceira folha a partir do ápice caulinar com a barbel visível), com a utilização de uma bomba de pressão tipo Scholander, na antemã ( $\Psi_{am}$ ) (4:30h – 5:30h) (Da Matta et al., 2003), momento no qual o potencial hídrico foliar reflete o potencial hídrico do solo.

Este acompanhamento foi realizado até a obtenção de potenciais de -0,5 e -1,0 MPa, sendo considerados intermediário e severo, respectivamente para essas cultivares. Momento no qual os dados e as amostras foram coletados.

As amostras foliares foram coletadas no intervalo entre 11:30 e 12:30h em envelopes de alumínio devidamente identificados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente foram transferidas para ultra-refrigeradores onde permaneceram a -80°C até o momento das análises.

### 3.2. Variáveis analisadas

#### 3.2.1. Teor relativo de água (TRA)

O teor relativo de água (TRA) foi calculado com base no Peso fresco (Pf), Peso túrgido (Pt) e Peso seco (Ps) aplicados na fórmula  $TRA = (Pf - Ps) / (Pt - Ps) * 100$  (Silva et al., 2007).

Para as medidas foram coletados 4 discos foliares da folha +1 e imediatamente pesados, sendo este o peso fresco, seguido de imersão em água deionizada em ambiente protegido da luz por 12h à aproximadamente 24°C, retirada do excesso de água com papel absorvente e nova pesagem, sendo este o peso túrgido. Por fim os discos foliares foram completamente secos em estufa de circulação forçada por 48h a 80°C, resfriados a temperatura ambiente e novamente pesados, sendo este o peso seco.

#### 3.2.2. Trocas gasosas e Fluorescência da Clorofila *a*

As variáveis taxa de assimilação fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs), taxa de transpiração (E) e a razão entre concentração interna e externa de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>) foram determinadas por um analisador de gás por infravermelho (IRGA; modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre 11:00 e 13:00 h., em casa de vegetação, utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante (1000 μmol fótons m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>), concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> (C<sub>a</sub>) (~ 390 μmol mol<sup>-1</sup>), temperatura (26 - 29 °C) e umidade (55 - 65 %) ambiente.

A fluorescência da clorofila *a* foi mensurada com a utilização de IRGA (LI-6400xt, LI-COR) na mesma área da folha em que foram realizadas as medições das trocas gasosas. Para as avaliações as folhas foram adaptadas ao escuro para que os centros de reação estivessem completamente abertos (todos os aceptores primários oxidados) com perda de calor mínima. As variáveis de indução da fluorescência obtidas foram: fluorescência inicial (F<sub>0</sub>) e fluorescência máxima (F<sub>m</sub>). A partir desses valores foi obtido o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII),  $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$  (Genty *et al.*, 1989). As variáveis da fase lenta de indução da fluorescência foram obtidas seqüencialmente com a aplicação de uma iluminação actínica e um pulso de luz actínica saturante para a determinação das variáveis: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F<sub>m</sub>'). A partir desses parâmetros foi possível calcular a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado,  $F_0' = F_0 / [(F_m - F_0) / F_m + (F_0 / F_m')]$  (Oxborough e Baker, 1997), para o cálculo do coeficiente de extinção fotoquímico pelo modelo *lake*, o qual fornece uma estimativa de centros de reações abertos do FSII,  $q_L = (F_m' - F) / (F_m' - F_0') \cdot (F_0' / F)$  (Kramer

*et al.*, 2004). O rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no PSII,  $\Phi_{\text{FSII}} = (F_m' - F) / F_m'$ ; e os rendimentos quântico da dissipação de energia regulada,  $\Phi_{\text{NPQ}} = (F / F_m') - (F / F_m)$  e da dissipação de energia não regulada,  $\Phi_{\text{NO}} = F / F_m$ , foram calculados de acordo com Genty *et al.* (1989) e Hendrickson *et al.* (2004). O  $Y_{\text{II}}$  foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons,  $ETR = Y_{\text{II}} \cdot PAR \cdot 0,84 \cdot 0,5$  (Bilger *et al.*, 1986), onde *PAR* é o fluxo de fótons ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) incidente sobre a folha; 0,5 o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996); e, 0,84 o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer, 1991).

### 3.2.3. Ácido Abscísico (ABA)

Para extração e purificação de Ácido Abscísico (ABA) foi utilizada metodologia proposta por Durgbanshi *et al.*, (2005), na qual foram pesados 10mg de tecido foliar seco por liofilização e pulverizados em nitrogênio líquido, seguido por homogeneização com 1mL de metanol 80% v/v e centrifugação a 5000g por 10min. a 25°C, do qual o sobrenadante foi recuperado para o processo de purificação.

O processo de purificação de ABA deu-se pela secagem do sobrenadante obtido à aproximadamente 150 $\mu\text{L}$ , para a evaporação do metanol. Seguido pela correção do volume para 500 $\mu\text{L}$  com água ultra-pura e correção do pH para 3 com a adição de ácido acético 10% v/v. Por fim realizou-se uma dupla separação de fases pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de éter dietílico para cada separação, com a recuperação da fase orgânica.

Para o processo de quantificação de ABA foi utilizado cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas (LC/MS) em aparelho UPLC QqQ 6430 (Agilent), pertencente ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da Universidade Federal de Viçosa.

O preparo das amostras teve por princípio a secagem da fase orgânica da purificação seguida de ressuspensão em 500 $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila e centrifugação por 30min. a 14000g e 24°C com a recuperação do sobrenadante.

A análise procedeu-se pela injeção (por amostrador automático para placas de 96 poços mantido refrigerado à 4°C) de 20 $\mu\text{L}$  de amostras a vazão de 200 $\mu\text{L}/\text{min.}$ , em coluna Eclipse Plus RRHD, 1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1x50 mm (Agilent) mantida a 30°C, com solventes 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (A) e 0,1% de ácido fórmico em água (B), a 0,3mL.min.<sup>-1</sup> em gradiente T/%B (0/81; 3/50; 4/10; 4.25/10; 4.5/81). cuja espectrometria teve por parâmetros 300°C e 10mL.min.<sup>-1</sup> para o gás com nebulização a 35 psi.

O monitoramento foi executado em m/z 263→153, Dwell 200, Fragmentador 75, CE 11, voltagem de aceleração 7 em modo negativo.

#### 3.2.4. Composição isotópica de carbono

As folhas coletadas foram secas em estufa de ventilação forçada à 70°C por 72h, posteriormente trituradas e encaminhadas ao Laboratório de Isótopos Estáveis (LIE) do Departamento de Solos (DPS) da Universidade Federal de Viçosa, onde a abundância natural do isótopo  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) foi determinada por combustão do material orgânico em analisador elementar conectado a um espectrômetro de massa de razão isotópica (ANCA GSL 20-20, Sercon, Crewe, UK). A razão isotópica foi expressa em partes por 1000 (‰) em relação ao padrão Pee Dee Belemnita (PDB), conforme a equação (Bernoux et al., 1998):

$$\delta^{13}\text{C} = \left( \frac{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{ amostra} - \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{ padrão}}{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{ padrão}}} \right) \times 1000$$

#### 3.2.5. Pigmentos

A quantificação de pigmentos cloroplastídicos (clorofila *a*, *b* e carotenóides), que foi procedido conforme descrito por Wellburn (1994), no qual, dois discos foliares de 1cm de diâmetro foram imersos em 5 mL de DMSO saturado com carbonato de cálcio, saturado com carbonato de cálcio e mantidos em banho Maria a 65°C e no escuro por 48h, seguido por leitura de absorvâncias em espectrofotômetro a 480; 649 e 665 nm, utilizando como branco o DMSO puro.

#### 3.2.6. Aldeído Malônico (MDA)

Os teores de Aldeído Malônico (MDA) foram determinados em folhas +1, a partir da extração com ácido tricloroacético (TCA) (Hodges et al., 1999). As folhas foram pulverizadas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em TCA, seguido de centrifugação e coleta de sobrenadante, de onde foi retirada uma alíquota. Adicionou-se solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) em TCA. Um controle para cada amostra foi obtido sem a adição de TBA. As soluções foram incubadas em banho-maria (90 °C, 20 min.) e, após completa extração, as reações foram interrompidas em banho de gelo. Realizou-se a leitura da absorvância nos comprimentos de onda de 400, 532 e 600 nm. Para o cálculo da concentração de MDA, inicialmente, a diferença entre os valores de 532 e 600 nm foram descontados dos mesmo valores obtidos pela reação sem adição de TBA, como segue:

$$A = [(Abs532+TBA) - (Abs600+TBA)] - [(Abs532+TBA) - (Abs600+TBA)]$$

Posteriormente, foi descontado o interferente de leitura em 400 nm:

$$B = [(Abs400+TBA) - (Abs600+TBA)] \times 0,0571$$

A partir das estimativas de A e B, o MDA foi quantificado pela equação:

$$MDA (nmol mL^{-1}) = [A - B/157000] \times 106$$

### **3.2.7. Extravasamento de eletrólitos**

A medida de extravasamento de eletrólitos teve por objetivo avaliar a integridade e permeabilidade da membrana plasmática e foi procedida conforme Tarhanen (1999). Foram coletados 5 discos foliares de 1cm de diâmetro e imersos em 15mL de água deionizada dentro de pesa-filtros e deixados em repouso por 8h, momento no qual foi medida a condutividade inicial (CnI) com a utilização de condutivímetro portátil CD-4301 Lutron. Seguiu-se com a inserção dos pesa-filtros em estufa de aquecimento à 90°C por 2h, momento no qual foi medida a condutividade final (CnF). O calculo da permeabilidade relativa (Pr) deu-se pela seguinte fórmula:

$$Pr (\%) = CnI / (CnI + CnF) * 100$$

### **3.2.8. Açúcares (Glicose, Frutose e Sacarose) e Malato**

Para a quantificação dos teores de açúcares foi pesado 10mg de folhas (seca por liofilização), pulverizado em nitrogênio líquido, homogeneizado com 1mL de metanol seco e incubado à 70°C por 30min. sob agitação de 950rpm, seguido por centrifugação por 5min. a 24°C e 12000g, de onde foi coletado o sobrenadante.

Este sobrenadante foi utilizado para a quantificação segundo metodologia proposta por Fernie et al. (2001).

### **3.2.9. Amido**

Para a quantificação dos teores de amido, foi coletado o precipitado (após centrifugação) da quantificação dos teores de açúcares e lavado pela adição de 1mL de etanol 80% v/v, incubação por 10min. a 70°C e centrifugação por 5min. a 24°C e 12000g, processo esse repetido por 3 vezes.

Acrescentou-se ao precipitado lavado 400uL de KOH 0,2M com incubação por 1h a 90°C seguido pela neutralização com 70uL de ácido acético 1M e centrifugação por 5min. a 24°C e 12000g, com a coleta do sobrenadante. Coletados 350uL do sobrenadante, teve início a hidrólise enzimática do amido com a utilização de amiloglicosidase por 1h a 55°C.

A glicose oriunda da hidrólise enzimática do amido foi quantificada seguindo metodologia de Fernie et al. (2001).

### **3.2.10. Proteínas solúveis totais e Aminoácidos livres**

A quantificação de proteínas solúveis totais procedeu-se com a pesagem de 10mg de folhas (seca por liofilização), pulverizado em nitrogênio líquido, homogeneizado com 1mL de metanol seco e incubado à 70°C por 30min. sob agitação de 950rpm, seguido por centrifugação por 5min. a 24°C e 12000g, de onde foi coletado o sobrenadante.

No sobrenadante foi realizada quantificação de proteínas por metodologia do ácido bicinonínico com a utilização do kit BCA Protein Assay (ThermoSCIENTIFIC) conforme especificações do fabricante.

Já para os Aminoácidos livres foi utilizado, no sobrenadante, quantificação pelo método da ninidrina, no qual o sobrenadante foi adicionado ao tampão citrato/NaOH pH 5,2 com ácido ascórbico 0,2% p/v e ninidrina 1% p/v sob aquecimento à 95°C por 20 min., com leitura em espectrofotômetro de placas a 570nm.

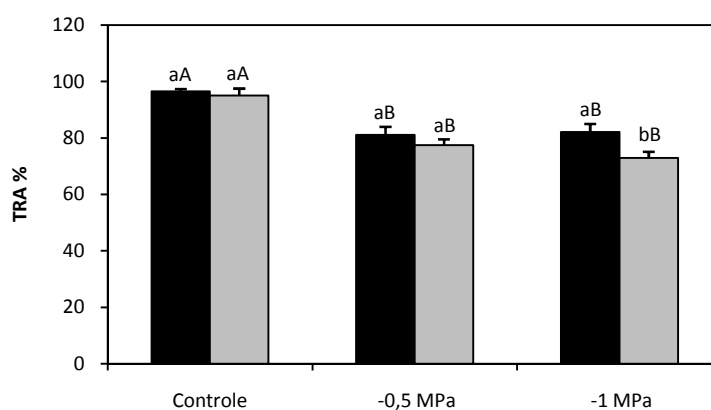
### **3.3. Análise estatística**

O experimento foi realizado em delineamento fatorial, sendo dois fatores, o primeiro as duas variedades (RB867515 e RB855536) e o segundo os três potenciais hídricos (Controle, -0,5 MPa e -1 MPa), com seis repetições. Todos os dados foram analisados pelo programa Assistat 7.6 beta, sendo submetidos à análise de variância e teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Teor relativo de água (TRA)

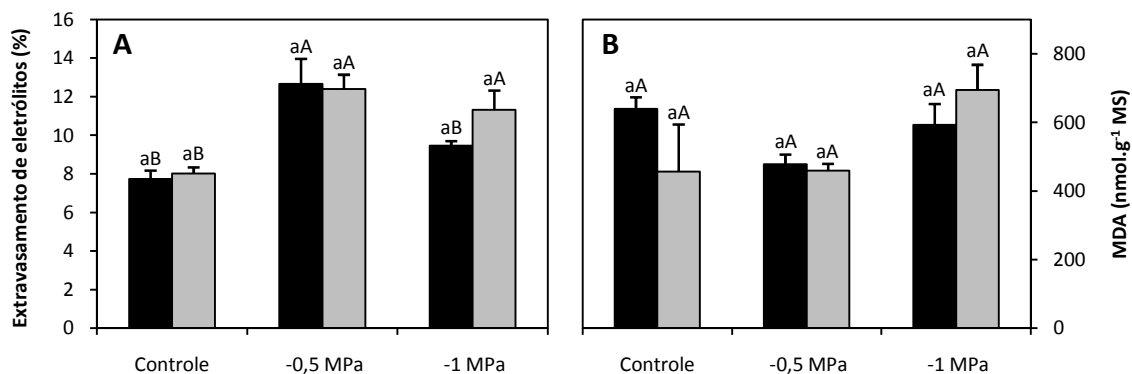
A imposição do déficit hídrico ocasionou uma redução do teor relativo de água (TRA) em ambas cultivares, não havendo diferenças significativas entre os défices intermediário (-0,5 MPa) e severo (-1 MPa), bem como entre as cultivares no grupo controle e sob déficit intermediário (Figura 1). Já sob déficit severo, a cultivar tolerante (RB867515) apresentou maior TRA em relação à cultivar sensível (RB855536), demonstrando uma maior capacidade de manutenção da quantidade de água na folha, o que fornece indícios para a existência de possíveis mecanismos de tolerância à seca.



**Figura 1.** Teor relativo de água nas folhas das cultivares RB867515 (■) e RB855536 (■) de cana de açúcar, submetidos a diferentes défices hídricos. Barras representam médias  $\pm$  EP. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas aos tratamentos.

### 4.2. Extravasamento de eletrólitos e aldeído malônico (MDA)

O extravasamento de eletrólitos utilizado para a inferência da integridade da membrana sofreu uma elevação para ambas cultivares a -0,5 MPa, fato não ocorrido a -1 MPa, potencial hídrico no qual a cultivar tolerante apresentou extravasamento estatisticamente similar ao controle e a cultivar sensível apresentou extravasamento elevado, similar a -0,5 MPa (Figura 2A). Já a concentração de aldeído malônico, utilizada para inferir dano oxidativo, não apresentou diferença estatisticamente significativa, independente do déficit aplicado e da cultivar em questão (Figura 2B).



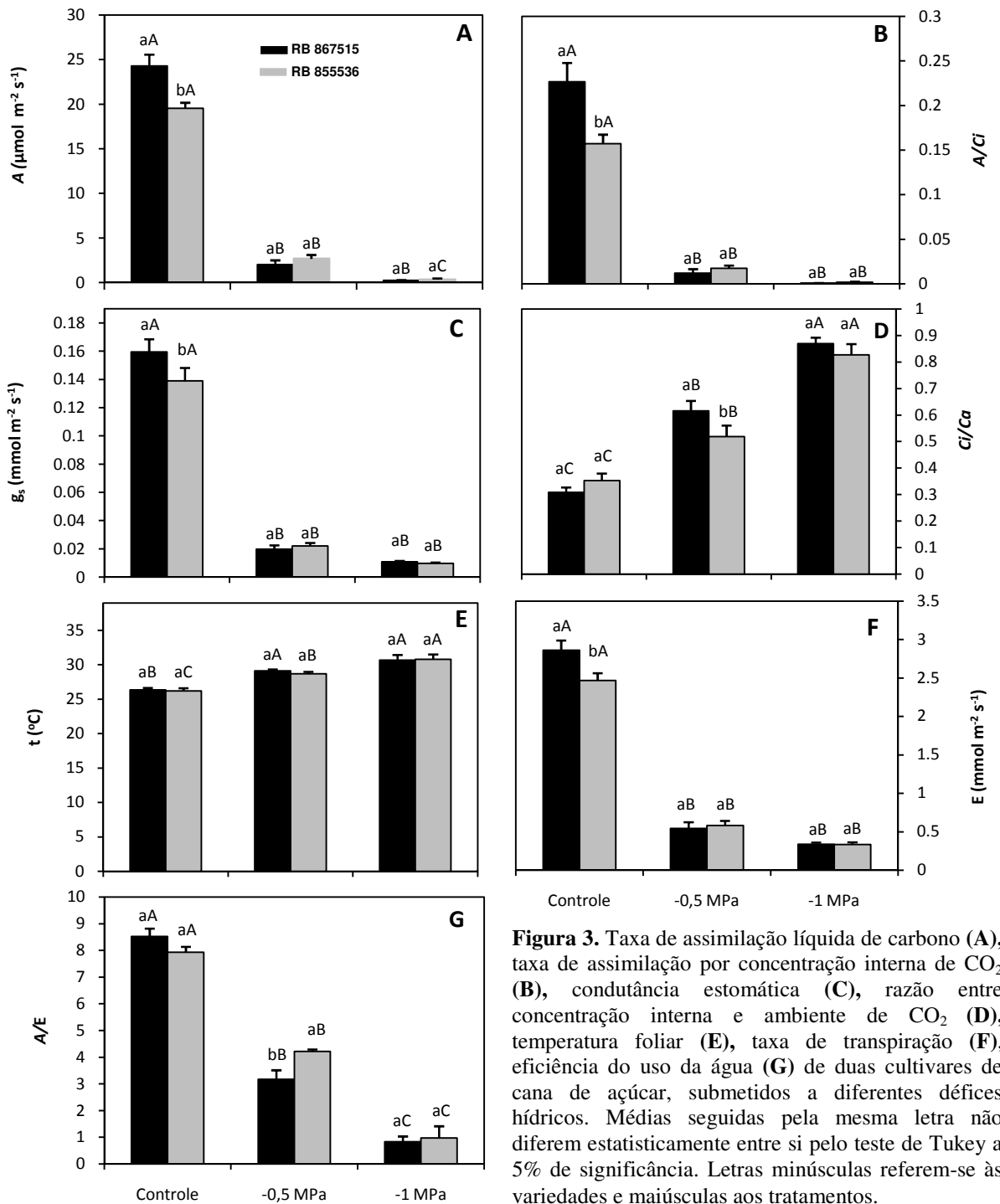
**Figura 2.** Extravasamento de eletrólitos (A) e Aldeído Malônico (B) nas folhas das cultivares RB867515 (■) e RB855536 (▒) de cana de açúcar, submetidos a diferentes défices hídricos. Barras representam médias  $\pm$  EP. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas aos tratamentos.

#### 4.3. Trocas gasosas e composição isotópica de carbono

A taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) (Figura 3A), a razão assimilação por concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $A/C_i$ ) (Figura 3B) e a condutância estomática ( $g_s$ ) (Figura 3C) apresentaram comportamento semelhante entre si, sendo maior para a cultivar tolerante de forma constitutiva (grupo controle) e sofrendo diminuição quando sob déficit hídrico, não diferindo estatisticamente para ambas cultivares e défices analisados.

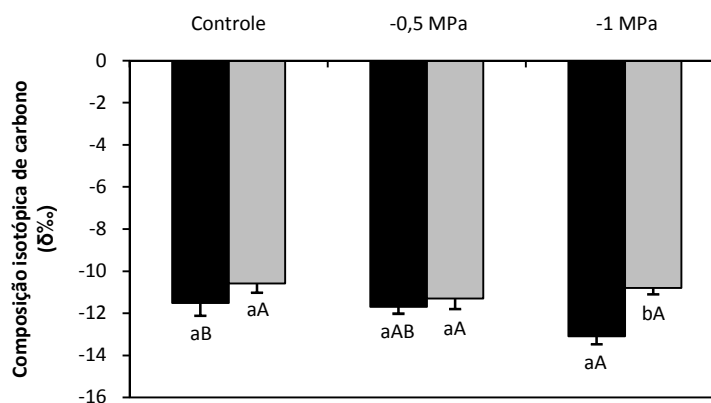
Já a razão entre concentração interna e externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) (Figura 3D) e a temperatura foliar (Figura 3E) sofreram elevação progressiva para ambas cultivares no decorrer da imposição dos défices, não diferindo estatisticamente entre si quando sob déficit severo.

A taxa de transpiração ( $E$ ) apresentou-se maior para a cultivar tolerante quando na ausência de déficit, sofrendo diminuição quando sob déficit e não diferindo estatisticamente entre moderado e severo, bem como não diferindo entre as cultivares para cada déficit observado (Figura 3F). A eficiência do uso da água ( $A/E$ ) sofreu diminuição progressiva com a imposição do déficit hídrico para ambas cultivares, sendo menor para a cultivar tolerante sob déficit moderado (Figura 3G).



**Figura 3.** Taxa de assimilação líquida de carbono (A), taxa de assimilação por concentração interna de  $\text{CO}_2$  (B), condutância estomática (C), razão entre concentração interna e ambiente de  $\text{CO}_2$  (D), temperatura foliar (E), taxa de transpiração (F), eficiência do uso da água (G) de duas cultivares de cana de açúcar, submetidos a diferentes défices hídricos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas aos tratamentos.

Houve uma redução drástica da condutância estomática sob potencial hídrico moderado de forma semelhante entre as cultivares. O aumento da desidratação celular posteriormente, não resultou em alterações na condutância estomática.



**Figura 4.** Composição isotópica de carbono em folhas das cultivares RB867515 (■) e RB855536 (■) de cana de açúcar, submetidos a diferentes défices hídricos. Barras representam médias  $\pm$  EP. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas aos tratamentos.

Entretanto, para o percentual de composição isotópica de carbono, ocorreu diminuição significativa apenas para a cultivar tolerante sob estresse severo (Figura 4), indicando que, de forma integrada temporalmente, o estômatos da variedade tolerante estavam mais fechados.

#### 4.4. Fluorescência da Clorofila *a*

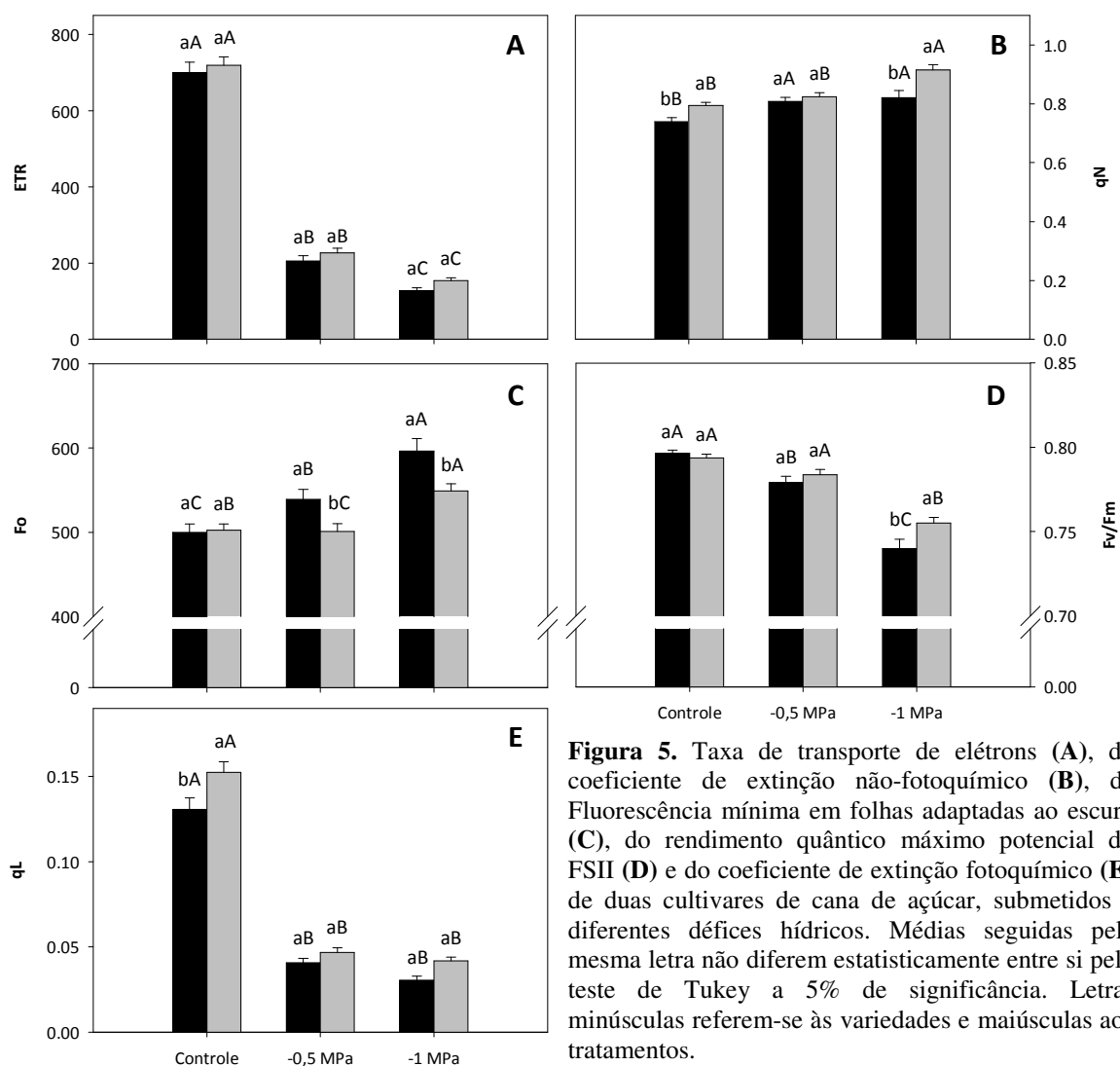
A taxa de transporte de elétrons (ETR) apresentou redução progressiva de acordo com a imposição do déficit hídrico, não apresentando diferença estatística entre as cultivares tolerante e sensível para todos tratamentos (Figura 5A).

A fluorescência mínima em folhas adaptadas ao escuro ( $F_o$ ) encontrada no grupo controle não diferiu para as cultivares analisadas, elevando-se para a cultivar sensível apenas sob estresse severo e para a cultivar tolerante progressivamente dada a imposição dos défices hídricos. Mantendo-se, a cultivar tolerante, portadora de maior  $F_o$  em relação à sensível para ambos défices aplicados (Figura 5C).

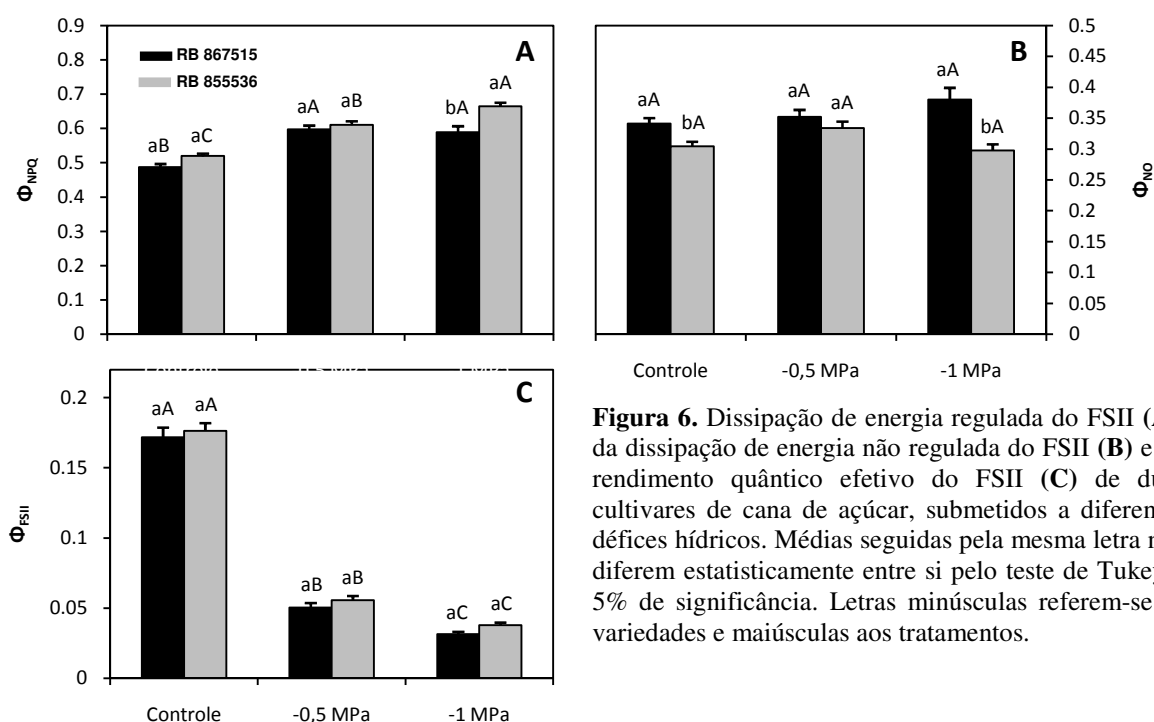
O rendimento quântico máximo potencial do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) fornece indícios de um dano fotoinibitório em ambas cultivares sob déficit hídrico, sendo este dano progressivo e de maior significância para a cultivar tolerante sob déficit severo (Figura 5D).

O coeficiente de extinção não fotoquímico ( $qN$ ) sofreu aumento para a cultivar sensível apenas sob estresse severo, contrastando com a cultivar tolerante que já apresentava elevação sob estresse moderado. O  $qN$  apresentou-se estatisticamente menor para a cultivar tolerante tanto no grupo controle quanto sob estresse severo (Figura 5B).

Já o coeficiente de extinção fotoquímico ( $qL$ ) sofreu diminuição para ambas cultivares quando sob déficit hídrico, não diferindo estatisticamente entre os défices e sendo menor para a cultivar tolerante em relação a sensível quando na ausência de estresse (Figura 5E).



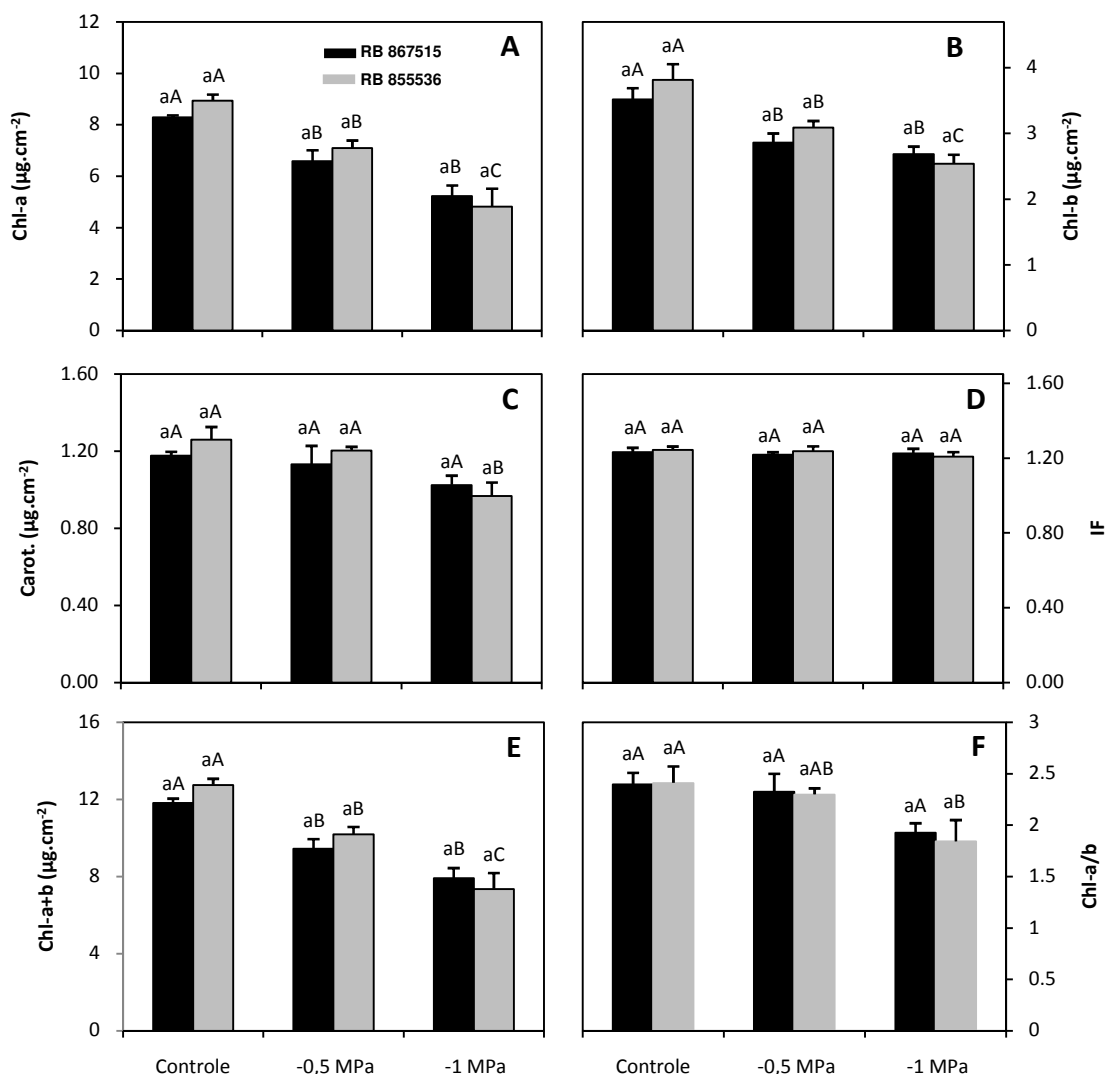
A dissipação de energia regulada do fotossistema II ( $\Phi_{NPQ}$ ) sofreu elevação para ambas cultivares sob déficit moderado, diferente do ocorrido sob déficit severo, no qual somente foi registrada elevação para a cultivar sensível, ficando a tolerante com mesmo nível para déficit severo e moderado (Figura 6A). Quanto à dissipação de energia não regulada do fotossistema II ( $\Phi_{NO}$ ), não houve variação significativa para ambas cultivares, porém manteve-se maior para a cultivar tolerante seja no grupo controle ou a -1 MPa (Figura 6B) Já o rendimento quântico efetivo do fotossistema II ( $\Phi_{FSII}$ ) apresentou comportamento estatisticamente semelhante para as duas cultivares, com diminuição proporcional ao déficit aplicado (Figura 6C).



**Figura 6.** Dissipação de energia regulada do FSII (A), da dissipação de energia não regulada do FSII (B) e do rendimento quântico efetivo do FSII (C) de duas cultivares de cana de açúcar, submetidos a diferentes défices hídricos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas aos tratamentos.

#### 4.5. Concentração de pigmentos

O acúmulo de clorofila *a* (Figura 7A), de clorofila *b* (Figura 7B) e de clorofilas totais (Figura 7E) apresentaram mesmo comportamento entre os genótipos, diminuindo de forma progressiva com a imposição dos défices hídricos.



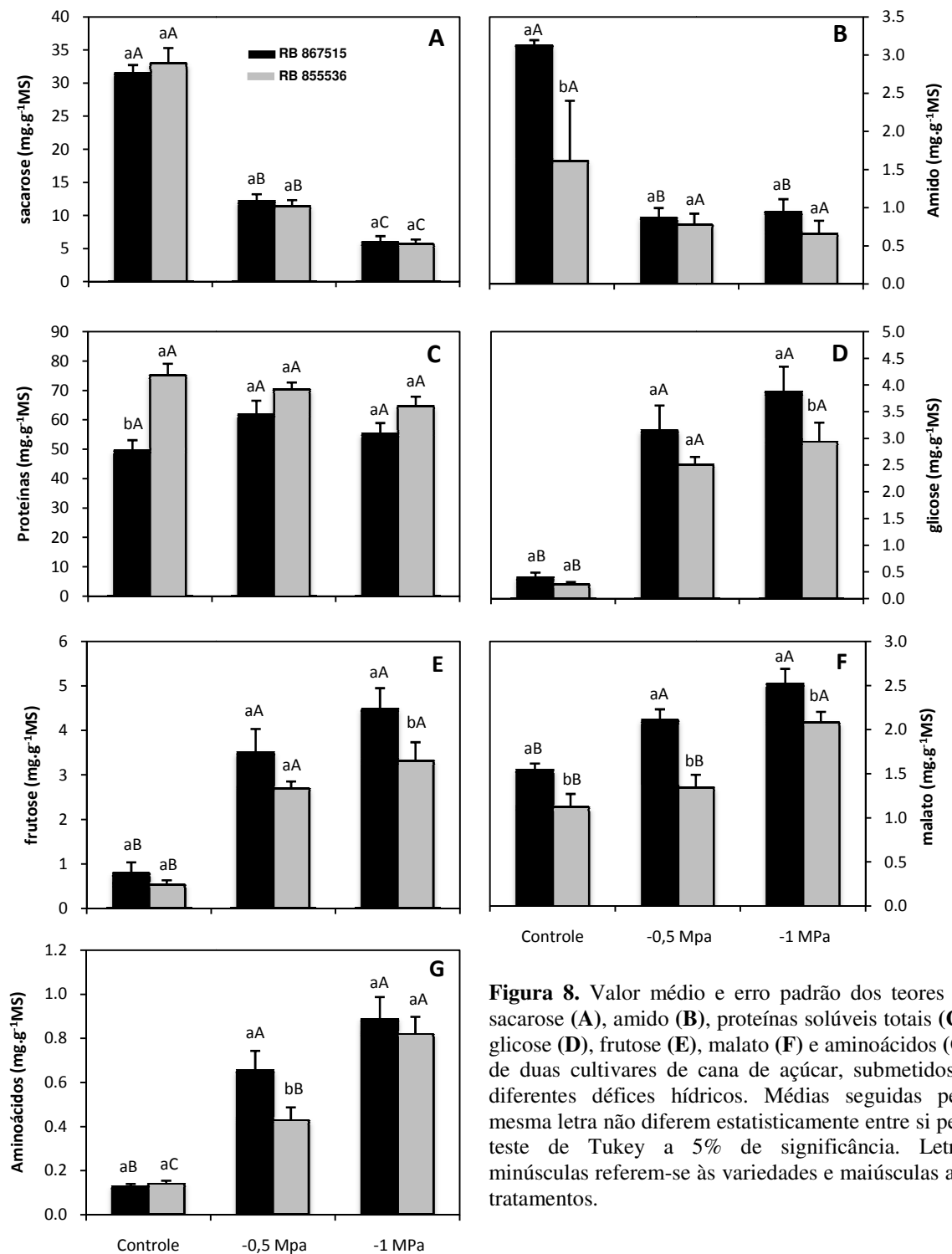
**Figura 7.** Valor médio e erro padrão do acúmulo de clorofila *a* (A), do acúmulo de clorofila *b* (B), do acúmulo de carotenóides (C), do índice de feofitinação (D), do acúmulo de clorofilas totais (E) e da razão clorofila *a*/clorofila *b* (F) de duas cultivares de cana de açúcar, submetidas a diferentes défices hídricos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas aos tratamentos.

O acúmulo de carotenóides (Figura 7C), a proporção clorofila *a*/*b* (Figura 6F) e o índice de feofitinação (Figura 7D), também tiveram comportamento similar entre os genótipos sob estresse hídrico.

#### **4.6. Metabólitos**

Os metabólitos correlacionados com reserva energética, como a sacarose (figura 8A) e amido, (Figura 8B) sofreram diminuição progressiva com a imposição dos défices hídricos em ambas cultivares de forma semelhante. O teor de proteínas também não variou com a imposição de défice hídrico em ambos os genótipos (Figura 8C).

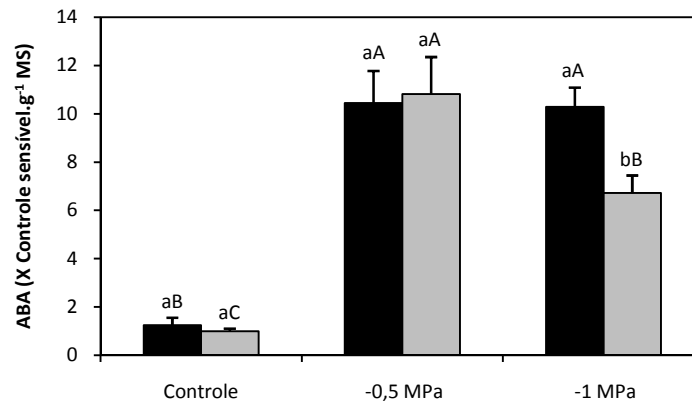
Já os demais metabólitos analisados, que podem ser correlacionados a mecanismos osmorregulatórios, como glicose (Figura 8D), frutose (Figura 8E), malato (Figura 8F) e aminoácidos (Figura 8G), sofreram elevação progressiva com a imposição dos défices hídricos, porém de forma diferenciada entre as cultivares, tendo a cultivar tolerante maiores teores destes metabólitos sob défice severo, e no caso de estresse moderado, para o malato e aminoácidos.



**Figura 8.** Valor médio e erro padrão dos teores de sacarose (A), amido (B), proteínas solúveis totais (C), glicose (D), frutose (E), malato (F) e aminoácidos (G) de duas cultivares de cana de açúcar, submetidas a diferentes défices hídricos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas aos tratamentos.

#### 4.7. Ácido abscísico (ABA)

A concentração de ABA na folha aumentou cerca de 10 vezes em ambas as cultivares sob estresse hídrico moderado e severo. Sob estresse severo maiores níveis de ABA foram observados nas folhas do genótipo tolerante (Figura 9).



**Figura 9.** Concentração de Ácido Abscísico normalizada em função do controle sensível em folhas das cultivares RB867515 (■) e RB855536 (■) de cana de açúcar, submetidos a diferentes défices hídricos. Barras representam médias  $\pm$  EP. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras minúsculas referem-se às variedades e maiúsculas aos tratamentos.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Cultivar tolerante apresenta retardamento da desidratação foliar com redução da condutância estomática e maior eficiência do uso da água

Dados coletados a campo indicam que a variedade RB867515 é mais tolerante a seca que a variedade RB855536. A maior capacidade de manutenção de água na folha (Figura 1) encontrada na cultivar tolerante indica uma maior capacidade deste genótipo em postergar a desidratação com o aumento do déficit hídrico. Esta capacidade pode estar relacionada a diferentes mecanismos que amenizam o estresse, como a modificação da arquitetura radicular, aumento da condutância hidráulica do xilema, ou redução da transpiração com o fechamento estomático, mecanismos estes, não mutuamente excludentes. Medição instantânea da condutância estomática e da transpiração não permitiu a observação de alterações, mas a análise da composição isotópica, que permite uma análise integrada da condutância estomática e da fotossíntese, indica uma redução da composição de carbono 13, isótopo pesado, indicando um maior fechamento estomático na variedade tolerante. A interpretação alternativa destes resultados, como devido a diferenças na fotossíntese, pode ser descartada, visto que a fotossíntese líquida não foi diferente entre os genótipos em diferentes níveis de estresse.

### 5.2. Estresse hídrico promove uma inibição bioquímica da fotossíntese

A literatura sobre os efeitos da seca nas plantas C4 sugere que a concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*) diminui somente nas fases iniciais do estresse hídrico, como descrito para o milho (Becker e Fock, 1986; Lal e Edwards, 1996; Leakey et al., 2004), sorgo (Williams et al., 2001), cana (Du et al., 1996), e amaranto (Lal e Edwards, 1996). Durante estágios posteriores da seca, quando há maior desidratação foliar, tem sido descrito em todas as espécies citadas, que *C<sub>i</sub>* aumenta, enquanto a assimilação líquida de carbono continua seu declínio (Becker e Fock, 1986; Du et al., 1996; Kalapos et al., 1996; Lal e Edwards, 1996). Em contraste a estes trabalhos citados, varias espécies com metabolismo C4 não apresentam mudanças (Saliendra et al., 1996, Ripley et al., 2007), ou mesmo até aumentando seu *C<sub>i</sub>* (Kalapos et al., 1996; Lal e Edwards, 1996). Nossos resultados corroboram com este segundo grupo de autores, pois verificou-se aumento de *C<sub>i</sub>* com o aumento da severidade do estresse hídrico. (Figura 3D)

### 5.3. Variedades apresentam efeitos contrastantes do estresse hídrico na fase fotoquímica da fotossíntese e no dano oxidativo

O menor dano oxidativo na cultivar tolerante pode ser inferido pela presença de menor extravasamento de eletrólitos (Figura 2A), a qual é uma variável importante para inferir sobre a integridade da membrana plasmática (Tarhanen et al. 1999; Munné-Bosch et al., 2002).

Os dados de fluorescência da clorofila *a* permitem sugerir que a cultivar tolerante pode apresentar mais danos fotooxidativos na presença de estresse hídrico. Primeiramente observa-se maior redução do rendimento quântico máximo potencial do FSII ( $F_v/F_m$ ) (Figura 5D) neste genótipo sob estresse hídrico severo. Em segundo lugar, há maior elevação na fluorescência mínima em folhas adaptadas ao escuro ( $F_o$ ) neste genótipo no mesmo nível de estresse (Figura 5C), o que indica uma maior necessidade de dissipação da energia não utilizada nas reações fotoquímicas na forma de radiação. Em terceiro lugar, este genótipo também apresenta menor coeficiente de extinção não fotoquímico ( $q_N$ ), indicando menor capacidade de eliminar esta energia na forma de calor quando comparada com a cultivar sensível sob déficit severo. O fato de não haver diferenças no rendimento quântico da conversão fotoquímica da energia no fotossistema II ( $\Phi_{II} = \Phi_{NPQ} + \Phi_{NO}$ ) entre os genótipos, o genótipo tolerante compensou a menor  $\Phi_{NPQ}$  (rendimento quântico de perdas reguladas da energia não fotoquímica) com uma maior  $\Phi_{NO}$  (rendimento quântico de perda de energia não regulada). O aumento de  $\Phi_{NO}$  indica que a meia vida da excitação fotoquímica permanece em níveis basais, ou se as reações fotoquímicas não estejam ocorrendo, o que poderia reduzir a formação de clorofilas e a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Laisk et al., 1997).

Os danos fotoinibitórios encontrados podem estar relacionados com um provável excesso de poder redutor, provocado pela limitação na assimilação de  $CO_2$ , como verificado pela elevação da razão  $C_i/C_a$  (Figura 3D) e dos teores de malato (Figura 8F). Este excesso de poder redutor pode provocar produção excessiva de EROs (Asada, K., 1999), acarretando em maior dano à integridade celular por parte da cultivar tolerante sob déficit severo, fato não observado com o extravasamento de eletrólitos e acúmulo de aldeído malônico (Figura 2). Estes resultados fornecem indícios e credibilidade para a existência de outros mecanismos de tolerância à seca para a cultivar tolerante.

Outro mecanismo provável seria a osmorregulação e para sua investigação contamos com a avaliação do metabolismo, que revelou uma elevação em glicose (Figura 8D), frutose (Figura 8E), malato (Figura 8F) e aminoácidos (Figura 8G), todos estes intimamente relacionados com mecanismos osmorreguladores (Wyn Jones, 1977).

Destes osmólitos, mudanças em aminoácidos e malato já podem ser observadas sob estresse moderado. Maior concentração destes compostos, na cultivar tolerante, poderia ser um dos mecanismos que permitiria a maior hidratação das folhas, e poderia explicar o menor extravasamento de eletrólitos.

#### **5.4. Maior tolerância à seca é associada a maiores níveis de ABA na folha sob estresse hídrico severo**

Foi possível observar um aumento em cerca de 10X nos níveis de ABA foliar em ambos os genótipos sob estresse moderado. Mas sob estresse hídrico severo, estes altos níveis são mantidos somente no genótipo tolerante. ABA é um componente fundamental do mecanismo que permite a planta satisfazer a demanda de água e otimizar o crescimento e sobrevivência em resposta a deficiência hídrica (Zhang e Davies, 1990; Xiong et al., 2007). Além disto, um aumento na concentração de ABA é uma resposta universal em plantas sujeitas a seca e outros estresses abióticos (Quarrie, 1991; Setter, 2006). Adicionalmente, ABA modula a expressão de um grande número de genes cujos produtos protegem a célula dos efeitos negativo da desidratação (Bray, 2000; Seki et al., 2007). ABA tem sido indicado como modulador de muitas das características que influenciam o balanço hídrico da planta, envolvendo tanto mecanismos que contribuem para evitar o estresse (postergar a desidratação), como a tolerância à desidratação (Thompson et al., 2007). O fato de termos a postergação da desidratação, com a redução da composição isotópica e menor extravasamento de eletrólitos no genótipo tolerante, sob estresse hídrico severo somente, exatamente quando o teor de ABA é maior nas folhas da RB 867515, sugere que a maior síntese e/ou menor degradação do ABA nas folhas desta cultivar pode ser o mecanismo responsável pela maior tolerância deste genótipo.

## 6. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos dados indicam a presença de vários mecanismos de evitar o estresse hídrico no genótipo RB867515. Embora nossos dados não permitam excluir outros mecanismos que possam contribuir em paralelo, ficou claro que este genótipo posterga a desidratação celular, o que foi associado com uma redução na condutância estomática e maiores níveis de ABA na folha. Estes efeitos explicam o menor extravasamento de eletrólitos sob estresse hídrico severo. Entretanto, há evidências de que, baseado na metodologia de indução de estresse rápido, ocorre um dano na fase fotoquímica da fotossíntese no genótipo tolerante, que ao mesmo tempo apresenta mecanismos de aclimatação, como o aumento do rendimento quântico da perda de energia não regulada do fotossistema II, o que não foi observado no genótipo sensível. Este mecanismo de aclimatação pode ser também um mecanismo de tolerância, visto que pode potencialmente, reduzir a produção de radicais livres.

Entre os fenótipos de tolerância, concluímos que a composição isotópica seria o método de seleção mais apropriado para selecionar progênies com este genótipo como parental.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601–639
- Aguirre Junior JM (1936) Criação de novas variedades de cana de açúcar no estado de São Paulo. *Inst. Agro. Camp (IAC)* 34: 64
- Bacchi OS, Souza IAGC (1980) Minimum threshold temperature for sugarcane growth. *Congress Int. Soc. Sugarcane Tech.* 18(4) 1731-1741
- Becker TW, Fock HP (1986) Effects of water stress on the gas exchange, the activities of some enzymes of carbon and nitrogen metabolism, and on the pool sizes of some organic acids in maize leaves. *Photosynthesis Research.* 8:175–181.
- Bernoux M, Cerri CC, Neill C, Moraes JFL (1998) The use of stable carbon isotopes for estimating soil organic matter turnover rates. *Geoderma* 82: 43-58
- Bidóia VS (2009) Emprego de extrato de Moringa no processo de clarificação do caldo de cana. *Monografia UNESP*
- Bilger W, Schreiber U (1986) Energy-dependent quenching of dark level chlorophyll fluorescence in intact leaves. *Photosynth. Res.* 10: 303-308
- Bowman JL, Smyth DR, Mmeyerowitz EM (1989) Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 1:37-52.
- Bray E, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. *American Society of Plant Biologists* 1158-1203
- Cairo Calmon P (1935) O açúcar, sua história e influência na civilização brasileira. *Anuário Açucareiro (IAA)* 7-12
- Carmo-Silva AE, Soares AS, Marques da Silva J, Bernardes da Silva A, Keys AJ, Arrabaça MC (2007) Photosynthetic responses of three C4 grasses of metabolic subtypes to water deficit. *Functional Plant Biology* 34:204–213

Cornic G, Fresneau C. (2002) Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during mild drought. *Annals of Botany* 89:887–894

Corrêa PM (1926) Dicionário de plantas úteis do Brasil. *Imprensa Nacional* 1: 13

Da Matta FM, Chaves ARM, Pinheiro HÁ, Cucatti C, Loureiro ME (2003) Drought tolerance of two Field-grown clones of *coffeacanephora*. *PkabtSci* 164: 111-117

De Carli G (1936) O açúcar na formação econômica do Brasil. *Edição Brasil Açucareiro* 2: 7-72

Durgbanshi A, Arbona V, Pozo O, Miersch O, Sancho JV, Gómez-Cadenas A (2005) Simultaneous Determination of Multiple Phytohormones in Plant Extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agric. Food. Chem.* 53: 8437-8442

Ehleringer JR, Sage RF, Flanagan LB, Pearcy RW (1991) Climate change and the evolution of C4 photosynthesis. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 95–99

Fagliata FA (1966) Balance Hídrico y maduración de caña de azúcar em tucuman. *Revista Industrial y Agrícola de Tucuman* 154: 43-60

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose 6 phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212: 250-263

Foyer CH, Valadier M-H, Migge A, Becker TW (1998) Drought-induced effects on nitrate reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology* 117: 283–292

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim.Biophys.Acta* 990: 87-92

Ghannoum O, von Caemmerer S, Conroy JP (2002) The effect of drought on plant water use efficiency of nine NAD-ME and nine NADP-ME Australian C4 grasses. *Functional Plant Biology* 29: 1337–1348

- Ghannoum O. (2009) C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany* 103: 635–644
- Hatch MD (1987) C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultra structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 895: 81–106
- Hendrikson L, Furbank RT, Chow WS (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.*82: 73-81
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611
- Hogarth D (1987) Genetics of sugarcane. Sugarcane Improvement through breeding 255-271
- Kalapos T, van den Boogaard R, Lambers H (1996) Effect of soil drying on growth, biomass allocation and leaf gas exchange of two annual grass species. *Plant and Soil* 185: 137–149
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE (2004) New fluorescence parameters for the determination of redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth. Res.*79(2): 209-218
- Krieg DR, Hutmacher RB (1986) Photosynthetic rate control in sorghum: stomatal and nonstomatal factors. *Crop Science* 26: 112–117
- Laisk A, Loreto F (1996) Determining photosynthetic parameters from leaf CO<sub>2</sub> exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiology* 110: 903-912
- Laisk A, Oja V, Rasulov B, Eichelmann H, Sumberg A (1997) Quantum yields and rate constants of photochemical and nonphotochemical excitation quenching. Experiment and model. *Plant Physiol* 115: 803-815
- Lal A, Edwards GE (1996) Analysis of inhibition of photosynthesis under water stress in the C4 species *Amaranthus cruentus* and *Zea mays*: electron transport, CO<sub>2</sub> fixation and carboxylation capacity. *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 403–412

Landell MGA, Alvarez R (1993) Cana de açúcar. *Melhoramento de plantas* (IAC) 77-93

Lawlor DW, Cornic G (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment* 25: 275–294

Leakey ADB, Bernacchi CJ, Dohleman FG, Ort DR, Long SP (2004) Will photosynthesis of maize (*Zea mays*) in the US Corn Belt increase in future [CO<sub>2</sub>] rich atmosphere? An analysis of diurnal courses of CO<sub>2</sub> uptake under free-air concentration enrichment. *Global Change Biology* 10: 951–962

Lloyd J, Farquhar GD (1994) <sup>13</sup>C discrimination during CO<sub>2</sub> assimilation by the terrestrial biosphere. *Oecologia* 99: 201–215

Marques da Silva J, Arrabaca MC (2004) Photosynthesis in the water stressed C4 grass *Setaria sphacelata* is mainly limited by stomata with both rapidly and slowly imposed water deficits. *Physiologia Plantarum* 121: 409–420

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279

Oxborough K, Baker NR (1997) An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at the cellular and sub-cellular levels of organization. *Plant Cell Environ.* 20: 1473-1483

Ripley BS, Gilbert ME, Ibrahim DG, Osborne CP (2007) Drought constraints on C4 photosynthesis: stomatal and metabolic limitations in C3 and C4 subspecies of *Alloterosis semialata*. *Journal of Experimental Botany* 58: 1351–1363

Roach BT, Daniels JA (1987) A review of the origin and improvement of sugarcane. *Int.Sug. Breed.* 1: 1-31

Saliendra NZ, Meinzer FC, Perry M, Thom M (1996) Associations between partitioning of carboxylase activity and bundle sheath leakiness to CO<sub>2</sub>, carbon isotope discrimination, photosynthesis, and growth in sugarcane. *Journal of Experimental Botany* 47: 907–914

Silva MA, Jifon JL, da Silva JAG, Sharma V (2007) Use of physiological

parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. Brazilian

*Journal of Plant Physiology* 19(3): 193-201

Souza AP, Marília G, Emerson S, Eugênio CU, Alessandro JW, Milton N Jr., Renato V S, Marcelo MT, Glaucia MS, Marcos SB (2008) Elevated CO<sub>2</sub> increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies gene expression in sugarcane. *Plant Cell and Environment* 31: 1116–1127

Stasovski E, Peterson CA (1993) The effects of drought and subsequent rehydration on the structure, vitality and permeability of *Allium cepa* L. adventitious roots. *Canadian Journal of Botany* 71: 700-707

Stevenson GC (1965) Genetics and breeding of sugar cane. *Longmans* 284

Taiz L, Zeiger E. (2008). *Plant physiology*. Redwood City, CA: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc 525p, 2010

Tarhanen S. (1999) Membrane permeability response of lichen *Bryoria fuscescens* to wet deposited heavy metals and acid rain. *Environmental Pollution*, 104: 121-129

Thornthwaite CW, Mather JR (1955) The water balance. *Centerton* 104

Tipple BJ, Pagani M (2007) The early origins of terrestrial C<sub>4</sub> photosynthesis. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 35: 435–461

Vasconcelos ACM, Prado H, Landell MGA (2004) Desenvolvimento de sistema radicular de cana-de-açúcar e características físico-hídricas e químicas dos ambientes de produção. *Relatório de pesquisa*

von Caemmerer S (2000) Biochemical models of leaf photosynthesis. *Collingwood: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Publishing*, 165

Vu JCV, Allen LH, Gesch RW (2006) Up-regulation of photosynthesis and sucrose metabolism enzymes in young expanding leaves of sugarcane under elevated growth CO<sub>2</sub>. *Plant Science* 171: 123–131

Weiner H, Burnell JN, Woodrow IE, Heldt HW, Hatch MD (1988) Metabolite diffusion into bundle sheath cells from C<sub>4</sub> plants: relation to C<sub>4</sub> photosynthesis and plasmodesmatal function. *Plant Physiology* 88: 815–822

Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144: 307-313

Williams DG, Gempko V, Fravolini A, Leavitt SW, Wall GW, Kimball BA (2001) Carbon isotope discrimination by *Sorghum bicolor* under CO<sub>2</sub> enrichment and drought. *New Phytologist* 150: 285–293

Zhao R, Jiao X, Yang Z, Wang J, Niu S (2006) Effects of irradiance on boron requirement of *Phaseolus aureus* cutting for its adventitious root development. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 17(5):801-804