# Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

# Resposta antioxidativa em variedades de cana-de-açúcar (Saccharum spp.) sob déficit hídrico

# Mariana Cicarelli Cia

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de plantas

Piracicaba 2010 Mariana Cicarelli Cia Engenheiro Agrônomo

# Resposta antioxidativa em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob déficit hídrico

Orientador: Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO** 

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba 2010

# Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Cia, Mariana Cicarelli Resposta antioxidativa em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob déficit hídrico / Mariana Cicarelli Cia. - - Piracicaba, 2010. 90 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010. Bibliografia.

1. Antioxidantes 2. Cana-de-açúcar 3. Deficiência hídrica 4. Enzimas 5. Estresse oxidativo I. Título

> CDD 633.61 C565r

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Alcindo e Nair, a minha irmã, Sandra, ao meu sobrinho, Guilherme, aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui DEDICO

> A minha mãe, principal incentivadora, OFEREÇO

# AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por me permitir acordar todos os dias e me dar forças para realizar todas as minhas atividades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa nos primeiros meses de trabalho e a Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro com bolsa (2008/52283-8) e auxílio à pesquisa (2004/08444-6).

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), em especial a Dra. Sabrina Moutinho Chabregas e Ana Carolina Ribeiro Guimarães, pelo auxílio ao longo do desenvolvimento deste projeto e pelo material biológico utilizado.

Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pelo ensino excelente e infra-estrutura oferecida.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pela orientação, confiança, amizade e pela disponibilização de excelente infra-estrutura para pesquisa.

Ao Prof. Dr. Leonardo Oliveira Medice (Universidade Federal Rural - RJ), pelo apoio e auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Daniel Scherer de Moura (ESALQ-USP) e a Dra. Carolina Vianna Morgante pelos conselhos e incentivo em minha vida científica.

Aos colegas do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, pelo companheirismo e atenção. Um agradecimento especial a Flávia Regina Capaldi de Lima, Priscila Lupino Gratão, Carolina Cristina Monteiro e Gisele de Carvalho pelas ótimas discussões científicas e pelo auxílio no desenvolvimento deste projeto.

A Salete Aparecida Gaziola pelo incentivo e suporte desde o início do desenvolvimento deste trabalho.

A Leila Priscila, Aline, Daiana e Mônica pela amizade e alegrias compartilhadas a cada dia de trabalho.

Aos meus pais, irmã, sobrinho, cunhado, minha tia Olinda. Minha família que sempre esteve presente. Muito obrigada.

Aos amigos que fazem parte da minha vida que, mesmo aqueles distantes, incentivaram de alguma forma.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Genética, ESALQ-USP.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Disponibilidade hídrica do solo versus produtividade da cana-de-açúcar	15
2.2 Percepção do déficit hídrico	16
2.3 Mecanismos de resistência ao estresse hídrico	17
2.5 Estresse oxidativo: estresse secundário	20
2.6 Sistema antioxidante enzimático	22
2.6.1 Superóxido dismutase (SOD)	22
2.6.2 Catalase (CAT)	23
2.6.3 Ascorbato peroxidase (APX)	24
2.6.4 Guaiacol peroxidase (GPOX)	25
2.6.5 Glutationa redutase (GR)	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material vegetal	27
3.2 Peroxidação lipídica	28
3.3 Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	28
3.4 Concentração de prolina	29
3.5 Extração protéica	29
3.5.1 Quantificação de proteínas	29
3.5.2 Perfil protéico em SDS-PAGE	30
3.5.2.1 Coloração com prata para SDS-PAGE	30
3.5.3 Análise da SOD em PAGE	31
3.5.3.1 Caracterização das isoformas da SOD	32
3.5.4 Atividade da CAT	32
3.5.5 Atividade da APX	33
3.5.6 Atividade da GPOX	33
3.5.7 Atividade da GR	33
3.6 Delineamento experimental e análise estatística	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Peroxidação lipídica	35

4.2 Conteúdo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	36
4.3 Conteúdo de prolina	37
4.4 Perfil proteíco em SDS-PAGE	38
4.5 Atividade da SOD	44
4.6 Atividade da CAT	52
4.7 Atividade da APX	53
4.8 Atividade da GPOX	55
4.9 Atividade da GR	56
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	73

#### RESUMO

# Resposta antioxidativa em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob déficit hídrico

O déficit hídrico é o principal fator limitante na produtividade das culturas agrícolas. A exposição das plantas a este estresse pode resultar em dano oxidativo devido ao aumento na produção de espécies ativas de oxigênio (EAOs). O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos do déficit hídrico, em 20 variedades de cana-deaçúcar, através da resposta do sistema antioxidante. O déficit hídrico foi imposto pela supressão da irrigação durante 3, 10 e 20 dias. A peroxidação lipídica, mensurada através do conteúdo de MDA, e a concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram utilizados como indicativos da ocorrência de estresse oxidativo. A resposta do sistema antioxidante variou em função das variedades estudadas e da intensidade do estresse aplicado. Todavia, após 3 dias de supressão da irrigação não ocorreu variação no perfil protéico em SDS-PAGE, no conteúdo de MDA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prolina e na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) e glutationa redutase (GR), para a maioria das variedades estudadas. Entretanto, aos 10 dias de supressão da irrigação, com exceção da GR, a maioria das variedades demonstrou incremento nestes parâmetros. Após 20 dias todos os genótipos demonstraram incremento no conteúdo de MDA, em relação ao controle, refletindo os danos causados pelo estresse oxidativo. As variedades que demonstraram redução na atividade das enzimas SOD e APX, 20 dias após a suspensão da irrigação, apresentaram maior incremento na peroxidação lipídica e conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estes resultados sugerem que sob déficit hídrico moderado, a maioria das variedades foi capaz de induzir a atividade das enzimas antioxidantes. Entretanto, à medida que o déficit hídrico torna-se mais severo pode ocorrer o colapso do sistema de defesa antioxidante, sendo a SOD e APX as enzimas mais afetadas.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Déficit hídrico; Estresse oxidativo; Enzimas antioxidantes

#### ABSTRACT

# Antioxidative response of sugarcane (*Saccharum* spp.) genotypes under water deficit

Water deficit is the major yield-limiting factor of crop plants. Plant exposure to this abiotic stress can result in oxidative damage due to the over production of reactive oxygen species (ROS). The aim of this work was to study the effects of water deficit in 20 sugarcane genotypes in response of the antioxidant system. Water deficit was imposed by withholding irrigation during 3, 10 and 20 days. Lipid peroxidation, measured as MDA content, and hydrogen peroxide  $(H_2O_2)$  was used as oxidative stress Antioxidant system response ranged according to genotypes and stress markers. intensity. After 3 days of withholding irrigation, no variation in protein profile (SDS-PAGE), MDA content, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, proline and activity of antioxidant enzymes superoxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX) and glutathione reductase (GR) was observed, in the majority of genotypes. However, 10 days after withholding irrigation, the majority of genotypes showed increase in these parameters. After 20 days, all genotypes showed increase in MDA content, compared with control plants, reflecting the damage caused by oxidative stress. Genotypes that showed decrease in the activity of SOD and APX, 20 days after withholding irrigation, presented high increase in lipid peroxidation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content. These results suggest that under moderate water deficit, the majority of genotypes were able to induce the activity of antioxidant enzymes. However, as the water deficit became more severe the collapse of antioxidant system can occur, being SOD and APX the more affected enzymes.

Keywords: Sugarcane; Water deficit; Oxidative stress; Antioxidant enzymes

# 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de interesse mundial, sendo cultivada em mais de 90 países. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma estimativa de produção para a safra 2009/2010 de, aproximadamente, 550 milhões de toneladas (UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2009), as quais deverão suprir a crescente demanda interna e externa por álcool combustível e açúcar. O agronegócio sucroalcooleiro movimenta cerca de R\$ 40 bilhões por ano, com faturamentos diretos e indiretos, o que corresponde a aproximadamente 2,35% do PIB nacional, além de ser um dos setores que mais empregam no país, com a geração de 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, e de congregar mais de 72.000 agricultores (UNICA, 2009).

Nos últimos anos vem ocorrendo uma grande expansão da área de cultivo da cultura, principalmente nas regiões Centro-Sul e Centro-Oeste do país, englobando o Oeste do Estado de São Paulo, Sudoeste de Minas Gerais, além dos Estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, conhecidos por apresentaram déficit hídrico por longos períodos durante o ano. Além destas, a região Nordeste do Brasil apresenta grande tradição no plantio da cana-de-açúcar, no entanto a produtividade (ton/ha) é menor que na maioria das unidades produtoras encontradas na região centro-sul. Esta diferença deve-se à baixa disponibilidade de variedades comerciais adaptadas ao estresse hídrico que ocorre nesta região. A compreensão dos mecanismos tolerância à seca nas variedades de cana-de-açúcar permitirá direcionar os cruzamentos em programas de melhoramento, visando à obtenção de progênies com maior tolerância ao déficit hídrico, o que aumentará a viabilidade da cultura canavieira nestas áreas.

A tolerância à seca é um mecanismo que permite à planta manter o seu metabolismo em níveis considerados normais, mesmo sob baixos potenciais de água no solo, devido a uma série de alterações fisiológicas e bioquímicas. Entre as alterações bioquímicas o ajuste osmótico e a capacidade antioxidante têm sido relatados como os principais mecanismos que permitem as plantas tolerar a redução do potencial hídrico do solo. O ajuste osmótico corresponde ao acúmulo de solutos compatíveis ou osmólitos dentro da célula, reduzindo o potencial osmótico e auxiliando

na manutenção do turgor à medida que a planta experimenta o déficit hídrico. A capacidade antioxidante resulta da habilidade das plantas em inativar as espécies ativas de oxigênio (EAOs), as quais provocam um desbalanço redox nas células, influenciando em todo o transporte de elétrons, e por fim desencadeando o estresse oxidativo, devido à sua ação tóxica e mutagênica (ANGELOVA et al., 2000).

Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar 20 variedades comerciais de cana-de-açúcar, pertencentes ao banco de germoplasma do CTC (Piracicaba, SP), quanto à resposta ao déficit hídrico, a partir de uma abordagem bioquímica, a fim de compreender as alterações metabólicas que ocorrem nas plantas submetidas a este tipo de estresse e que caracterizam a tolerância ou sensibilidade ao déficit hídrico. Entretanto, este trabalho faz parte de um projeto mais abrangente, no qual foram analisadas as alterações provocadas pela redução na disponibilidade de água nos níveis fisiológico e molecular.

# 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 Disponibilidade hídrica do solo versus produtividade da cana-de-açúcar

Estresses abióticos causam efeitos adversos na produtividade das culturas agrícolas e influenciam na distribuição destas em diferentes ambientes (ARAUS et al., 2002). Estes efeitos recebem considerável atenção devido aos potenciais impactos das mudanças climáticas no padrão de distribuição das chuvas e extremos de temperatura, salinização de terras pela irrigação e a necessidade de expandir a agricultura para áreas marginais mantendo uma alta produtividade (VERSLUES et al., 2006).

A seca é considerada o principal estresse abiótico em plantas (PARRY et al., 2004; CRUZ DE CARVALHO, 2008) e também o que mais influencia, de forma negativa, a produtividade da cana-de-açúcar no Brasil (RAMESH, 2000). Seus efeitos sobre as plantas incluem a redução na assimilação de CO<sub>2</sub>, na taxa de transpiração, de crescimento, na abertura estomática (TAIZ; ZEIGER, 2004), crescimento dos perfilhos e altura final dos colmos (SUGIHARTO, 2004). As necessidades hídricas da cana-de-açúcar variam de acordo com o estádio vegetativo da planta e a cultivar utilizada (AUDE, 1993) sendo, portanto, função da área foliar, estádio fisiológico e densidade radicular. A fenologia da cana-de-açúcar é dividida em quatro fases: brotação e estabelecimento, perfilhamento, crescimento dos colmos e maturação. Segundo Ramesh (2000) as fases de perfilhamento e crescimento dos colmos, as quais caracterizam o estádio vegetativo, manifestam maior sensibilidade à redução na disponibilidade hídrica do solo, influenciando negativamente a fase de maturação.

A cana-de-açúcar no Brasil praticamente não é irrigada. As necessidades hídricas têm sido sanadas naturalmente pelo regime de chuvas das regiões produtoras e complementadas pela aplicação da vinhaça, subproduto da produção do etanol, rica em água e nutrientes orgânicos. Entretanto, nos últimos anos, tem-se observado alteração no regime de chuvas durante a fase de produção da cultura. Muitos trabalhos relacionam esta alteração com o aquecimento global e prevêem aumento na irregularidade de distribuição das chuvas, caso a concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera continue a aumentar (PALL et al., 2007; SOLOMON et al., 2009). De acordo com

Doorenbos e Kasan (1979), períodos com distribuição inferior a 60 mm já caracterizam déficit hídrico.

### 2.2 Percepção do déficit hídrico

Ainda não se conhecem em plantas os receptores responsáveis pela percepção da redução no potencial hídrico do solo (BARTELS; SUNKAR, 2005). Assim, a maioria dos estudos está relacionada à percepção do estresse hídrico em leveduras e microorganismos. Em leveduras, a alteração no potencial hídrico é sentida por dois tipos de osmosensores, SLN1 e SHO1. O déficit hídrico induz a perda de turgor ocasionando a redução no volume da célula e aumento na distância entre a membrana plasmática e a parede celular. Acredita-se que SLN1 e SHO1 percebam essa alteração na pressão de turgor (REISER et al., 2003). Em *Arabidopsis thaliana* foi encontrado o receptor SLN1 (URAO et al., 1999). Outros candidatos a receptores em plantas são NtC7 e Cre1. O gene NtC7 codifica uma proteína receptora de membrana cuja super-expressão aumentou a tolerância ao estresse hídrico (TAMURA et al., 2003). Cre1, encontrado em *A. thaliana*, apresenta uma organização estrutural bastante semelhante a SLN1 quanto aos domínios receptores e citoplasmáticos de histidina kinase (REISER et al., 2003).

A transdução do sinal dá-se através de cascatas de sinalização que ativam a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse. As rotas de sinalização compreendem uma rede de interações proteína-proteína, fosforilação e desfosforilação por meio de MAPK e fosfatases, além de moléculas sinalizadoras como Ca<sup>+2</sup> e EAOs, os quais levam a ativação de genes induzidos pelo estresse (BARTELS; SUNKAR, 2005). Os produtos desses genes podem regular a expressão gênica e a transdução de sinais de resposta ou proteger a planta contra as alterações ocasionadas pelo estresse (SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). No primeiro grupo, envolvido na transdução de sinais, estão os fatores de transcrição, os quais são ativados através de vias dependentes e independentes do ácido abscísico (ABA), e ligam-se a seqüências específicas do DNA conhecidas como ABRE (*ABA Responsive Element*) e DREB

(*Drought Responsive Element*) (SEKI et al., 2003). O segundo grupo inclui proteínas que funcionam protegendo as células da desidratação, como as enzimas envolvidas na biossíntese de vários osmoprotetores (prolina, glicina-betaína, trealose), proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), chaperonas, enzimas e composto antioxidantes. Genes que codificam estes compostos têm sido utilizados na transformação genética de plantas visando o aumento na tolerância à seca (WANG et al., 2005; MOLINARI et al., 2007; LIU et al., 2009).

#### 2.3 Mecanismos de resistência ao estresse hídrico

Por serem organismos sésseis as plantas desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, mecanismos de resistências para suportar as diversas alterações ambientais a que são submetidas. Os mecanismos de resistência à seca atuam no sentido de prevenir ou tolerar a queda no potencial hídrico dos tecidos. Assim, são classicamente divididos em fuga, retardo e tolerância à seca (LEVITT, 1972; VERSLUES et al., 2006).

As plantas que adotam a estratégia de fuga à seca apresentam uma alta plasticidade e rápido desenvolvimento fenológico, adotando mecanismos de dormência que impedem a germinação, antes que seja atingido um nível adequado de umidade no solo. Nas comunidades vegetais encontradas nos desertos e em algumas regiões semiáridas, existem várias espécies de plantas, que com a chegada das chuvas, germinam, florescem e produzem sementes em um curto período de tempo, antes que o teor de umidade caia a níveis que possam causar-lhes dano (KRAMER; BOYER, 1995).

O retardo ou prevenção à seca corresponde à capacidade das plantas em manterem o potencial hídrico de seus tecidos em níveis próximos aos das plantas não estressadas, através de um balanço entre a captação e a perda de água. Visando manter este equilíbrio, as plantas fecham seus estômatos, em curto prazo, ou aumentam a razão raiz/parte aérea, a capacidade de estocar água e a espessura da cutícula, em longo prazo (TAIZ; ZEIGER, 2004). No caso de estresse moderado ou de curta duração, este mecanismo pode ser eficiente (KRAMER; BOYER, 1995), todavia, apresenta como desvantagem a redução na concentração interna de CO<sub>2</sub>, receptor de elétrons no ciclo de Calvin, pelo fechamento estomático. Além destas desvantagens,

também podem ocorrer limitações em componentes não estomáticos, resultando em danos nos centros de reação do PSII, que podem apresentar reversão parcial após a reidratação (ANGELOPOULOS et al., 1996). Isto pode ocasionar o colapso da cadeia transportadora de elétrons, redução na atividade do fotossitema II (PSII) e o aumento na síntese de EAOs.

A medida que o déficit hídrico torna-se mais severo, as plantas não conseguem manter o equilíbrio entre a captação e a perda de água. Neste caso, a redução no potencial hídrico dos tecidos vegetais não pode ser evitada e novas estratégias fazem-se necessárias para que as plantas possam tolerar a seca. Assim, a tolerância à seca pode ser entendida como a habilidade das plantas em resistir à redução no potencial hídrico de seus tecidos (MITRA et al., 2001). Entre os mecanismos adotados nesta fase estão o ajuste osmótico e o aumento na atividade do sistema de defesa antioxidante (ASADA et al., 1999).

O ajuste osmótico corresponde ao acúmulo de solutos compatíveis ou osmólitos como prolina, compostos guaternários de amônio (glicina betaína, prolina betaína, βalanina betaína e cholina-O-sulfato), trealose, glicose e o composto terciário de sulfato 3-dimetilsulfoniopropionato (DMSP). Estes compostos apresentam a propriedade de, mesmo em altas concentrações, não interferirem na função e estrutura de macromoléculas. Por serem preferencialmente excluídos da superfície de hidratação de proteínas contribuem para a estabilização destas (HOEKSTRA et al., 2001). À medida que as plantas perdem água, podem substituir moléculas destas através de ligações ponte de hidrogênio mantendo o espaçamento entre os fosfolipídios e a estrutura da membrana (HARE, 1998). Além disso, podem contribuir para a redução do potencial osmótico, manutenção da absorção de água e da pressão de turgor da célula. Diante disso, acúmulo de osmólitos em plantas tem sido utilizado como critério de seleção em programas de melhoramento convencional de plantas visando aumento da produtividade em ambiente com deficiência hídrica (CLAUSSEN, 2005). A atuação do sistema de defesa antioxidante em plantas será discutida em maiores detalhes nos itens 2.5 e 2.6.

#### 2.4 Acúmulo de prolina sob déficit hídrico

Em plantas, o aminoácido prolina é sintetizado a partir do glutamato via Δ1pirrolina-5-carboxilato (P5C) por duas sucessivas reduções, as quais são catalisadas pelas enzimas P5C sintetase (P5CS) e P5C redutase (P5CR) (HARE et al., 1998) ou, alternativamente, a partir da ornitina pela enzima ornitina d-aminotransferase – OAT (LUTTS et al., 1999). Embora as duas vias de biossíntese de prolina livre sejam igualmente importantes em condições normais, existem evidências que favorecem a via direta do glutamato, em condições de estresse hídrico (SODEK, 2004; BARTELS; SUNKAR, 2005).

Em condições de estresse, o metabolismo de aminoácidos é amplamente alterado, sendo a síntese de proteínas diminuída e a proteólise aumentada (SODEK, 2004). O acúmulo de prolina sob condições de estresse dá-se através do aumento de sua síntese e redução da oxidação (HARE; CRESS, 1997). Durante o estresse osmótico há diferentes rotas de sinalização responsáveis pela regulação da síntese de prolina (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). O hormônio ABA e fosfolipase C são responsáveis pela indução da expressão do gene *p5cs* em *Arabidopsis*, embora a atuação da fosfolipase C, no acúmulo de prolina, só tenha sido detectada sob estresse salino (ABRAHAM et al., 2003; PARRE et al., 2007). Verslues et al. (2007) acreditam que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como parte da sinalização pelo ABA também atue na regulação da síntese de prolina.

Várias funções são propostas para este acúmulo: ajuste osmótico, reserva de carbono e nitrogênio utilizada para o restabelecimento após estresse, desintoxicação do excesso de amônia, estabilizador de proteínas e membranas e eliminadores de EAOs (KAVI-KISHOR et al., 2005). Por possuir um anel pirrolina, que confere uma baixa capacidade de ceder elétrons, acredita-se que a prolina possa seqüestra o O<sub>2</sub> livre (REDDY et al., 2004). Adicionalmente, existem evidências de que a biossíntese desse aminoácido poderia estar associada à regulação do pH citosólico ou à manutenção da razão NADP<sup>+</sup>/NADPH, controlando o fluxo de carbono devido à via oxidativa da pentose fosfato (HARE; CRESS, 1997), além de atuar como fonte de energia, onde uma única molécula oxidada é capaz de produzir 30 ATP (KAVI-KISHOR et al., 2005). Muitos

trabalhos utilizam o acúmulo de prolina como um indicador bioquímico-fisiológico de estresse hídrico (MARIN et al., 2006) e relacionam o aumento em sua concentração com a tolerância a seca (SHAO et al., 2006; MOLINARE et al., 2007). Entretanto, o uso do aminoácido prolina como indicativo de tolerância a seca, por si só, deve ser cauteloso, devido a complexa rede de alterações que ocorrem nas plantas quando submetidas ao déficit hídrico.

#### 2.5 Estresse oxidativo: estresse secundário

O oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) possui baixa reatividade devido à configuração paralela de seus elétrons nos dois últimos orbitais incompletos. Esta organização impõe que a redução do O<sub>2</sub> deve ser efetuada por transferências consecutivas de um único elétron. Os produtos resultantes da redução do O<sub>2</sub> são altamente reativos e recebem a denominação de espécies ativas de oxigênio (EAOs). Estas incluem os radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>••</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) e oxigênio "singlet" (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Sob condições normais, estes são gerados pelo metabolismo dos organismos aeróbicos, principalmente através da fotossíntese e respiração, porém mantidos em níveis basais através de sistemas antioxidantes de defesa (GRATÃO et al., 2005). Em condições adversas como seca, salinidade, alta temperatura, radiação ultravioleta, presença de metais pesados e patógenos a produção de EAOs pode saltar de 240  $\mu$ M s<sup>-1</sup> O<sub>2</sub><sup>-</sup> para 720  $\mu$ M s<sup>-1</sup> O<sub>2</sub><sup>-</sup> (POLLE, 2001). Quando esse aumento é maior que a capacidade antioxidante da célula, caracteriza-se o processo de estresse oxidativo (PANDHAIR; SEKHON, 2006).

O estresse oxidativo pode ativar a morte celular programada devido à peroxidação lipídica de membranas, oxidação de proteínas, inibição enzimática e danos ao DNA e RNA. Por outro lado, as EAOs também podem agir como sinalizadoras em vários processos intrínsecos de crescimento e desenvolvimento adaptativos (PITZSCHKE et al., 2006), além de atuarem como mensageiros secundários envolvidos na ativação de genes de resposta ao estresse e rotas de defesa (DESIKAN et al., 2001; KNIGHT; KNIGHT, 2001).

A peroxidação lipídica e oxidação de proteínas são constantemente utilizadas como indicadores de estresse oxidativo. A primeira caracteriza-se pelo ataque aos ácidos graxos, ou a um lado específico da cadeia, por qualquer substância química que tenha reatividade suficiente para abstrair um H<sup>+</sup> da cadeia do ácido graxo, sendo os ácidos graxos poliinsaturados mais sensíveis a peroxidação (HALLIWELL; CHIRICO, 1993). Esta afeta severamente a funcionalidade e integridade celular e pode produzir danos irreversíveis à célula, resultado do aumento na permeabilidade da membrana plasmática, que provoca o extravasamento de íons K<sup>+</sup> e outros solutos (CHAOUI et al., 1997), enquanto que os danos às membranas intracelulares podem afetar a atividade respiratória nas mitocôndrias e a fotossíntese nos cloroplastos (SCANDALIOS, 2005). As proteínas são afetadas diretamente pela oxidação da cadeia de aminoácidos produzindo grupos carbonil na molécula protéica, as quais podem expor regiões hidrofóbicas, produzindo agregados (ROMERO-PUERTAS et al., 2002).

Vários mecanismos são utilizados pelas plantas para desintoxicar a célula das EAOs produzidas, interrompendo as cascatas de oxidação descontrolada (GRATÃO et al., 2005). Entre os principais mecanismos temos a síntese de compostos antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos, cujo aumento da atividade sob condição de déficit hídrico já foi demonstrado para diversas culturas como feijão (TURKAN et al., 2005), arroz (GUO et al., 2006), milho (KELLOS et al., 2008), entre outras.

O sistema de defesa antioxidante não enzimático inclui composto como ascorbato (AAs), glutationa (GSH), flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos, tocoferol e carotenóides. A oxidação de GSH pelas EAOs produz glutationa oxidada (GSSG) e o ascorbato é oxidado a monodehidroascorbato (MDHA) e dehidroascorbato (DHA). Em resposta ao estresse as plantas podem aumentar a atividade das enzimas envolvidas na biossíntese de GSH, ocasionado o aumento de sua concentração (NOCTOR et al., 2002). Assim, GSSG, MDHA e DHA podem ser reduzidos formando GSH e ascorbato através do ciclo ascorbato – glutationa. A habilidade de carotenóides na detoxificação de EAOs está relacionada à especificidade química destas moléculas uma vez que contém uma cadeia de resíduos isoprénicos envolvidos na captação de energia de moléculas excitadas e dissipação desta na forma de calor (MITTLER, 2002). Tocoferóis também apresentam esta propriedade conferida pela presença de duplas

ligações conjugadas no motivo benzeno de sua molécula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O mecanismo antioxidante enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutationa redutase (GR), guaiacol peroxidase (GPOX), catalase (CAT), entre outras, as quais serão discutidas em maiores detalhes nos próximos itens.

#### 2.6 Sistema antioxidante enzimático

#### 2.6.1 Superóxido dismutase (SOD)

Esta enzima faz parte de um grupo de metaloproteínas que catalisam a formação de  $H_2O_2$  a partir do radical superóxido  $(O_2^{-\bullet})$ . Até o presente momento, a SOD (EC 1.15.1.1) é a única enzima descrita cuja atividade controla a concentração de  $O_2^{-\bullet}$  e  $H_2O_2$ , substratos da reação de Haber-Weiss, desempenhando, portanto, papel central no mecanismo de defesa ao prevenir a formação do radical OH<sup>-</sup> (BOWLER et al., 1992). Este, juntamente com o  ${}^1O_2$ , apresenta alta reatividade, sendo bastante tóxico a célula (GRATÃO et al., 2005). Segundo Scandalios (2005) as SODs compreendem a primeira linha de defesa contra EAOs nas células. Sua reação geral pode ser observada abaixo:

$$O_2^{-\bullet} + O_2^{-\bullet} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} O_2 + H_2O_2$$

Três classes de SODs foram encontradas em plantas e classificadas de acordo com seu co-fator metálico: manganês (Mn), cobre/zinco (Cu/Zn) ou ferro (Fe) (ALSCHER et al., 2002). As Mn-SODs estão localizadas nas mitocôndrias e peroxissomos (DEL RIO et al., 2002), mas também foram encontradas nos cloroplastos de algumas plantas (HAYAKAWA et al., 1984). As Fe-SODs são encontradas em um número limitado de espécies vegetais e estão localizadas nos cloroplastos (FERREIRA et al., 2002; ALSCHER et al., 2002). As Cu/Zn-SODs são as mais abundantes em folhas verdes e são encontradas no citosol, nos cloroplastos e peroxissomos (DEL RIO et al., 2002). Na fração citosólica de uma bactéria do gênero *Streptomyces* foi identificada uma classe de SOD cujo metal cofator é o níquel (Ni) (MATÉS, 2000). Mn-

SOD e Fe-SOD possuem estrutura protéica semelhante, porém não estão relacionadas a Cu/Zn-SOD. Análises filogenéticas revelaram que Mn-SOD e Fe-SOD podem ter evoluído a partir de um ancestral comum, enquanto Cu/Zn-SOD evoluiu independentemente (CHEN; LIU, 1996).

Plantas contêm diversas isoformas da SOD, sugerindo a existência de diversos genes nucleares (SCANDALIOS, 2005). O transporte até seus locais de atuação é feito por meio de sequências amino terminais (BOWLER et al., 1992). A regulação dos genes que codificam para a enzima SOD é bastante sensível a variações ambientais, provavelmente, devido à alteração do potencial redox da célula. O aumento na atividade da SOD, ocasionado pelo déficit hídrico, já foi reportado em diversas espécies como arroz (REDDY et al., 2004), milho (JIANG; ZHANG, 2002), trigo (SHAO et al., 2005), entre outras. Plantas de arroz transformadas com um gene que codifica para a enzima Mn-SOD apresentaram aumento na tolerância ao estresse hídrico (WANG et al., 2005). Resultado semelhante foi obtido por Gupta et al. (1993) em plantas de tabaco superexpressando Cu/Zn-SOD expostas à baixa temperatura.

# 2.6.2 Catalase (CAT)

A CAT (EC 1.11.1.6) é uma enzima tetramérica Fe porfirina que catalisa a conversão do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, liberado durante a transformação do glicolato a glioxalato durante a fotorrespiração (IGAMBERDIEV; LEA, 2002) ou durante a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (HOLTMAN et al., 1994), em água e O<sub>2</sub>. Entretanto, a CAT tem uma baixa afinidade pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requerendo a ligação de duas moléculas dessa EAO para que a reação ocorra, assim, a CAT é provavelmente responsável pela remoção do excesso de EAO's durante o estresse (GRATÃO et al., 2005), além de proteger a SOD da inativação por altos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (FRIDOVICH, 1995). Em baixas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (< 1 µM) a CAT apresenta função peroxidativa, onde o Fe interage com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formando peróxido de Fe, este pode ser reduzido por doadores de hidrogênio (H), como o ácido ascórbico. Em elevadas concentrações a CAT possui função catalítica formando H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (SCANDALIOS, 2005). O esquema da reação pode ser observado a seguir:

$$RH_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CAT} R + 2H_2O$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O_2$$

A atividade da CAT mostrou ser bastante variável em plantas sob déficit hídrico. Zhang e Jiang (2002) verificaram um aumento na atividade desta enzima em plantas de milho sob déficit hídrico de -0,7 MPa. Em plantas de trigo também se verificou um aumento acentuado na atividade dessa enzima. Entretanto ocorreu redução após algum tempo de exposição à seca (BAISAK et al., 1994). Resultados semelhantes foram obtidos por Boo e Jung (1999) em plantas de arroz. Embora pouco se conheça sobre a atividade das enzimas antioxidantes em cana-de-açúcar sob estresse hídrico, é conhecido que sob atuação de outra fonte de estresse como o metal pesado cádmio (Cd) (FORNAZIER et al., 2002) ocorreu um decréscimo na atividade da CAT, nas doses mais elevadas do metal. Entretanto, outros trabalhos revelam aumento na atividade da CAT sob déficit hídrico em trigo e milho (NAYYA; GUPTA, 2006), arroz (REDDY et al., 2004). Estes dados ressaltam a complexidade da resposta do sistema antioxidante ao déficit hídrico e a importância da CAT neste processo.

#### 2.6.3 Ascorbato peroxidase (APX)

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

A APX reduz o  $H_2O_2$  à água utilizando o ascorbato como doador de elétrons. Neste processo, um intermediário de dois elétrons oxidados da APX é formado, este oxida o ascorbato produzindo duas moléculas de monodehidroascorbato sendo, então, reduzido novamente (ASADA, 1999).

Sofo et al. (2005) encontraram incremento na atividade da APX, especialmente sob estresse mais severo, em folhas de oliveira. Além da redução no potencial hídrico do solo, as plantas foram expostas a altas temperaturas e luminosidade. Os autores atribuem este aumento à isoforma cloroplastidial da enzima. Aumentos na atividade da APX sob déficit hídrico são relatados em outras espécies, como milho (JIANG; ZHANG, 2002) e soja (RIEKERT VAN HEERDEN; KRUGER, 2002), reforçando a importância desta enzima no controle do potencial redox da célula. Cloroplastos de tabaco superexpressando APX de *Galdieria partita* foram capazes de manter o fluxo de elétrons e sofreram menor dano fotoxidativo (MIYAKE et al., 2006).

#### 2.6.4 Guaiacol peroxidase (GPOX)

A GPOX (EC 1.11.1.7) participa de reações metabólicas como a decomposição de ácido indol acético (AIA), biossíntese de lignina e defesa contra patógenos (GRATÃO et al., 2005). O mecanismo de ação da GPOX é bastante semelhante ao da APX, porém a GPOX tem preferência por doadores de elétrons aromáticos como guaiacol e pirogalol (ASADA, 1999). Uma peroxidase capaz de oxidar o ascorbato e com sequência peptídica similar a da GPOX foi encontrada em *Camellia sinensis* (KVARATSKHELIA, 1997). Entretanto, a GPOX difere da APX na sequência de aminoácidos e nas funções fisiológicas (CHEN et al.,1992). Segundo Asada (1999) a principal função da GPOX não é atuar no controle das EAOs, mas produzir compostos oxidados com função fisiológica, todavia, como usam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como substrato, podem ser consideradas como antioxidantes.

Poucos trabalhos relatam a atividade da GPOX em plantas sob déficit hídrico, entretanto, incremento na atividade dessa enzima foi encontrado em plantas de *A. thaliana* sob estresse hídrico caracterizado por TRA de 65% (KUBO et al., 1999), trigo (NATHAWAT et al., 2007) e arroz (BASU et al., 2010). Entretanto, em alho foi verificada

redução na atividade sob aumento da radiação UV-B (EGERT; TEVINI, 2003). O mesmo foi encontrado em plantas de soja expostas ao Cd (NORIEGA et al., 2007). Entretanto Gomes-Junior et al. (2006) detectaram aumento na atividade da GPOX, em células de café expostas ao Ni, e Milone et al. (2003) em plantas de trigo com Cd.

## 2.6.5 Glutationa redutase (GR)

A GR (EC 1.6.4.2) é uma flavoproteína que catalisa a redução da GSSG em GSH, em um processo dependente de NADPH. Apesar de ser sintetizada no citoplasma pode ser direcionada tanto para cloroplastos quanto mitocôndrias (CREISSEN, 1997), onde pode atuar no combate as EAOs, mais especificamente o O<sub>2</sub><sup>-•</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em plantas superiores, enquanto a GR está envolvida na defesa contra o estresse oxidativo, a GSH desempenha vários papéis como a participação no ciclo ascorbato glutationa, manutenção dos grupos sulfidrilas de cisteínas na forma reduzida, estocagem de enxofre reduzido e substrato para a glutationa-S-transferase (GST) (GRATÃO et al., 2005), outra enzima antioxidante que catalisa a ligação da glutationa a uma ampla gama de substratos hidrofóbicos, eletrofílicos e citotóxicos (MARRS, 1996).

Aumento na atividade da GR foi verificado em diversas espécies sob redução na disponibilidade de água, como trigo (BAISAK et al., 1994), milho (ZHANG; JIANG, 2002) e arroz (BOO; JUNG, 1999). Sairam et al. (1997) ao analisarem genótipos de trigo com diferentes níveis de tolerância ao déficit hídrico verificaram que a atividade da GR aumentou em todos, todavia foi maior nos genótipos mais tolerantes. Torres-Franklin et al. (2008), em genótipos de feijão, encontraram que sob estresse hídrico moderado a isoforma citosólica da GR foi super-regulada enquanto a atividade das isoformas mitocôndriais e cloroplastidiais foi reduzida nos genótipos sensíveis. Já nos genótipos tolerantes a atividade das duas isoformas foi mantida estável. Fornazier et al. (2002) constataram que o aumento na atividade da GR foi o principal mecanismo de resposta em canas-de-açúcar tratadas com Cd, especialmente nas doses mais elevadas do metal.

# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1 Material vegetal

Foram utilizadas 20 variedades de cana-de-açúcar, pertencentes ao banco de germoplasma do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), com sede na cidade de Piracicaba/SP. As variedades utilizadas foram: CTC1, CTC2, CTC3, CTC4, CTC5, CTC6, CTC7, CTC8, CTC9, CTC10, CTC11, CTC12, CTC13, CTC14, CTC15, SP90-3414, SP90-1638, SP83-2847, SP83-5073 e CT94-3116. Os materiais pertencem a três gerações de variedades CTC e, juntamente com as variedades SP, compreendem variedades com diferentes épocas de colheita, teor de fibra, resistência/susceptibilidade as principais pragas e doenças da cultura e ambientes de produção, possibilitando a obtenção de uma amostra representativa das variedades comerciais de cana-de-açúcar disponíveis na atualidade.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada no CTC. Minitoletes de cada uma das 20 variedades foram plantados em vasos de 40 litros contendo substrato Plantmax (Eucatex<sup>®</sup>, Brasil). A adubação consistiu na aplicação de 320g de Basacote Plus 12M, 15-8-12(+2), incorporados ao substrato em pré-plantio. O Basacote é um fertilizante de liberação lenta e controlada, próprio para o uso em substratos. Durante os seis primeiros meses após o plantio, as plantas foram mantidas em condições de capacidade de campo, sendo os seguintes regimes hídricos aplicados:

Tratamento 1 = planta permanentemente irrigada

Tratamento 2 = supressão de rega por 3 dias (72 horas)

Tratamento 3 = supressão de rega por 10 dias (240 horas)

Tratamento 4 = supressão de rega por 20 dias (480 horas)

Após coletadas, as amostras de folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até o processamento das análises. Visando facilitar o manuseio e a maceração destas, cada uma foi macerada em moinho L2 (Fred Stein Laboratories), acondicionada em tubos Falcon de 50 mL e armazenada a -80 °C.

#### 3.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela estimativa do conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) seguindo o método de Heath e Packer (1968), com modificações. Assim, 300 mg de material vegetal foram macerados em 3 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), contendo aproximadamente 20% de polivinilpirrolidona (PVPP). Após a perfeita homogeneização o extrato foi centrifugado a 10.000 rpm, 15 °C por 5 minutos. A um volume de 250 µL do sobrenadante adicionouse 1 mL de solução contendo TCA 20% (p/v) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v). As amostras foram mantidas por 30 minutos a 95 °C e, em seguida, transferidas para banho de gelo. Após o completo resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 15 °C por 10 minutos, com o intuito de separar qualquer resíduo sólido formado durante o aquecimento e também clarear as amostras. As leituras foram realizadas, em triplicata, em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a 535 e 600 nm. A determinação do equivalente da concentração de malondialdeído (MDA) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 mM.cm<sup>1</sup>. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g MF.

### 3.3 Concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A determinação dos níveis de  $H_2O_2$  nas células foi realizada de acordo com metodologia descrita por Gay et al. (1999) e Hermes-lima et al. (1995), com modificações. O método baseia-se na oxidação do Fe<sup>+2</sup>, pelo  $H_2O_2$ , a Fe<sup>+3</sup> em pH ácido. Assim, 100 mg de material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino ao qual adicionou-se 3 mL de metanol a 0 °C. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 10.000 rpm, 4°C por 10 minutos. A um volume de 100 µL do sobrenadante foram adicionados 250 µL de sulfato ferroso amoniacal (Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) 1mM, 100 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 250 mM, 100 µL de xylenol orange 1mM e 450 µL de água destilada. As amostras foram incubadas no escuro por 24 horas e em seguida realizou-se as leituras, em triplicata, em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a 560 nm. Os resultados foram expressos em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g MF.

#### 3.4 Concentração de prolina

A determinação da concentração de prolina nas folhas foi realizada de acordo com Bates et al. (1973), com modificações. Assim, 300 mg de tecido vegetal foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, ao qual adicionou-se 3 mL de ácido sulfosalicílico 3% (p/v). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 6.000 rpm, 15 °C por 30 minutos. Foram coletados 2 mL do sobrenadante, aos quais acrescentaram-se 2 mL de ninidrina ácida (1,25 g de nihidrina; 30 ml de ácido acético glacial; 20 ml de ácido fosfórico 6M) e 2 mL de ácido acético glacial. As amostras foram incubadas a 100 °C por 1 hora e, em seguida, transferidas para o banho de gelo. Após o completo resfriamento das amostras, foram realizadas as leituras, em triplicata, em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a 520 nm. Os resultados foram expressos em μmol de prolina/g de massa fresca (MF).

### 3.5 Extração protéica

Aproximadamente 3g de material vegetal foram macerados em nitrogênio líquido, juntamente com 20% de PVPP, até a obtenção de um pó fino ao qual se adicionou 6 mL de tampão fosfato de potássio 100mM, pH 7,5, contendo 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 3 mM de ditiotreitol (DTT) (AZEVEDO et al., 1998). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000g, 4 °C por 30 minutos e o sobrenadante estocado em alíquotas separadas, a -80 °C para posterior quantificação de proteínas e as análises de SOD, CAT, APX, GPOX e GR.

### 3.5.1 Quantificação de proteínas

A concentração das proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (*Bovine Serum Albumin*) como padrão. Foi utilizado o espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40. O resultado da quantificação se deu em mg/mL.

#### 3.5.2 Perfil protéico em SDS-PAGE

A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza um agente dissociante, dodecil sulfato de sódio (SDS), para desnaturá-las em subunidades. Os tampões de eletroforese e os géis foram preparados conforme descrito por Laemmli (1970). As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% utilizando o sistema Mini Protean II (Bio-Rad). Para confecção do gel de resolução foram utilizados 2,5 mL de acrilamida 40% (Sigma), 2,5 mL de tampão Tris-HCI 3 M, pH 8,9, 100 μL de SDS 10%, 19 μL de TEMED, 25 μL de persulfato de amônio 1% e 5 mL de água destilada. Na confecção do gel de empacotamento foram usados 500 µL de acrilamida 40%, 1,25 mL tampão Tris-HCl 500 mM, pH 6,7, 50 µL de SDS 10%, 10 µL de TEMED, 50 µL de persulfato de amônio 1% e 2,75 mL de água destilada. O tampão de amostra para SDS-PAGE foi preparado adicionando-se 3 mL de água destilada, 1 mL de tampão Tris-HCI 500 mM, pH6,7, 1,6 mL de SDS (10%), 400 µL de solução 0,5 % azul de bromofenol e 400  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. As amostras foram preparadas adicionando-se tampão para SDS-PAGE, na proporção 1:1 (amostra/tampão), e incubadas a 100 °C durante 5 minutos. Foram aplicados 6 µg de proteína por canaleta. O tampão de eletrodo era composto por SDS 1%, Tris 25 mM, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina - 5X concentrado, sendo diluído para 1X. A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente em corrente constante de 15 mA/placa.

#### 3.5.2.1 Coloração com prata para SDS-PAGE

Após a eletroforese o gel foi incubado por aproximadamente 12 horas em solução fixadora contendo 40 % de etanol absoluto e 10 % de ácido acético. O gel foi então transferido para 50 mL de solução contendo acetato de sódio 0,5 M, etanol 30 %, tiossulfato de sódio 20 mM e 260  $\mu$ L de gluteraldeído 25 %, por 15 minutos. Em seguida foram realizadas três lavagens, de 15 minutos cada, em água destilada e adicionou-se 50 mL de solução contendo nitrato de prata 6 mM e 10  $\mu$ L de formaldeído 37 %. O gel permaneceu nesta solução por 15 minutos e, em seguida, foi incubado em 50 mL de solução reveladora contendo carbonato de sódio 0,25 M e 5  $\mu$ L de formaldeído 37 %,

até aparecerem as bandas. Visando parar a reação foi adicionada uma solução contendo EDTA 50 mM. Os géis foram documentados no Image Scanner – Amersham Biosciences.

#### 3.5.3 Análise da SOD em PAGE

A atividade da SOD em PAGE foi determinada através de eletroforese em gel (12 %) conforme descrito por Beauchamp e Fridovich (1971) e modificado por Azevedo et al. (1998), utilizando o sistema Mini Protean II (Bio-Rad). O gel apresentava espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura 7,3 cm. Para confecção do gel de resolução foram utilizados 3 mL de uma solução 40 % de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão Tris-HCI 3M, pH 8,9, 19 μL de TEMED, 25 μL de persulfato de amônio 1 % e 4,5 mL de água destilada. O gel de empacotamento foi preparado utilizando-se 500 μL de acrilamida, 1,25 mL tampão Tris-HCI 500 mM, pH 6,7, 10 μL de TEMED, 50 μL de persulfato de amônio 1 % e 2,75 mL de água destilada. A eletroforese foi realizada a 4°C, em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de eletrodo era composto por Tris 25 mM, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina - 5X concentrado, sendo diluído para 1X e reutilizado até 3 vezes. Em cada gel foi aplicado 10 μL do padrão de SOD (Sigma) e 20 μg de proteína dos extratos de cana-de-açúcar.

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

#### 3.5.3.1 Caracterização das isoformas da SOD

A caracterização das isoformas de SOD foi realizada em PAGE. Os géis foram confeccionados da mesma forma descrita no item 3.5.3 Foram utilizados 100  $\mu$ g de proteína do extrato de cana-de-açúcar e 10  $\mu$ L do padrão da SOD. Ao final da eletroforese, o gel foi dividido verticalmente em três partes, as quais foram distribuídas em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8; tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 contendo 2mM de KCN e 1,27 mM de EDTA; tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8 contendo 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 1,27 mM de EDTA. Todos os passos descritos foram realizados no escuro. Após 20 minutos, os géis foram submetidos a revelação com NBT e riboflavina, como citado anteriormente no item 3.5.3. Ao final da revelação, foi analisada a presença ou ausência de bandas no controle, e nos tratamentos com KCN e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As isoformas foram então classificadas como Mn-SOD, Fe-SOD ou Cu/Zn-SOD. Mn-SOD é resistente a ambos os inibidores (KCN e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Fe-SOD é resistente ao KCN e inibida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Cu/Zn-SOD é inibida por ambas as substâncias (AZEVEDO et al., 1998).

## 3.5.4 Atividade da CAT

A atividade da CAT foi determinada por método descrito por Kraus et al. (1995) com modificações segundo Azevedo et al. (1998). A atividade da CAT foi determinada em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a 25°C em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 e 25  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 25  $\mu$ L de extrato protéico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 60 segundos, através das alterações na absorbância a 240 nm, em espectrofotômetro Milton Roy - Genesys 5. Os resultados foram expressos em  $\mu$ mol/minuto/mg de proteína.

#### 3.5.5 Atividade da APX

A atividade da APX foi determinada conforme descrito por Gomes-Junior et al. (2007), com modificações. O meio de reação era composto por 690  $\mu$ L de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,5, 100  $\mu$ L de ascorbato 5 mM, 100  $\mu$ L de EDTA 1 mM, 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM e 10  $\mu$ L do extrato protéico. A atividade da APX foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a 30 °C, durante 60 segundos, em espectrofotômetro Milton Roy - Genesys 5. Os valores foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

### 3.5.6 Atividade da GPOX

A atividade da GPOX foi determinada segundo Gomes-Junior et al. (2007). O meio de reação continha 847,5  $\mu$ L de tampão fosfato citrato (0,2 M de fosfato de sódio dibásico: 0,1 M de ácido cítrico), pH 5,0, 2,5  $\mu$ L do extrato protéico, 50  $\mu$ L de guaicol 0,5 % (v/v) e 50  $\mu$ L de solução 0,1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após completa homogeneização a reação foi incubada a 30 °C por 15 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em banho de gelo, seguido pela adição de metabisulfito de sódio 2 % (p/v). Após 10 minutos, a atividade da GPOX foi determinada pela leitura da absorbância a 450 nm, em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40. Os valores foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

#### 3.5.7 Atividade da GR

A atividade da GR foi determinada como descrito por Gomes-Junior et al. (2006) com modificações. O meio de reação consistiu de uma solução composta por 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, contendo 1 mM de 2-ácido nitrobenzóico (DTNB), 1 mM de glutationa oxidada (GSSG) e 0,1 mM NADPH, a 30 °C. A reação foi iniciada pela adição de 80 μL de extrato protéico. A atividade da GR foi estimada pela redução de GSSG, acompanhada por monitoramento na alteração da absorbância a

412 nm, por 60 segundos, em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40. Os valores de atividade foram expressos em μmol/minuto/mg de proteína.

## 3.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com três repetições, sendo que cada repetição consistiu de um clone da variedade. Os tratamentos utilizados foram dispostos no esquema fatorial 20 x 4, para variedades e regimes hídricos. Devido à elevada quantidade de plantas a serem manipuladas o estabelecimento dos regimes hídricos e as coletas diferiu em sete dias para cada bloco. A análise estatística foi realizada utilizando-se o software SAS (Statistical Analysis System).

### **4 RESULTADOS**

## 4.1 Peroxidação lipídica

Incrementos no conteúdo de MDA (nmol/g MF) foram encontrados, com exceção de CTC10, CTC15, SP83-2847 e SP83-5073, para as variedades aos 10 dias de restrição na disponibilidade de água (Tabela 4.1.1). Aos 20 dias de déficit hídrico CTC3, CTC5, CTC7, CTC9, CTC12, CT94-3116, SP90-1638 aumentaram a concentração de MDA, em relação ao tratamento de 10 dias de restrição hídrica, assim como CTC10, CTC15, SP83-2847 e SP83-5073. Sob déficit hídrico elevado todas as variedades aumentaram a concentração de MDA, em relação ao tratamento de MDA, em relação ao controle.

Tabela 4.1.1 – Peroxidação lipídica, expressa através do conteúdo de MDA (nmol/g MF), para 20 variedades de cana-de-açúcar após 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Médias seguidas pela mesma letra, dentro da coluna, não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (continua)

	Dias após a supressão da rega			
Variedades	Controle	3	10	20
CTC1	5,17 b	7,54 ab	8,13 ab	10,62 a
CTC2	6,96 b	7,17 b	9,13 a	9,77 a
CTC3	4,35 c	5,91 bc	9,67 ab	12,46 a
CTC4	4,75 b	4,75 b	7,29 a	8,89 a
CTC5	4,27 c	4,56 c	6,99 b	10,45 a
CTC6	6,31 b	6,92 b	9,75 a	11,22 a
CTC7	4,32 c	4,70 c	11,03 b	14,19 a
CTC8	5,79 b	5,36 b	8,36 a	7,61 a
CTC9	5,09 c	5,93 c	9,36 b	14,91 a
CTC10	8,62 b	9,08 b	8,71 b	12,78 a
CTC11	7,29 b	8,74 ab	12,59 a	12,85 a
CTC12	4,75 c	4,47 c	9,23 b	12,19 a
CTC13	6,66 b	8,39 ab	9,48 ab	12,74 a
CTC14	4,14 b	4,28 b	8,29 a	10,33 a
CTC15	5,24 b	6,13 b	6,99 b	11,23 a
SP90-3414	4,50 b	5,88 b	9,83 a	11,85 a
Tabela 4.1.1 – Peroxidação lipídica, expressa através do conteúdo de MDA (nmol/g MF), para 20 variedades de cana-de-açúcar após 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Médias seguidas pela mesma letra, dentro da coluna, não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

				(conclusão)
	Dias após a supressão da rega			
Variedades	Controle	3	10	20
SP83-2847	5,59 b	6,11 b	7,64 b	10,56 a
SP83-5073	6,20 b	6,32 b	7,13 b	10,44 a
CT94-3116	8,12 c	9,67 bc	11,19 ab	12,62 a
SP90-1638	4,89 c	4,69 c	12,49 b	13,76 a

### 4.2 Conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

As variedades CTC4 e CTC6 não demonstraram alteração no conteúdo de  $H_2O_2$  (µmol/g MF) para os tratamentos impostos (Tabela 4.2.1). Aos 3 dias de restrição na disponibilidade de água apenas CTC2 e CTC5 aumentaram a concentração de  $H_2O_2$  no tecido foliar. Estas não alteraram o conteúdo de  $H_2O_2$  aos 10 dias de seca, entretanto, CTC9, CT94-3116, SP90-3414 e SP90-1638 apresentaram aumento significativo para esta condição hídrica. Aos 20 dias de restrição hídrica, com exceção de SP90-3414, as demais variedades demonstram incremento na concentração de  $H_2O_2$ , em relação a 10 dias.

Tabela 4.2.1 – Conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μmol/g MF) para 20 variedades de cana-de-açúcar após 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Médias seguidas pela mesma letra, dentro da coluna, não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

				(continua)
	Dias após a supressão da rega			
Variedades	Controle	3	10	20
CTC1	2,53 b	2,60 b	2,51 b	3,39 a
CTC2	2,29 c	3,03 b	3,45 b	4,15 a
CTC3	2,46 b	3,05 b	2,96 b	7,85 a
CTC4	3,16 a	2,85 a	2,99 a	3,55 a
CTC5	2,83 c	4,14 b	4,26 b	6,56 a
CTC6	2,83 a	2,89 a	2,90 a	3,64 a
CTC7	4.29 b	4.12 b	5.54 b	8.30 a

				(conclusao)	
		D	ias após a supress	após a supressão da rega	
Variedades	Controle	3	10	20	-
CTC8	2,89 b	2,69 b	2,65 b	5,73 a	
CTC9	3.13 c	3.26 c	4.75 b	7.68 a	
CTC10	2,14 b	2,43 b	2,40 b	7,02 a	
CTC11	3,70 b	3,79 b	3,67 b	5,32 a	
CTC12	1,52 b	1,62 b	1,79 b	4,13 a	
CTC13	2,61 b	2,61 b	2,76 b	7,94 a	
CTC14	4,03 b	4,06 b	4,46 b	8,29 a	
CTC15	3,01 b	2,59 b	2,52 b	6,19 a	
SP90-3414	2,49 c	2,86 bc	4,06 ab	5,22 a	
SP83-2847	2,98 b	3,26 b	3,85 b	7,88 a	
SP83-5073	1,97 b	2,17 b	2,23 b	4,96 a	
CT94-3116	1,57 c	1,97 c	3,85 b	7,10 a	
SP90-1638	2,68 c	2,80 bc	3,16 b	9,87 a	

Tabela 4.2.1 – Conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (μmol/g MF) para 20 variedades de cana-de-açúcar após 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Médias seguidas pela mesma letra, dentro da coluna, não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (conclusão)

#### 4.3 Conteúdo de prolina

Todas as variedades sofreram aumento na concentração de prolina (80 a 95%) aos 10 dias de restrição na disponibilidade de água (Tabela 4.3.1). Redução no conteúdo de prolina, em relação a 10 dias de seca, foram encontradas em CTC1, CTC5, CTC6, CTC8, SP90-3414 e SP83-2847, 20 dias após a supressão da rega. Enquanto incrementos foram detectados em CTC4, CTC7, CTC9, CTC10, CTC15, SP83-5073 e CT94-3116. As demais variedades não demonstraram diferença em relação ao tratamento de 10 dias de déficit hídrico.

	Dias após a supressão da rega			
Variedades	Controle	3	10	20
CTC1	0,44 c	0,33 c	3,18 a	2,10 b
CTC2	0,36 b	0,34 b	2,29 a	1,66 a
CTC3	0,27 b	0, 95 b	3.45 a	3,46 a
CTC4	0,26 c	0,43 c	1,64 b	2,85 a
CTC5	0,29 c	0,50 c	2,74 a	2,12 b
CTC6	0,32 c	0,29 c	2,82 a	2,35 b
CTC7	0,28 c	0,31 c	2,23 b	3,09 a
CTC8	0,37 c	0,26 c	2,85 a	1,63 b
CTC9	0,20 c	0,29 c	2,32 b	2,93 a
CTC10	0,35 c	0,46 c	1,89 b	3,18 a
CTC11	0,45 b	0,93 b	3,87 a	4,60 a
CTC12	0,33 b	0,34 b	3,34 a	3,15 a
CTC13	0,56 b	0,64 b	3,02 a	3,49 a
CTC14	0,21 b	0,24 b	1,88 a	2,63 a
CTC15	0,33 c	0,41 c	1,90 b	3,34 a
SP90-3414	0,23 c	0,25 c	3,66 a	2,35 b
SP83-2847	0,27 c	0,28 c	2,57 a	2,19 b
SP83-5073	0,25 c	0,23 c	1,48 b	2,47 a
CT94-3116	0,51 c	0,66 c	2,40 b	2,97 a
SP90-1638	0,36 b	0,43 b	3,22 a	2,76 a

Tabela 4.3.1 – Conteúdo de prolina (μmol/g MF) para 20 variedades de cana-de-açúcar após 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Médias seguidas pela mesma letra, dentro da coluna, não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

### 4.4 Perfil proteíco em SDS-PAGE

Na análise em gel (Figuras 4.4.1 a 4.4.10), foram observadas mudanças no perfil protéico em relação ao controle. Tais diferenças estão relacionadas a alterações de intensidade e ausência/presença de bandas entre os tratamentos. Nas variedades CTC5, CTC8, CTC10, CTC12, CTC13, SP90-3414 e SP83-2847 ocorreu o desaparecimento de uma banda acima de 220 kDa (banda I), 20 dias após a supressão da rega. Com exceção de CTC9, CTC10, CTC13, CTC13, CTC14 e CTC15, pode-se observar a

ausência de uma banda de aproximadamente 220 kDa (banda II), aos 10 e/ou 20 dias de déficit hídrico. Para as variedades CTC1, CTC4, CTC5, CTC7, CTC8, CTC10, CTC11, CTC12, SP90-3414 e SP83-5073 também se observou a ausência de uma banda de cerca de 150 kDa (banda III). Uma banda de aproximadamente 100 kDa (banda IV) desapareceu em CTC3, CTC4, CTC5, CTC7, CTC10 e CTC11 aos 3 dias de déficit hídrico, enquanto para CTC12, SP83-2847 e SP90-1638, isto ocorreu aos 20 dias. Surpreendentemente, para SP90-1638 a mesma banda apareceu aos 3 e 10 dias de deficiência hídrica e desapareceu aos 20 dias. Em CTC3 ainda foi possível verificar o desaparecimento de uma banda com cerca de 60 kDa. Apenas CTC1 e CTC13 revelaram o aparecimento de uma banda de 80 e 60 kDa, respectivamente, 10 dias após a supressão da rega.



Figura 4.4.1 - Análise do perfil protéico em SDS-PAGE para as variedades CTC1 (A) e CTC2 (B). As setas indicam a presença/ausência de banda em relação ao controle (C), 3, 10 e 20 dias após a supressão da rega. Padrão (P) BSA



Figura 4.4.2 - Análise do perfil protéico em SDS-PAGE para as variedades CTC3 (A) e CTC4 (B). As setas indicam a presença/ausência de banda em relação ao controle (C), 3, 10 e 20 dias após a supressão da rega. Padrão (P) BSA



Figura 4.4.3 - Análise do perfil protéico em SDS-PAGE para as variedades CTC5 (A) e CTC6 (B). As setas indicam a presença/ausência de banda em relação ao controle (C),3, 10 e 20 dias após a supressão da rega. Padrão (P) BSA



Figura 4.4.4 - Análise do perfil protéico em SDS-PAGE para as variedades CTC7 (A) e CTC8 (B). As setas indicam a presença/ausência de banda em relação ao controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) BSA



Figura 4.4.5 - Análise do perfil protéico em SDS-PAGE para as variedades CTC9 (A) e CTC10 (B). As setas indicam a presença/ausência de banda em relação ao controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) BSA



Figura 4.4.6 - Análise do perfil protéico em SDS-PAGE para as variedades CTC11 (A) e CTC12 (B). As setas indicam a presença/ausência de banda em relação ao controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) BSA



Figura 4.4.7 - Análise do perfil protéico em SDS-PAGE para as variedades CTC13 (A) e CTC14 (B). A seta indica a presença de banda em relação ao controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) BSA



Figura 4.4.8 - Análise do perfil protéico em SDS-PAGE para as variedades CTC15 (A) e SP90-3414 (B). As setas indicam a presença/ausência de banda em relação ao controle (C) aos 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) BSA



Figura 4.4.9 - Análise do perfil protéico em SDS-PAGE para as variedades SP83-2847 (A) e SP83-5073 (B). As setas indicam a presença/ausência de banda em relação ao controle (C), 3, 10 e 20 dias de estresse hídrico. Padrão (P) BSA



Figura 4.4.10 - Análise do perfil protéico em SDS-PAGE para as variedades CT94-3116 (A) e SP90-1638 (B). As setas indicam a presença/ausência de banda em relação ao controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) BSA

#### 4.5 Atividade da SOD

A atividade da SOD foi determinada pelo método de PAGE, o que dificulta a comparação entre variedades e tratamentos. Embora a comparação, entre tratamentos, em função da intensidade das bandas seja um caráter subjetivo, é claramente visível que CTC1 aumentou a atividade aos 3 dias, enquanto as variedades CTC4, CTC5, CTC7, CTC8, CTC9, CTC10, CTC11, CTC12, CTC13, CTC14, CTC15, SP90-3414, SP83-2847, SP83-5073 e SP90-1638 aumentaram a atividade da SOD aos 10 dias de déficit hídrico (Figuras 4.5.1 a 4.5.10). CTC1, CTC3, CTC4, CTC7, CTC15, SP83-2847 e SP83-5073 demonstraram incremento aos 20 dias, enquanto CTC2, CTC5, CTC8, CTC9, CTC10, CTC11, CTC13, SP90-3414, CT94-3116 e SP90-1638 reduziram a atividade. CTC6 manteve elevados os níveis de atividade da SOD durante todo o experimento. O padrão de isoenzimas variou entre as variedades analisadas. CTC1, CTC11 e SP83-5073; CTC4, CTC5, CTC7, CTC14 e SP83-2847; CTC8 e CTC10;

CTC13 e CTC15; CT94-3116 e SP90-1638; CTC2; CTC3; CTC6; CTC9; CTC12 e SP90-3414 demonstram padrões distintos.

Na caracterização das isoenzimas foi selecionada somente uma variedade entre as que apresentavam o mesmo padrão (Figura 4.5.11). Entretanto, como CTC4, CTC5, CTC7, CTC14 e SP83-2847 diferiram em apenas uma banda de CTC1, CTC11 e SP83-2847 estas foram caracterizadas em um mesmo gel. As bandas I e II correspondem à Mn-SOD (resistente a presença de KCN e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a qual é encontrada nas mitocôndrias. A banda III foi caracterizada como Fe-SOD (resistente a KCN e inativada na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), presente nos cloroplastos, para CTC3, CTC8, CTC9, CTC10 e SP90-3414, enquanto para as demais variedades a mesma foi classificada como Cu/Zn (inativada por KCN e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) encontrada no citoplasma e nos cloroplastos. Com exceção de CTC3, as mesmas apresentaram uma terceira banda classificada como Mn-SOD. Essa diferença na caracterização pode estar relacionada à atividade da enzima para cada variedade e ao método utilizado, sugerindo que a quantidade dos reagentes utilizados pode não ter sido suficiente para inativar a enzima. As demais bandas, independente da variedade, correspondem a Cu/Zn-SOD.

Após 20 dias de supressão da rega, pode-se observar em CTC9, CTC10, CTC11 e CTC14 a ausência da banda I (Mn-SOD). Em CTC13, CTC15 e SP90-3414 pode-se notar a falta da isoforma V (Cu/Zn-SOD), enquanto em CTC5 desapareceu a banda IV (Cu/Zn-SOD). CTC9 ainda demonstra a ausência das isoformas II (Mn-SOD) e IV.



Figura 4.5.1 - Análise da atividade da SOD em PAGE para as variedades CTC1 (A) e CTC2 (B). As setas indicam as diferentes isoenzimas encontradas no controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) SOD bovino



Figura 4.5.2 - Análise da atividade da SOD em PAGE para as variedades CTC3 (A) e CTC4 (B). As setas indicam as diferentes isoenzimas encontradas no controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) SOD bovino



Figura 4.5.3 - Análise da atividade da SOD em PAGE para as variedades CTC5 (A) e CTC6 (B). As setas indicam as diferentes isoenzimas encontradas no controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) SOD bovino



Figura 4.5.4 - Análise da atividade da SOD em PAGE para as variedades CTC7 (A) e CTC8 (B). As setas indicam as diferentes isoenzimas encontradas no controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) SOD bovino



Figura 4.5.5 - Análise da atividade da SOD em PAGE para as variedades CTC9 (A) e CTC10 (B). As setas indicam as diferentes isoenzimas encontradas no controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) SOD bovino



Figura 4.5.6 - Análise da atividade da SOD em PAGE para as variedades CTC11 (A) e CTC12 (B). As setas indicam as diferentes isoenzimas encontradas no controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) SOD bovino



Figura 4.5.7 - Análise da atividade da SOD em PAGE para as variedades CTC13 (A) e CTC14 (B). As setas indicam as diferentes isoenzimas encontradas no controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) SOD bovino



Figura 4.5.8 - Análise da atividade da SOD em PAGE para as variedades CTC15 (A) e SP90-3414 (B). As setas indicam as diferentes isoenzimas encontradas no controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) SOD bovino



Figura 4.5.9 - Análise da atividade da SOD em PAGE para as variedades SP83-2847 (A) e SP83-5073 (B). As setas indicam as diferentes isoenzimas encontradas no controle (C), 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) SOD bovino



Figura 4.5.10 - Análise da atividade da SOD em PAGE para as variedades CT94-3116 (A) e SP90-1638 (B). As setas indicam as diferentes isoenzimas encontradas no controle (C), aos 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Padrão (P) SOD bovino













Figura 4.5.11 - Caracterização das isoenzimas da SOD.SP83-5073 (A); CTC8 (B); CTC15 (C); SP90-1638 (D); CTC2 (E); CTC3 (F); CTC6 (G); CTC9 (H); CTC12 (I); SP90-3414 (J). Padrão (P) SOD bovino. KCN 2mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5mM

### 4.6 Atividade da CAT

Aos 3 dias de restrição na disponibilidade de água, apenas CTC3 aumentou a atividade da enzima (Tabela 4.6.1). Aos 10 dias de seca CTC2, CTC8, CTC12, CTC13, CTC14, CTC15, SP90-3414 e CT94-3116 apresentaram incremento na atividade da CAT. Redução a níveis próximos ao das plantas controle ocorreu em CTC2 e CTC8 aos 20 dias de restrição na disponibilidade de água. CTC1, CTC4, CTC5, CTC7, CTC10, CTC15 e SP90-3414 demonstraram incremento na atividade desta enzima para o regime hídrico considerado. CTC6, CTC9, CTC11, SP83-2847, SP83-5073 e SP90-1638, embora diferenças numéricas tenham sido verificadas, não demonstraram

diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey para todos os tratamentos a que foram submetidas.

Tabela 4.6.1 – Atividade da CAT (µmol/minuto/mg de proteína) para 20 variedades de cana-de-açúcar após 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Médias seguidas pela mesma letra, dentro da coluna, não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

			~ 1	
		Dias após a supre	essão da rega	
Variedades	Controle	3	10	20
CTC1	32,20 b	27,14 b	51,98 b	118,29 a
CTC2	29,36 b	35,86 b	50,30 a	33,33 b
CTC3	28,93 b	44,60 a	56,46 a	47,29 a
CTC4	30,89 b	34,22 b	70,28 ab	91,84 a
CTC5	38,95 b	43,71 b	54,89 b	80,69 a
CTC6	25,54 a	32,33 a	39,23 a	39,77 a
CTC7	39,67 b	40,21 b	49,67 b	94,51 a
CTC8	43,92 b	51,94 b	78,29 a	59,56 ab
CTC9	19,51 a	25,17 a	48,49 a	65,95 a
CTC10	24,28 b	25,20 b	37,63 b	69,55 a
CTC11	28,96 a	26,70 a	39,49 a	50,91 a
CTC12	36,34 b	39,30 b	56,70 a	55,28 a
CTC13	22,46 b	26,04 b	56,75 a	57,75 a
CTC14	34,25 c	37,98 bc	54,34 ab	59,38 a
CTC15	47,40 c	58,80 bc	57,01 b	82,07 a
SP90-3414	31,96 c	34,31 c	66,44 b	79,72 a
SP83-2847	35,68 a	62,43 a	63,41 a	48,35 a
SP83-5073	27,20 a	23,26 a	28,82 a	31,00 a
CT94-3116	28,73 b	22,44 b	60,35 a	55,36 a
SP90-1638	39,82 a	36,83 a	57,46 a	35,41 a

## 4.7 Atividade da APX

Aos 3 dias de restrição na disponibilidade hídrica apenas CTC11 aumentou a atividade da APX, em relação ao controle (Tabela 4.7.1). Incremento na atividade desta enzima ocorreu aos 10 dias para CTC1, CTC5, CTC7, CTC9, CTC11, SP83-2847 e

SP90-1638. As variedades CTC1, CTC3, CTC4, CTC6, CTC7, CTC12, CTC15 e SP83-5073 demonstraram elevação após 20 dias supressão da rega. Entretanto redução na atividade da APX foi encontrada para CTC5, CTC8, CTC9, CTC10, CTC11, CTC13 e SP90-3414 para o mesmo tratamento. CTC2, CTC14 e CT94-3116 não demonstraram diferença significativa para os tratamentos a que foram submetidos, enquanto SP83-2847 e SP90-1638 não apresentaram variação entre 10 e 20 dias.

	Dias após a supressão da rega			
Variedades	Controle	3	10	20
CTC1	692,03 c	639,02 c	999,46 b	1725,55 a
CTC2	1083,1 a	1163,4 a	1168,4 a	1297,5 a
CTC3	668,92 b	854,02 ab	857,79 ab	1096,04 a
CTC4	685,32 b	666,19 b	887,77 ab	1087,38 a
CTC5	813,3 b	816,3 b	1557,4 a	727,3 b
CTC6	692,67 b	732,76 b	864,20 b	1159,46 a
CTC7	777,6 c	824,8 bc	1220,8 b	2273,3 a
CTC8	791,48 ab	827,91 ab	1000,49 a	740,72 b
CTC9	708,64 b	821,01 b	1009,46 a	511,58 c
CTC10	835,94 a	835,11 a	965,79 a	641,94 b
CTC11	740,55 c	1087,98 b	2081,29 a	642,74 c
CTC12	551,2 b	623,3 b	957,1 ab	1397,0 a
CTC13	938,1 ab	953,1 ab	1254,6 a	531,2 b
CTC14	766,46 a	795,77 a	957,02 a	861.56 a
CTC15	856,69 b	943,12 b	1105,39 b	1610,15 a
SP90-3414	1092,32 ab	1152,19 ab	1214,24 a	788,44 b
SP83-2847	584,3 b	867,1 ab	1279,2 a	1239,8 a
SP83-5073	978,32 b	711,69 b	782,41 b	1568,25 a
CT94-3116	690,7 a	858,2 a	1173,9 a	1150,4 a
SP90-1638	764,5 b	750,7 b	1318,7 a	1543,8 a

Tabela 4.7.1 – Atividade da APX (nmol/min/mg de proteína) para 20 variedades de cana-de-açúcar após 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Médias seguidas pela mesma letra, dentro da coluna, não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

### 4.8 Atividade da GPOX

Aos 3 dias de restrição hídrica apenas CT94-3116 aumentou a atividade da GPOX (Tabela 4.8.1). Aos 10 dias incremento na atividade desta enzima ocorreu para a maioria das variedades estudadas. Apenas CTC1, CTC9, SP90-3414, SP83-5073 e SP90-1638 não demonstram aumento para este regime hídrico. Para CTC2, CTC5, CTC10, CTC11, CTC13, CTC14, SP83-2847 e CT94-3116 não foi verificada alteração, na atividade, entre 10 e 20 dias de estresse hídrico. Apenas CTC3 sofreu redução aos 20 dias. SP90-1638 não apresentou variação na atividade da GPOX para nenhum dos tratamentos a que foi submetida. As demais variedades demonstraram incremento na atividade da enzima sob maior estresse hídrico.

	Dias após a supressão da rega			
Variedades	Controle	3	10	20
CTC1	63,91 b	73,79 b	104,17 b	494,68 a
CTC2	61,48 b	64,62 b	142,01 a	218,26 a
CTC3	47,76 c	55,58 bc	176,9 a	93,55 b
CTC4	45,43 c	65,01 bc	87,58 ab	129,42 a
CTC5	60,39 b	61,69 b	158,81 a	188,24 a
CTC6	34,94 c	30,48 c	57,61 b	104,88 a
CTC7	58,32 b	64,72 b	63,2 b	171,72 a
CTC8	40,99 c	32,56 c	88,93 b	147,62 a
CTC9	45,52 b	37,35 b	76,36 b	269,11 a
CTC10	24,63 b	23,85 b	36,86 a	38,75 a
CTC11	40,44 b	41,34 b	70,23 a	86,13 a
CTC12	55,52 c	57,87 c	103,95 b	244,66 a
CTC13	53,96 b	61,7 b	167,80 a	192,98 a
CTC14	57,59 b	48,26 b	90,09 a	77,83 a
CTC15	77,31 c	74,66 c	165,08 b	209,71 a
SP90-3414	63,59 b	49,04 b	77,37 b	181,06 a
SP83-2847	45,53 b	51,59 b	89,92 a	114,01 a
SP83-5073	33,54 b	26,16 b	30,43 b	208,28 a
CT94-3116	35,52 b	88,13 a	116,74 a	88,38 a
SP90-1638	103,03 a	129,03 a	178,46 a	162,21 a

Tabela 4.8.1 – Atividade da GPOX (nmol/min/mg de proteína) para 20 variedades de cana-de-açúcar após 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Médias seguidas pela mesma letra, dentro da coluna, não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

### 4.9 Atividade da GR

Aumento na atividade da GR só foi verificado aos 10 dias de restrição hídrica para as variedades CTC5, CTC11, CTC13 e SP90-1638 (Tabela 4.9.1). Destas, apenas CTC5 apresentou acréscimo aos 20 dias de redução na disponibilidade de água, enquanto CTC11 demonstrou tendência de queda, em comparação com o tratamento de 10 dias de estresse hídrico. SP83-2847 não demonstrou incremento para nenhum

dos tratamentos. As demais variedades aumentaram a atividade aos 20 dias de estresse hídrico.

_		Dias após a sup	oressão da rega	
Variedades	Controle	3	10	20
CTC1	1,67 b	1,69 b	2,73 b	7,24 a
CTC2	1,51 b	1,87 ab	1,80 ab	3,69 a
CTC3	1,10 b	1,29 b	1,27 b	3,70 a
CTC4	0,87 b	0,78 b	0,67 b	1,86 a
CTC5	1,42 c	1,62 bc	2,59 b	5,75 a
CTC6	1.70 b	1.56 b	2.81 ab	3.82 a
CTC7	2,19 b	2,26 b	2,61 b	5,41 a
CTC8	2,83 b	2,71 b	3,42 b	6,64 a
CTC9	1,34 b	1,18 b	2,02 b	21,13 a
CTC10	1,49 b	1,47 b	2,11 b	4,52 a
CTC11	1,39 b	1,48 b	3,95 a	2,86 ab
CTC12	1,00 b	1,09 b	1,60 b	2,78 a
CTC13	1,65 b	1,58 b	5,30 a	6,73 a
CTC14	1,40 b	1,29 b	1,86 b	4,83 a
CTC15	1,81 b	2,78 b	2,54 b	7,73 a
SP90-3414	2,34 b	2,46 b	2,50 b	7.21 a
SP83-2847	0,88 a	1,01 a	1,51 a	1,50 a
SP83-5073	1,51 b	1,74 b	1,53 b	7,23 a
SP94-3116	1,68 b	1,97 b	2,59 b	4,94 a

1,16 b

5,19 a

5,53 a

SP90-1638

1,30 b

Tabela 4.9.1 – Atividade da GR (μmol/min./mg de proteína) para 20 variedades de cana-de-açúcar após 3, 10 e 20 dias de supressão da rega. Médias seguidas pela mesma letra, dentro da coluna, não apresentam diferença pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

## 5 DISCUSSÃO

O déficit hídrico provoca uma série de alterações bioquímicas, especialmente, no sistema de defesa antioxidante, além do acúmulo de solutos compatíveis, mudanças na composição de lipídios nas membranas ou mesmo a peroxidação destes (GRATÃO et al., 2005). Entretanto, é importante destacar que as alterações observadas, assim como a adaptação das plantas a condições adversas, estão fortemente associadas à duração e intensidade do estresse (BEHERA et al., 2003), a espécie (GHANNOUM, 2009) e genótipo analisado (GIMENEZ et al, 1992; ABRAHAM et al., 2004).

Para facilitar a análise e compreensão dos resultados, a discussão encontra-se separada de acordo com os períodos de déficit hídrico impostos às variedades de canade-açúcar estudadas. Entretanto, é importante destacar que, embora, vários parâmetros fisiológicos tenham sido analisados, para cada regime hídrico imposto, estes não foram apresentados por se tratarem de dados relativos à outra dissertação.

A peroxidação lipídica é utilizada como um dos principais indicadores da ocorrência de estresse oxidativo, uma vez que as EAOs reagem com ácidos graxos insaturados e causam a peroxidação de lipídios nas membranas (GRATÃO et al., 2005). Para manter as EAOs sob níveis basais, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidante. Entretanto, sob déficit hídrico de curta duração, não foi encontrada variação no conteúdo de MDA, para todas as variedades estudadas, sugerindo que o estresse imposto não foi suficiente para causar danos às membranas. Nas variedades CTC1, CTC3, CTC11 e CT94-3116 houve incremento da atividade da SOD, CAT, APX e GPOX, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Nayyar e Gupta (2006) e Wang (2009), evidenciando que o aumento na atividade dessas enzimas pode ter contribuído para manter o potencial redox e evitar danos à célula. CTC5 e CTC2 sofreram incremento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que sugere um possível papel sinalizador desta EAO na ativação de enzimas, expressão gênica e no fechamento estomático (NEILL et al., 2002), sob condições de estresse leve, uma vez que não foi detectada alteração no conteúdo de MDA. As concentrações endógenas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reportadas, em uma ampla gama de espécies, são bastante variáveis, de nanomols a centenas de µmol/g MF (VELJOVIC-JOVANOVIC et al., 2002), o que

dificulta o estabelecimento de níveis tóxicos. Assim, é importante destacar que o  $H_2O_2$  por ser uma molécula mais estável e apresentar menor reatividade em comparação com outras EAOs (GRATÃO et al., 2005) pode não ter atingido, nestes materiais, concentração suficiente para causar dano.

A análise do perfil protéico em gel SDS-PAGE revelou que para as variedades CTC3, CTC4, CTC5, CTC7, CTC10 e CTC11 ocorreu o desaparecimento de uma banda de, aproximadamente, 100 kDa (banda IV), 3 dias após a supressão da rega. A alteração no padrão de proteínas sugere que os processos de síntese ou proteólise já são alterados sob curtos períodos de restrição na disponibilidade de água. Estes resultados estão de acordo com dados reportados em outras espécies como algodão (PARIDA et al., 2007) e milho (RICCARDI et al., 1998). Entretanto, não será possível realizar constatações sem que seja feito o seqüenciamento dessas bandas. Assim, seria recomendada a análise dessas variedades através da técnica de separação de proteínas por eletroforese 2D, em futuros trabalhos de continuidade, desta forma identificando e caracterizando o papel fisiológico dessa banda no metabolismo celular e sua relação com o estresse.

Os resultados indicam que para a grande maioria das variedades, 3 dias de déficit hídrico não causaram alterações bioquímicos significativas e eventuais danos poderiam ser revertidos pelo retorno da irrigação. Plantas de arroz sob déficit hídrico leve sofreram alteração em 42 proteínas, entretanto, estas foram restabelecidas após a irrigação (SALEKDH et al., 2002). Em trigo, Wu et al. (1999) verificaram que a atividade de Mn-SOD decresce após a reidratação atingindo níveis próximos ao das plantas controle. Hernandez e Almansa (2002) também encontraram redução na atividade da SOD e nos níveis de MDA, em plantas de ervilha expostas a estresse salino de curta duração, 24 horas após a reidratação.

Com exceção das variedades CTC10, CTC15, SP83-2847 e SP83-5073, o conteúdo de MDA aumentou, aos 10 dias de restrição na disponibilidade de água. Estes resultados indicam que o aumento no período de exposição ao déficit hídrico induziu estresse oxidativo, para a maioria das variedades estudadas. Fan et al. (2009) estabeleceram que as estratégias de adaptação das plantas a seca podem ser divididas em três fases. No período inicial de exposição à seca, as plantas fecham seus

estômatos para evitar a perda de água e não ocorrem alterações nos níveis de MDA. Á medida que o déficit hídrico aumenta, as plantas elevam os níveis das EAOs, a atividade enzimática e a peroxidação lipídica. Os danos as membranas intracelulares podem afetar a cadeia respiratória em mitocôndrias, causar a quebra de pigmentos, além de reduzir a habilidade de fixação do C nos cloroplastos, enquanto danos a membrana plasmática estão relacionados à liberação de conteúdo eletrolítico e a morte celular (SCANDALIOS, 1993). Entretanto, o aumento na peroxidação lipídica variou em função dos materiais analisados, assim como a resposta do sistema de defesa antioxidante, 10 dias após a imposição do déficit hídrico.

Com exceção de CTC1, CTC2, CTC3, CTC6, SP90-3414, CT94-3116 e SP83-5073, as variedades aumentaram a atividade da SOD, todavia CTC6 demonstra ter mantido uma atividade alta já no controle. Embora o número de isoformas da SOD tenha variado em função dos materiais analisados, a maioria das isoformas encontradas corresponde a Cu/Zn-SOD localizada no citoplasma, nos cloroplastos e peroxissomos (DEL RIO et al., 2002). Eyidogan et al. (2003) trabalhando com plântulas de trigo sob estresse salino demonstraram que Cu/Zn-SOD é responsável por 90% da atividade total da SOD. O cloroplasto é o principal sítio de produção das EAOs uma vez que a cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese ocorre em um meio rico em O<sub>2</sub> onde, inevitavelmente, elétrons são doados para o O<sub>2</sub> (EDREVA et al., 2005). O maior número de isoenzimas encontrado nestes locais pode estar relacionado a esta característica. Plantas transgênicas de batata, super-expressando Cu/Zn-SOD apresentaram maior tolerância aos efeitos da aplicação do herbicida paraquat (PERL et al., 1993). Resultados semelhantes foram observados em plantas transgênicas de tabaco super-expressando Cu/Zn-SOD (GUPTA et al., 1993).

Aos 10 dias de restrição na disponibilidade de água, as variedades CTC3, CTC7, CTC9, CTC12, CTC14, SP90-3414 e SP90-1638 foram as que apresentaram maior incremento na concentração de MDA, entre 50 e 60%. Destas, apenas CTC9, SP90-3414 e SP90-1638 aumentaram o conteúdo de  $H_2O_2$ , em relação ao controle, demonstrando que o aumento na atividade da CAT (SP90-341), APX (CTC9 e SP90-1638) e GR (SP90-1638) não foi suficiente para controlar os níveis desta EAO, nestas variedades. O  $H_2O_2$ , juntamente com o  $O_2^-$ , é substrato da reação de Haber-Weiss, na

qual é gerado o radical OH<sup>-</sup>, extremamente tóxico a célula (SCANDALIOS, 2005). Embora CTC9 e SP90-1638 tenham apresentado incremento na atividade da SOD, para este regime hídrico, este pode não ter sido suficiente para conter os níveis de  $O_2^-$ , o que poderia ocasionar o incremento da peroxidação lipídica. Com exceção de CTC3, as demais variedades também aumentaram a atividade da SOD. O incremento na atividade da CAT (CTC14 e CTC12), APX (CTC7) e GPOX (CTC3, CTC12 e CTC14) foi suficiente para manter os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, porém não controlou o aumento na concentração de MDA.

As variedades CTC5 e CTC11, com exceção da CAT, aumentaram a atividade das enzimas, após 10 dias de supressão da irrigação. Este incremento foi suficiente para conter a elevação nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, entretanto, o conteúdo de MDA aumentou, em cerca de 40%, em relação ao controle. Yong et al. (2006) analisando diferentes genótipos de Radix astragali verificaram que os genótipos com maior aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e peroxidase (POD), em resposta ao déficit hídrico, sofreram maior sensibilidade. A atividade da APX e SOD também foi maior para a cultivar sensível a seca, em trigo (SGHERRI et al., 2000). Loggini et al. (1999) ao compararem cultivares de trigo com diferentes níveis de tolerância ao déficit hídrico constataram que a adaptação a seca depende de diferentes mecanismos incluindo a capacidade de aumentar a atividade do sistema antioxidante enzimático e não enzimático. Entretanto, esta característica parece variar em função dos genótipos estudados. Os autores verificaram que na cultivar tolerante a manutenção da atividade das enzimas antioxidantes analisadas foi suficiente para manter o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a peroxidação lipídica em níveis basais. Em trigo, genótipos com maior flutuação nos níveis de MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiveram maior atividade da CAT, indicando que estes materiais sofreram maior estresse oxidativo (SIMOVA-STOILOVA et al., 2009).

As variedades que não demonstraram variação na concentração de MDA tiveram comportamento distinto. Enquanto CTC15 e SP83-2847 aumentaram a atividade da SOD e GPOX, CAT (CTC15) ou APX (SP83-2847), SP83-5073 não alterou a atividade das enzimas, enquanto CTC10 só aumentou a atividade da GPOX, em aproximadamente 30%. Embora o aumento na atividade destas enzimas possa ter sido suficiente para conter o incremento das EAOs, outras enzimas ou mesmo compostos

antioxidantes não enzimáticos podem estar atuando. A manutenção de baixos níveis de peroxidação lipídica em folhas de trigo, sob déficit hídrico, foi relacionada com o aumento na concentração de  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno por Bartoli et al. (1999). Plantas de tabaco super-expressando o gene *VTE1* que codifica para a enzima tocoferol ciclase, a qual atua na síntese de  $\alpha$ -tocoferol, demonstraram aumento na tolerância ao déficit hídrico (LIU et al., 2008). Os carotenóides são componentes essenciais das membranas dos tilacóides e atuam reduzindo o estado excitado da clorofila e/ou O<sub>2</sub><sup>-</sup>, enquanto o  $\alpha$ -tocoferol atua na estabilização de membranas e controle das EAOs (SCANDALIOS, 1993). Nogueira et al. (2003) encontraram em cana-de-açúcar, sob estresse por baixa temperatura, aumento na expressão de um transcrito, que codifica uma proteína que participa da síntese de flavonóides. Shao et al. (2005) estabelecem que há um nível mínimo de redução no potencial hídrico do solo que desencadeia as alterações bioquímicas que caracterizam o estresse, assim diferentes mecanismos adaptativos são ativados.

As demais variedades variaram o conteúdo de MDA entre 25 e 35% e também apresentaram alta variabilidade na resposta do sistema antioxidante. Enquanto CTC8 e CTC13 aumentaram a atividade da maioria das enzimas. CTC2 e CT94-3116, além da atividade da CAT, aumentaram a atividade da GPOX, assim como CTC4 e CTC6. CTC1 demonstrou incremento apenas na atividade da APX, cerca de 30%. É interessante notar que para CTC2 e CTC5 o aumento na atividade de diferentes enzimas foi suficiente para controlar os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em relação a 3 dias de déficit hídrico, entretanto CTC5 demonstrou maior peroxidação lipídica. Segundo Lascano et al. (2001) a complexidade do sistema de resposta antioxidante a seca está relacionada a interação entre diversos fatores ambientais como intensidade luminosa e temperatura. Shao et al. (2006) ao analisarem 10 genótipos de trigo sob estresse hídrico verificaram que estes dispõem de diferentes mecanismos adaptativos para regular seu estado redox. Essa variabilidade está relacionada à presença de diferentes alelos entre as cultivares. A cana-de-açúcar é uma espécie poliplóide com alta fregüência de aneuploidia (GRIVET; ARRUDA, 2002). Sairam et al. (2001) encontraram diferença na resposta a seca em função do nível de ploidia em trigo.

A concentração do aminoácido prolina aumentou aos 10 dias de estresse hídrico, entre 80 e 95%, para todas as variedades estudadas. A correlação entre o incremento de prolina livre e variações nos níveis de estresse hídrico têm sido relatada em diversas espécies como batata (SCHAFLEITNER et al., 2006), trigo (NAYYA; WALIA, 2003), milho (EFEOGLU et al., 2009), entre outras, sendo a maior quantidade encontrada em plantas submetidas a maiores déficits hídricos, sendo esta, uma das razões pela qual o acúmulo de prolina é relacionado à tolerância à seca. Nos estudos de genótipos de cana-de-açúcar em diferentes níveis de disponibilidade hídrica do solo, as informações são bastante variáveis, enquanto alguns trabalhos demonstram consideráveis incrementos na quantidade deste osmólito, sob baixos níveis de água no solo (RÍNCONES 1997; BIDOIA et al., 2006), outros relatam pequenos acúmulos de prolina, somente após 30 dias de exposição ao estresse mais severo (QUEIROZ, 2006). Assim, o acúmulo de prolina também parece variar em função dos materiais estudados.

Ainda existe controvérsia se o acúmulo de prolina é uma conseqüência do estresse ou proporciona benefícios às plantas sob condições adversas (ASHRAF; FOOLAD, 2007). Não foi encontrada diferença para o acúmulo de prolina entre as variedades o que sugere que o acúmulo de prolina não é um parâmetro adequado para diferenciar entre genótipos. Entretanto, a prolina pode ter atuado na estabilização de membranas e/ou proteínas (HOEKSTRA et al., 2001), e ainda no controle de EAOs (OZDEN et al., 2008).

A variedade CTC1 revelou o aparecimento de uma banda de aproximadamente 80 kDa (banda V), aos 10 dias de restrição hídrica. Para SP90-1638 uma banda de, aproximadamente, 100 kDa (banda IV) apareceu aos 3 e 10 dias de deficiência hídrica e desapareceu aos 20 dias. Diversos trabalhos relacionam o acúmulo de proteínas da família das dehidrinas, que variam de 9 a 200 kDa, em diversas espécies de plantas, sob restrição na disponibilidade de água. (WOOD; GOLDSBROUGH, 1997; ARORA et al., 1998). Dehidrinas são classificadas como um grupo de proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), cujo acúmulo está relacionado à imposição de vários tipos de estresse como seca, salinidade e temperatura (WAHID; CLOSE, 2007). Embora existam controvérsias, acredita-se que estas proteínas possam atuar na proteção de membranas. Em plantas de tomate, sob déficit hídrico, foi verificado o acúmulo de uma proteína de 65 kDa no núcleo e cloroplasto (TABAEIZADEH et al., 1995), a qual atuaria sob a estrutura da cromatina. A subunidade maior da rubisco possui tamanho de, aproximadamente, 60 kDa e seu incremento foi encontrado em variedades de trigo, independente da tolerância/sensibilidade a seca (DEMIREVSKA et al., 2008). Em CTC13 foi encontrada uma banda com cerca de 60 kDa (banda VI), aos 20 dias de supressão da rega, enquanto para CTC4 uma banda com tamanho semelhante desapareceu. Entretanto, o fato de a maioria das variedades ter demonstrado o desaparecimento de bandas, sugere que o processo de proteólise pode ser intensificado, enquanto a síntese pode ser diminuída (SODEK, 2004), com a redução na disponibilidade de água as plantas

Após 20 dias de supressão da irrigação, as variedades CTC3, CTC5, CTC7, CTC9, CTC12 e SP90-1638 demonstraram o maior acúmulo de MDA, acima de 60%, em relação ao controle. CTC14 e SP90-3414, embora não tenham apresentado diferença estatística, em relação a 10 dias de déficit hídrico, também tiveram aumento na concentração de MDA, em magnitude semelhante. Todas estas variedades aumentaram o conteúdo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para este regime hídrico. É interessante notar que estas variedades sofreram queda na atividade de pelo menos uma das enzimas analisadas. SOD e APX foram as mais afetadas.

As variedades CTC2, CTC5, CTC8, CTC9, CTC10, CTC11, CTC13, CTC14, SP90-3414 e SP90-1638 demonstraram decréscimo na atividade da SOD. A redução na atividade da SOD pode estar relacionada a alteração da síntese e acúmulo de enzimas menos ativas (BASU et al., 2010). Zaefyzadeh et al. (2009) encontraram redução na atividade da SOD, em genótipos de trigo sensíveis a seca, enquanto nos genótipos tolerantes a atividade da enzima não foi alterada ou aumentou. Resultados semelhantes foram reportados por Guo et al. (2006) em plantas de arroz, sob ação do herbicida paraquat, com consequente aumento na peroxidação lipídica, para o genótipo sensívei. Em arroz também foi encontrada redução na atividade da SOD e APX em genótipos sensíveis ao estresse salino (MORADI; ISMAIL, 2007). A SOD é a primeira enzima na linha de resposta ao estresse oxidativo. A análise da atividade em gel permite que as diferentes isoenzimas sejam analisadas e as variações totais de atividade de SOD possam ser melhor comparadas. Isso é muito importante justamente

65

pelo fato das diferentes SODs estarem localizadas em compartimentos celulares diferentes, podendo desta forma, correlacionar uma eventual alteração de atividade com uma isoenzima, em especial, e com a organela na qual atua. É possível observar em CTC9, CTC10, CTC11 e CTC14 a ausência da isoenzima I (Mn-SOD), em SP90-3414 a falta da isoforma V (Cu/Zn-SOD), enquanto em CTC5 desapareceu a isoenzima IV (Cu/Zn-SOD). CTC9 ainda demonstra a ausência das isoformas II (Mn-SOD) e IV. Sairam et al. (2005) ao analisarem genótipos de trigo com níveis distintos de tolerância a salinidade encontraram redução na atividade de Cu/Zn-SOD e Mn-SOD para o genótipo mais sensível, a qual foi acompanhada de aumento na peroxidação lipídica. A manutenção ou incremento na atividade de Mn-SOD também é relacionada à maior tolerância em arroz (PAN et al., 2006).

A atividade da APX caiu para CTC5, CTC8, CTC9, CTC10, CTC11, CTC13 e SP90-3414, enquanto CTC14 e SP90-1638, não variaram a atividade entre 10 e 20 dias. Plantas transgênicas de A. thaliana contendo o gene que codifica para APX na posição anti-sense demonstram redução na tolerância ao estresse oxidativo pela ação do herbicida paraquat (TARANTINO et al., 2005). O decréscimo na atividade da APX foi acompanhado de redução no fluxo de elétrons entre os fotossistemas em tabaco (MIYAKE et al., 2006). A redução na atividade da APX está relacionada à diminuição da capacidade de regenerar o ascorbato pelas enzimas monodehidroascorbato redutase (MDHAR) e dehidroascorbato redutase (DHAR) (PIGNOCCHI et al., 2003). CTC2, CTC8 e SP90-1638 apresentaram tendência de queda na atividade da CAT, entretanto, esta última não variou a atividade das demais enzimas entre 10 e 20 dias de déficit hídrico. A redução na atividade da CAT pode ser correlacionada a redução da síntese de novas enzimas ou fotoinativação (BASU et al., 2010). CTC3 e CTC14 demonstram tendência de queda na atividade da GPOX. Durante a fase de aclimatação ao estresse, as plantas tentam estabelecer um novo estado de equilíbrio, porém, se este não é encontrado pode ocorrer a degradação do sistema, reduzindo a habilidade das células em controlar as EAOs (TAUSZ et al., 2004). Fan et al. (2009) consideram esta a terceira fase de aclimatação ao estresse, guando ocorre o colapso do sistema antioxidante.

Surpreendentemente, a queda na atividade de uma ou mais enzimas foi acompanhada de altos incrementos na atividade de outra enzima, com exceção de

CTC11 e SP90-1638. Azevedo-Neto et al. (2009) relatam considerável aumento na atividade da CAT em amendoim sob déficit hídrico nos genótipos mais sensíveis, enquanto a atividade da APX não varia. Como a CAT está localizada principalmente nos peroxissomos, o aumento na atividade da CAT pode ser um indício da fotorrespiração (WILLEKENS et al., 1997). Em trigo, a atividade da APX e GR atingiu níveis bastante elevados, enquanto a atividade da CAT e SOD caiu (FAN et al., 2009). Segundo Bowler et al. (1991), o equilíbrio na atividade da CAT, SOD, APX é essencial para determinar o nível fixo de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ . Assim, mecanismos compensatórios são induzidos se o balanço das enzimas de defesa for modificado. O desequilíbrio do sistema antioxidante indica que estas variedades não foram capazes de se adaptar a nova condição ambiental imposta, sofrendo maior dano oxidativo, sugerindo maior sensibilidade ao estresse hídrico.

As variedades CTC7 e CTC12, embora tenham demonstrado alta peroxidação lipídica e aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 dias após a imposição do estresse, elevaram a atividade de CAT, APX, GPOX e GR. CTC7 aumentou a atividade da SOD, porém CTC12 não alterou a atividade da enzima, entre 10 e 20 dias. Estes resultados indicam que o aumento na atividade das enzimas antioxidantes não foi suficiente para controlar as EAOs e resultou em aumento na peroxidação lipídica. A variedade CTC1 apresentou desempenho análogo, com incremento na atividade de todas as enzimas. Entretanto, o incremento na concentração de MDA foi ligeiramente menor, cerca de 50%, assim como o acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Já CTC13, a qual reduziu a atividade de SOD e APX, teve maior aumento nos níveis desta EAO, para um mesmo incremento na peroxidação lipídica. Estes dados evidenciam que diferentes variedades têm comportamentos distintos quando expostas a um mesmo estresse. Malencic et al., 2008, ao analisarem 20 genótipos de sorgo, sob estresse hídrico, verificaram que embora a peroxidação lipídica tenha aumentado, com a imposição da seca, diferentes sistemas antioxidantes foram ativados.

As variedades CTC2, CTC8, CTC10, CTC11, embora tenham sofrido redução na atividade de SOD, APX ou CAT e aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não alteraram drasticamente o conteúdo de MDA, em comparação com as variedades que demonstraram comportamento semelhante. Isto pode estar relacionado ao fato de que

no ensaio de quantificação utilizando o TBA, outros compostos além do MDA podem reagir com o ácido em função de variações como pH, presença de ferro, alto teor de açucares (BARYLA et al., 2000). CT94-3116, também apresentou baixo incremento na peroxidação lipídica, porém o aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi de aproximadamente 80%. Esta variedade também reduziu a atividade da SOD aos 20 dias de estresse hídrico. Estas variedades já apresentam maior MDA no controle, em comparação com as demais. Todavia, não se pode descartar a hipótese de que outros compostos ou enzimas estariam atuando na proteção celular contra os danos oxidativos, como já discutido anteriormente.

As variedades CTC4 e CTC6, não aumentaram a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao longo de todo o experimento. Estas também não demonstraram acréscimo no conteúdo de MDA entre 10 e 20 dias de seca. Juntamente com CTC15, SP83-2847 e SP83-507 apresentaram níveis intermediários de incremento na concentração de MDA, comparados aos demais materiais. Isto parece estar relacionado à manutenção do equilíbrio do sistema de defesa antioxidante (TAUSZ et al., 2004). BASU et al. (2010), analisando cultivares de arroz com diferentes níveis de tolerância a seca, verificaram que a cultivar tolerante foi capaz de manter a atividade da SOD e CAT, enquanto na cultivar sensível, a atividade destas decresceu.

CTC15 e CTC4 aumentaram a atividade de todas as enzimas estudadas, em amplitudes próximas para cada enzima, embora a banda V (Cu/Zn-SOD) tenha desaparecido em CTC15. CTC6 e SP83-5073, não demonstram variação na atividade da CAT. Embora, não seja perceptível aumento na atividade da SOD, para este regime hídrico, esta parece ter sido mantida em níveis elevados ao longo de todo o experimento para CTC6. Alto nível constitutivo na atividade da atividade da SOD pode estar relacionado à maior tolerância ao dano oxidativo em plantas (BOWLER et al., 1992). SP83-2847 não variou a atividade de CAT e GR, ao longo do experimento, enquanto APX e GPOX não sofreram alteração entre 10 e 20 dias de estresse. Entretanto, SP83-2847 e SP83-5073 aumentaram a atividade da SOD. Segundo Martinez et al. (2001) o aumento na atividade da SOD pode ser correlacionado com a proteção do PSII. Aqui, como já discutido anteriormente, pode não ter havido necessidade de aumentar a atividade das demais enzimas ou outros compostos e/ou

enzimas podem estar atuando. A ativação do ciclo da xantofila tem sido reportada, em várias espécies, como um mecanismo de tolerância a seca (SHAO et al., 2009). Até mesmo prolina pode ter contribuído para controlar o dano oxidativo.

Surpreendentemente, o conteúdo de prolina, para o regime hídrico de 20 dias de seca, apresentou decréscimo nas variedades CTC1, CTC5, CTC6, CTC8, SP90-3414 e SP83-2847, em comparação com o tratamento de 10 dias de seca. Geralmente, parte dos estudos realizados em plantas, sob condições de deficiência hídrica, evidenciam que o acúmulo deste aminoácido aumenta gradativamente, conforme o tempo de imposição ao estresse, embora, também seja verificada em outros trabalhos, tendências de estabilização e/ou decréscimo deste osmólito nos tecidos foliares de artemísia (*Tanacetum parthenium* L.) e de algumas cultivares de trigo (SAIRAM; DUBE 1984, FUMIS; PEDRAS, 2002; CARVALHO et al., 2003). Entretanto, a queda ou aumento no conteúdo de prolina não parece estar relacionada à maior sensibilidade/tolerância a seca.

Diferenças varietais no acúmulo de prolina foram verificadas em calos de canade-açúcar das variedades RB72-454 e SP81-3250, respectivamente, sensível e tolerante à seca em condições de campo (BRITO et al., 2008), cultivados sob concentrações de PEG correspondentes aos potenciais osmóticos de 0, -0,3, -0,6, -0,9 e -1,2 MPa, por 120 horas. Os autores observaram tendência de diminuição na concentração do aminoácido prolina para a variedade SP81-3250 (tolerante), enquanto a variedade sensível, RB72-454, apresentou forte elevação nos níveis de prolina, nos potenciais hídricos mais elevados. Rincones (1997), analisando oito variedades de cana de açúcar, verificou que duas delas (V 71-39 e Ragnar), apresentaram redução na concentração de prolina para os menores potenciais de água no solo. Destas, apenas a variedade Ragnar foi classificada como sensível à seca. Resultados semelhantes foram obtidos por Brinholi et al. (1980), Rao e Asokan (1978) para cana-de-açúcar. Estes dados reforçam que a prolina não é um bom indicador de tolerância/sensibilidade à seca em cana-de-açúcar.

Finalmente, é importante salientar que vários parâmetros bem conhecidos e utilizados de análise foram empregados nesse estudo. Imaginar que um determinado parâmetro pudesse claramente identificar ou estar associado a todos os materiais seria, naturalmente, muito improvável. Como já mencionado, mesmo para uma única espécie, as naturais variações entre os genótipos que são submetidos a condições hídricas variáveis geram respostas distintas. Assim, para cada variedade e em cada momento, pode-se tentar relacionar determinados padrões de resposta que indiquem particularidades da variedade e do tratamento mais especificamente.

# **6 CONCLUSÕES**

 1 – A resposta do sistema de defesa antioxidante ao estresse hídrico variou em função das variedades analisadas, das enzimas avaliadas e do período de déficit hídrico imposto;

2 – O déficit hídrico aumentou a peroxidação lipídica e os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para a maioria das variedades estudadas. A alteração nestes parâmetros foi maior para o tratamento de 20 dias de supressão da rega, caracterizando a ocorrência de estresse oxidativo, nestas variedades;

3 – Sob déficit hídrico moderado, a maioria das variedades foi capaz de induzir a atividade das enzimas antioxidantes. Entretanto, à medida que o déficit hídrico torna-se mais severo pode ocorrer o colapso do sistema de defesa antioxidante, sendo a SOD e APX as enzimas mais afetadas.
## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E.; RIGO, G.; SZEKELY, G.; NAGY, R.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Light dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, Netherlands, v. 51, n. 3, p. 363-372, 2003.

ABRAHAM, E.M.; HUANG, B.; BONOS, S.A.; MEYER, W.A. Evaluation of drought resistance for Texas Bluegrass, Kentucky Bluegrass, and their hybrids. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 5, p. 1746-1753, 2004.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ANGELOPOULOS, K.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C. Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 301, p. 1093-1100, 1996.

ANGELOVA, M. B.; PASHOVA, S. B.; SLOKOSKA, L. S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus nidulans* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 9, p.544-549, 2000.

ARAUS, J. L., SLAFER, G. A., REYNOLDS, M. P.; ROYO, C. Plant breeding and drought in C-3 cereals: what should we breed for? **Annals of Botany**, Oxford, v.89, n. 7, p. 925–940, 2002.

ARORA, R.; PITCHAY, D. S.; BEARCE, B. C. Water-stress-induced heat tolerance in geranium leaf tissues: a possible linkage through stress proteins? **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 103, n. 1, p. 24-34, 1998.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of reactive oxygens and dissipation of excess photons, **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.

AUDE, M.I.S. Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 23, n. 2, p. 241-248, 1993.

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

BAISAK, R.; RANA, D.; ACHARYA, P.B.B.; KAR, M. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subject to water stress. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 35, n. 3, p. 489-495, 1994.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v. 24, n. 1, p. 23-58, Feb. 2005.

BARTOLI, C.G.; SIMONTACCHI, M.; TAMBUSSI, E.; BELTRANO, J.; MONTALDI, E.; PUNTARULO, S. Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 332, p. 375-383, 1999.

BARYLA, A.; LABORDE, C.; MONTILLET, J.L.; TRIANTAPHYLIDES, C.; CHAGVARDIEFF, P. Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plants exposed to copper. **Environmental Pollution**, London, v. 109, n. 1, p. 131-135, 2000.

BASU, S.; ROYCHOUDHURY, A.; SAHA, P.P.; SENGUPTA, D.N. Differential oxidative responses of indica rice cultivars to drought stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 60, n.1, p.51-59, 2010.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and soil**, The Hague, v. 39, n. 1, p. 205-207, 1973.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVIC, I. Superoxide dismutase – Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 44, n. 1, p. 276-282, 1971.

BEHERA, R.K.; CHOUDHURY, N.K. High irradiance-induced changes in carotenoid composition and increase in non-photochemical quenching of Chl a fluorescence in

primary wheat leaves. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, n. 10, p. 1141-1146, 2003.

BIDOIA, M.A.P.; SANTOS, D.M.M.; MARIN, A.; LANDELL, M.G.A.; BANZATTO, D.A.; CAZETTA, J.O. Efeito da deficiência hídrica no acúmulo de prolina livre em cana-deaçúcar, em diferentes períodos de desenvolvimento. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 24, n. 5, p. 6-9, 2006.

BOO, Y.C. Water deficit induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, n. 2, p. 255-261, 1999.

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

BOWLER, C.; SLOOTEN, L.; VANDENBRANDEN, S.; DERYCKE, R.; BOTTERMAN, J.; SYBESMA, C.; VANMONTAGU, M., INZÉ, D. Manganese superoxide-dismutase can reduce cellular-damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 10, n. 7, 1723-1732, 1991.

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**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-259, 1976.

BRINHOLI, O.; BRASIL, O.G.; DALBEN, L.C. Estudo comparativo entre os teores de prolina das folhas e a resistência a seca de algumas variedades de cana de açúcar (*Sacharum* spp). **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 382-385, 1980.

BRITO, L.K.F.L.; SILVEIRA, J.A.G.; FERREIRA DE LIMA, L.L.; TIMÓTEO, A.R.S.; CHAGAS, R.M.; MACEDO, C.E.C. Alterações no perfil de frações nitrogenadas em calos de cana-de-açúcar induzidas por déficit hídrico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 6, p. 683-690, 2008.

CARVALHO, L.M. de, CASALI, V.W.D.; SOUZA, M.A. de; CECON, P.R. Disponibilidade de água no solo e crescimento de artemísia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 726-730, 2003.

CHAOUI, A.; MAZHOUDI, S.; GHORBAL, M.H.; FERJANI, E.L. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidants enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Clare, v. 127, n. 2, p. 139-147, 1997.

CHEN, G.X.; SANO, S.; ASADA, K. The amino acid sequence of ascorbate peroxidase from tea has high degree of homology to that of cytochrome c peroxidase from yeast. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 33, n. 2, p. 109-116, 1992.

CHEN, H.Y.; LIU, W.Y. The molecular evolution of superoxide dismutase based on its distribution and structure. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, Beijing, v. 23, n. 5, p. 408-413, 1996.

CLAUSSEN, W. Proline as a measure of stress in tomato plants. **Plant Science**, Clare, v. 168, n. 1, p. 241-248, 2005.

CREISSEN, G.P.; EDWARDS, E.A.; MULLINEAUX, P.M. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: MULLINEAX, P.M. (Ed.). **Causes of photoxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 343-364.

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

DEL RIO, L.A.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GOMEZ, M.; BARROSO, J.B. Reactive oxigen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1255-1272, 2002.

DEMIREVSKA, K.; SIMOVA-STOILOVA, L.; VASSILEVA, V.; FELLER, U. Rubisco and some chaperone protein responses to water stress and rewatering at early seedling growth of drought sensitive and tolerant wheat varieties. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 56, n. 2, p. 97-106, 2008.

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

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 119-133, 2005.

EFEOGLU, B.; EKMEKÇI, Y.; ÇIÇEK, N. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 75, n. 1, p. 34-42, 2009.

EGERT, M.; TEVINI, M. Influence of ultraviolet-B radiation on peroxidase activity of Allium schoenoprasum leaves. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, n. 2, p. 265-267, 2003.

EYIDOGAN, F.I.; OKTEM, H.A.; YUCEL, M. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 25, n. 3, p. 263-269, 2003.

FAN, X.W.; LI, F.M.; SONG, L.; XIONG, Y.C.; AN, L.Z.; JIA, Y.; FANG, X.W. Defense strategy of old and modern spring wheat varieties during soil drying. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 136, n. 3, p. 310-323, 2009.

FERREIRA, R.R.; FORNAZIER, R.F.; VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 327-342, 2002.

FORNAZIER, R.F.; FERREIRA, R.R.; VITORIA, A.P.; MOLINA, S.M.G.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugarcane. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 45, n. 1, p. 91-97, 2002.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 27, p. 97-112, 1995.

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

GAY, C.; COLLINS, J.; GEBICKI, J.M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 273, n. 2, p. 149-155, 1999.

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 635-644, 2009.

GIMENEZ, C.; MITCHELL, V.J.; LAWLOR, D.W. Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. **Plant Physiology**, New York, v. 98, n. 2, p. 516-524, 1992.

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

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

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 5, n. 2, p. 122-127, 2002.

GUO, Z.; OU, W.; LU, S.; ZHONG, Q. Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 11, p. 828-836, 2006.

GUPTA, A.S.; HEINEN, J.L.; HOLADAY, A.S.; BURKE, J.J.; ALLEN, R.D. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 4, p. 1629–1633, 1993.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 57, n. 5, p. 715-725, 1993.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press, 1999. 704 p.

HARE, P.D.; CRESS, W.A. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 79-102, 1997.

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

HAYAKAWA, T.; KANEMATSU, S.; ASADA, K. Occurrence of Cu-Zn-superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach-chloroplasts, **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 25, n. 6, p. 883-889, 1984.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry Biophysics**, New York, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W.G.; STOREY, K.B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radicals in Biology and Medicine**, New York, v. 19, n. 3, p. 271-280, 1995.

HERNANDEZ, J.A.; ALMANSA, M.S. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 115, n. 1, p. 251-257, 2002.

HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance, **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, n. 1, p. 431-438, 2001.

HOLTMAN, W.L.; HEISTEK, J.C.; MATTERN, K.A.; BAKHUIZEN, R.; DOUMA, A.C. Beta-oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germination barley, **Plant Science**, Clare, v. 99, n. 1, p. 43-53, 1994.

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

JIANG, M.; ZHANG, J. Water stress induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves, **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 379, p. 2401-2410, 2002.

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

KELLOS, T.; TIMAR, I.; SZILAGYI, V.; SZALAI, G.; GALIBA, G.; KOCSY, G. Stress hormones and abiotic stresses have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity, **Plant Biology**, Collingwood, v. 10, n. 5, p. 563-572, 2008.

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

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. Water relations of plants and soils. San Diego: Academic Press, 1995. 495 p.

KRAUS, T.E.; EVANS. R.C.; FLETCHER, R.A.; PAUL, S.K.P. Paclobutrazol enhances tolerances to increased levels of UV-B radiation in soybean (*Glycine max*) seedlings. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. 6, p. 797-806, 1995.

KUBO, A.; AONO, M.; NAKAJINA, N.; SAJI, H.; TANAKA, K.; KONDO, N. Differential responses in activity of antioxidant enzymes to differential environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Research**, Sendai, v. 112, n. 1107, p. 279-290, 1999.

KVARATSKHELIA, M.; WINKEL, C.; THORNELEY, R.N.F. Purification and characterization of a novel class in peroxidase isoenzyme from tea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, n. 4, p. 1237-1245, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LASCANO, H.R.; ANTONICELLI, G.E.; LUNA, C.M.; MELCHIORRE, M.N.; GOMEZ, L.D.; RACCA, L.W.; TRIPPI, V.S.; CASANO, L.M. Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and *in vitro* studies. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n. 11, p. 1095-1102, 2001.

LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stresses**: physiological ecology. New York: Academic Press, 1972. 697 p. (A Series of Monographs, Texts, and Treatises, 1). LIU, X.; HUA, X.; GUO, J.; QI, D.; WANG, L.; LIU, Z.; JIN, Z.; CHEN, S.; LIU, G. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing *VTE1* for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 30, n.7, p. 1275-1280, 2008.

LIU, Y.; LI, H.; SHI, Y.; SHONG, Y.; WANG, T.; LI, Y. A maize early responsive to dehydration gene, *ZmERD4*, provides enhanced drought and salt tolerance in *Arabidopsis.* **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 27, n. 4, p. 542-548, 2009.

LOGGINI, B.; SCARTAZZA, A.; BRUGNOLI, E.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. **Plant Physiology**, New York, v. 119, n. 3, p. 1091-1099, 1999.

LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J.M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings, **Physiologia Plantarum**, Oxford, v.105, n. 3, p.450-458, 1999.

MALENCIC, D.J.; POPOVIC, M.; STAJNER, D.; PRVULOVIC, D. Antioxidant systems and free proline content in different genotypes of soybean. **Oxidation Communication**, Budapest, v. 31, n. 4, p. 804-811, 2008.

MARIN, A.; SANTOS, D.M.M.; BANZATTO, D.A.; CODOGNOTO, L.M. Influência da disponibilidade hídrica e acidez do solo nos teores de prolina livre de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n.1, p. 355-358, 2006.

MARRS, K.A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 127-158, 1996.

MARTINEZ, C.A.; LOUREIRO, M.E.; OLIVA, M.A.; MAESTRI, M. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. **Plant Science**, Amsterdam, v. 160, n. 3, p. 505-515, 2001.

MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, Limerick, v. 153, n. 1, p. 83-104, 2000.

MILONE, M.T.; SGHERRI, C.; CLIJSTERS, H.; NAVIRI-IZZO, F. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. **Environmental and Experimental Botany,** Oxford, v. 50, n. 3, p. 265-276, 2003.

MITRA, J. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants, **Current Science**, Bangalore, v. 80, n. 6, p. 758-763, 2001.

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

MIYAKE, C.; SHINZAKI, Y.; NISHIOKA, M.; HORIGUCHI, S.; TOMIZAWA, K.I. Photoinactivation of ascorbate peroxidase in isolated tobacco chloroplasts: *Galdieria partita* APX maintains the electron flux through the water–water cycle in transplastomic tobacco plants. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 47, n. 2, p. 200-210, 2006.

MOLINARI, H.B.C.; MARUR, C.J.; DAROS, E.; CAMPOS, M.K.F.; CARVALHO, J.F.R.P.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.) : osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress, **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 130, n. 2, p. 218-229, 2007.

MORADI, R..; ISMAIL, A.M. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-Scavengin systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. **Annals of Botany**, Oxford, v. 99, n. 6, p. 1161-1173, 2007.

NATHAWAT, N.S.; NAIR, J.S.; KUMAWAT, S.M.; YADAVA, N.S.; SINGH, G.; RAMASWAMY, N.K.; SAHU, M.P.; D'SOUZA, S.F. Effect of seed soaking with thiols on the antioxidant enzymes and photosystem activities in wheat subject to water stress. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 51, n. 1, p. 93-97, 2007.

NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M.F.; IZZO, R. Water stress induced changes in protein and free amino acids in field-grown maize and sunflower. **Plant Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 531–537, 1990.

NAYYAR, H.; GUPTA, D. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 106-113, 2006.

NAYYAR, H.; WALIA, D.P. Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 46, n. 2, p. 275-279, 2003.

NEILL, S.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion** in **Plant Biology**, London, v. 5, n. 5, p. 388-395, 2002.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1283-1304, 2002.

NOGUEIRA, F.T.S.; DE ROSA, V.E.; MENOSSI, M.; ULIAN, E.C.; ARRUDA, P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, New York, v. 132, n. 4, p. 1811-1824, 2003.

NORIEGA, G.O.; BALESTRASSE, K.B.; BATLLE, A.; TOMARO, M.L. Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also bay the accumulation of delta-aminolevulinic acid. **Biometals**, London, v. 20, n. 6, p. 841-851, 2007.

OZDEN, M.; DEMIRE, U.L.; KAHRAMAN, A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 119, n. 2, p. 163–168, 2009.

PALL, P.; ALLEN, M.; STONE, D. Testing the Clausius-Clapeyron constrain on changes in extreme precipitation under CO<sub>2</sub> warming, **Climate Dynamics**, Heidelberg, v. 28, n. 4, p. 351-363, 2007.

PAN, Y.; WU, L.J.; YU, Z.L. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis Fisch*). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 49, n. 2, p. 157-165, 2006.

PANDHAIR, V., SEKHON, B.S. Reactive oxygen species and antioxidants in plants: An overview. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 15, n. 2, p. 71-78, 2006.

PARIDA, A.K.; DAGAONKAR, V.S.; PHALAK, M.S.; UMALKAR, G.V.; AURANGABADKAR, L.P. Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. **Plant Biotechnology Reports**, Tokyo, v. 1, n. 1, p. 37-48, 2007.

PARRE, E.; GHARS, M.A.; LEPRINCE, A.S.; THIERY, L.; LEFEBVRE, D.; BORDENAVE, M.; RICHARD, L.; MAZARS, C.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. Calcium signalling via phospholipase C is essential for proline accumulation upon ionic but not non-ionic hyperosmotic stresses in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 144, n. 1, p. 503-512, 2007.

PARRY, M.A.J.; HABASH, D.; ARAUS, J.L. Optimisation of water use by plants. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 144, n. 2, p. 125-126, 2004.

PERL, A.; PERLTREVES, R.; GALILI, S.; AVIV, D.; SHALGI, E.; MALKIN, S.; GALUN, E. Enhanced oxidative stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu/Zn superoxide dismutase. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 85, n. 5, p. 568-576, 1993.

PIGNOCCHI, C.; FLETCHER, J.M.; WILKINSON, J.E.; BARNES, J.D.; FOYER, C.H. The function of ascorbate oxidase in tobacco. **Plant Physiology**, New York, v. 132, n. 3, p. 1631-1641, July 2003.

PITZSCHKE, A.; FORNAZI, C.; HIRT H. Reactive oxygen species signaling in plants. **Antioxidants and Redox Signalling,** New York, v. 8, n. 9, p. 1757-1764, 2006.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase–ascorbate–glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a first step towards flux analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 1, p. 445–462, 2001.

QUEIROZ, R.J.B. **Quantificação da trealose e da prolina livre em cana-de-açúcar sob efeito da disponibilidade hídrica do solo**. 2006. 60 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2006.

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

RAO, K.C.; ASOKAN, S. Studies on free proline association to drought resistance in sugarcane. **Sugar Journal**, New Orleans, v. 40, n. 8, p. 23-24, 1978.

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

REISER, V.; RAITT, D.C.; AND SAITO, H. Yeast osmosensor SIn1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. **Journal of Cell Biology**, New York, v.161, n. 6, p 1035–1040, June 2003.

RICCARDI, F.; GAZEAU, P.; VIENNE, D.; ZIVY, M. Protein changes in response to progressive water deficit in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 4, p. 1253-1263, 1998.

RIEKERT VAN HEERDEN, P.D.; KRUGER, G.H.J. Separately and simultaneously induced dark chilling and drought stress effects on photosynthesis, proline accumulation and antioxidant metabolism in soybean. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 159, n. 10, p. 1077-1086, 2002.

RÍNCONES, C. Variación del contenido de prolina en ocho variedades de caña de azúcar a cuatro niveles de humedad en el suelo. **Caña de Azúcar**, Maracay, v. 15, n. 1, p. 3- 16, 1997.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; PALMA, J.M.; GÓMES, M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. **Plant Cell & Environment,** Oxford, v. 25, n. 5, p. 677-686, 2002.

SAIRAM, R.K.; DUBE, S.D. Effect of moisture stress on proline accumulation in wheat in relation to drought tolerance. **Indian Journal of Agricultural Science**, New Delhi, v. 54, n. 2, p. 146-147, 1984.

SAIRAM, R.K.; CHANDRASEKHAR, V.; SRIVASTAVA, G.C. Comparation of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their responses to water stress. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 44, n. 1, p. 89-94, 2001.

SAIRAM, R.K.; DESHMUKH, P.S.; SHUKLA, D.S. Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. **Journal Agronomy & Crop Science**, Berlin, v. 178, n. 3, p. 171-178, 1997.

SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C.; AGARWAL, S.; MEENA, R.C. Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 49, n. 1, p. 85-91, 2005.

SALEKDEH, G.H.; SIOPONGCO, H.J.; WADE, L.J.; GHAREYAZIE, B.; BENNETT, J. Proteomics analysis of rice leaves during drought stress and recovery. **Proteomics**, Weinheim, v. 2, n. 9, p. 1131–1145, 2002.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, 1993.

\_\_\_\_\_. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHAFLEITNER, R.; GAUDIN, A.; GUTIERREZ ROSALES, R.O.; ALIAGA, C.A.A.; BONIERBALE, M. Proline accumulation and real time PCR expression analysis of genes encoding enzymes of proline metabolism in relation to drought tolerance in Andean potato. **Acta Physiologiae Plantarum**, New York, v. 29, n. 1, p. 19-26, 2007.

SGHERRI, C.L.; MAFFEI, M.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 157, n. 3, p. 273-279, 2000.

SEKI, M.; KAMEI, SHINOZAKI, K.Y.; SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection, **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.14, n. 2, p.194-199, 2003.

SHAO, H.; LINAG, Z.; SHAO, M. Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 47, n. 2, p. 132-139, 2006.

SHAO, H.B.; LIANG, Z.S.; SHAO, M.A.; WANG, B.C. Changes of antioxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficits among 10 wheat genotypes at

seedling. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Amsterdam, v. 42, n.2, p. 107-113, 2005.

SHAO, H.B.; CHU, L.Y.; JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; PANNEERSELVAM, R.; SHAO, M.A. Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants - biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment in arid regions of the globe. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 29, n. 2, p. 131-151, 2009.

SHINOZAKI, K.Y.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters, **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, n. 2, p. 88-94, 2005.

SIMOVA-STOILOVA, L.; DEMIREVSKA, K.; PETROVA, T.; TESENOV, N.; FELLER, U. Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long-term field drought. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 58, n. 1, p. 107-117, 2009.

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

SOFO, A.; DICHIO, B.; XILOYANNIS, C.; MASIA, A. Antioxidant defenses in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, n. 1, p. 45-53, 2005.

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

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

TABAEIZADEH, Z.; CHAMBERLAND, H.; CHEN, R.D.; YU, L.X.; BELLEMARE, G.; LAFONTAINE, J.G. Identification and immunolocalization of a 65 kDa drought-induced protein in cultivate tomato *Lycopersicon-esculentum*. **Protoplasma**, Leipzig, v. 186, n. 3, p. 208-219, 1995. TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução de L.R. Santarém. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAMURA, T.; HRA, K.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants, **Plant Physiology**, Rockville, v.131, n. 2, p. 454–462, 2003.

TAUSZ, M.; SIRCELJ, H.; GRILL, D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 404, p. 1955-1962, 2004.

TORRES-FRANKLIN, M.L.; CONTOUR-ANSEL, D.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A.T. Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR genes expression in cowpea and common bean leaves during recovery from moderate drought stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 5, p. 514-521, 2008.

TÜRKAN, İ.; BOR, M.; ÖZDEMIR, F.; KOCA, H. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. **Plant Science**, Clare, v. 168, n. 1, p. 223-231, 2005.

UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Avaliação da safra 2009/2010**. São Paulo, 2009. 39 p.

URAO, T.; YAKUBOV, B.; SATOH, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, B.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor, **The Plant Cell**, Baltimore, v. 11, n. 9, p 1743– 1754, 1999.

VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n.6, p. 501–507, 2002.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review, **Amino Acids**, Wien, v. 35, n.4, 2008.

VERSLUES, P.E.; KIM, Y.S.; ZHU, J.K. Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant, **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 205-217, 2007.

VERSLUES, P.E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J.K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, Oxford, v. 45, n.4, p. 523– 539, 2006.

WAHID, A.; CLOSE, T.J. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 51, n. 1, p. 104-109, 2007.

WANG, F.Z.; WANG, Q.B.; KOWN, S.Y.; KWAK, S.S.; SU, W.A. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase, **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 162, n. 4, p. 465-472, 2005.

WANG, W.B.; KIM, Y.H.; LEE, H. S.; KIM, K. Y.; DENG, X. P.; KWAK, S. S. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 47, n. 7, p. 570-577, 2009.

WILLEKENS, H.; CHAMNOGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VANCHAMP, W. Catalase is a sink for  $H_2O_2$  and is indispensable for stress defense in  $C_3$  plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 16, p. 4806-4816, 1997.

WOOD, A.J.; GOLDSBROUGH, P.B. Characterization and expression of dehydrins in water-stressed Sorghum bicolor. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 9, n. 1, p. 144-152, 1997.

WU, G.; WILEN, R.W.; ROBERTSON, A.J.; GUSTA, L.V. Isolation, chromosomal localization and differential expression of mitochondria manganese superoxide dismutase and chloroplastic cooper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. **Plant Physiology**, New York, v. 120, p. 513-520, 1999.

YONG, T.; ZONGSUO, L.; SHAO, H. FENG, D. Effect of water deficits on the activity of anti-oxidative enzymes and osmoregulation among three different genotypes of *Radix Astragali* at seedling stage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 60-65, 2006.

90

ZAEFYZADEH, M.; QULIYEV, R.A.; BABAYEVA, S.M.; ABBASOV, M.A. The effect of the interaction between genotypes and drought stress on the superoxide dismutase and chlorophyll content in durum wheat landraces. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2009.