

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MELHORAMENTO GENÉTICO DE
PLANTAS**

MARCIANA BIZERRA DE MORAIS

**AÇÃO COMBINADA DE FATORES ABIÓTICOS DE ESTRESSE EM
VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR: VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS**

RECIFE-PE

2013

MARCIANA BIZERRA DE MORAIS

**AÇÃO COMBINADA DE FATORES ABIÓTICOS DE ESTRESSE EM
VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR: VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Agronomia, área de concentração: Melhoramento Genético de Plantas.

ORIENTADORA:

Dra. Lilia Gomes Willadino

COORIENTADORES:

Dr. Ricardo Antunes Azevedo

Dr. Júlio Zoe de Brito

RECIFE-PE

2013

Ficha catalográfica

M828a Morais, Marciana Bizerra de
Ação combinada de fatores abióticos de estresse
em cana-de-açúcar: variáveis fisiológicas e
bioquímicas / Marciana Bizerra de Moraes. -- Recife,
2013.
75 f.: il

Orientador(a): Lilia Gomes Willadino.
Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de
Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Agronomia, Recife, 2013.
Inclui anexo(s) e referências.

1. Enzimas antioxidativas 2. Estresse múltiplo
3. *Saccharum* spp. I. Willadino, Lilia Gomes, orientador
II. Título

CDD 581.15

MARCIANA BIZERRA DE MORAIS

**AÇÃO COMBINADA DE FATORES ABIÓTICOS DE ESTRESSE EM
VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR: VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS**

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em ____/____/____

Orientadora: _____

Dra. Lilia Gomes Willadino

Professora do Departamento de Biologia - UFRPE

Examinadores:

Dra. Cynthia Cavalcanti de Albuquerque (Membro Titular)
Professora do Departamento de Ciências Biológicas - UERN

Dr. José Luiz Sandes de Carvalho Filho (Membro Titular)
Professor do Departamento de Agronomia - UFRPE

Dra. Terezinha Rangel Camara (Membro Titular)
Professora do Departamento de Química - UFRPE

**RECIFE-PE
2013**

Aos meus amados pais (Francisco Batista e Maria Emília) e queridos irmãos (Marcos, Márcia e Marcelo) pela compreensão do tempo que fiquei ausente, pelo amor que transcende os laços materiais e por todos os maravilhosos momentos juntos nessa existência física.

Ao meu amado e querido esposo (Diego Nathan - colega de profissão e companheiro dos palcos musicais) pelo amor, compreensão, companheirismo, suporte emocional, por ser tão especial... Enfim, por tornar meus dias mais felizes.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Certa feita ouvi dizer que os agradecimentos de um trabalho dessa natureza devem ser objetivos e “nada poéticos”. Na minha singela opinião, agradecer deve ser algo espontâneo e não uma mera formalidade. Portanto, peço licença ao nobre leitor para que eu possa expressar nessas linhas do trabalho, sem linguagem científica, minha gratidão ilimitada aos que ajudaram a tornar essa investigação possível, de forma material ou imaterial. Espero não ter sido acometida por um momentâneo esquecimento injusto.

Agradeço:

Às professoras Lilia Willadino e Terezinha Camara, pelo acolhimento, confiança, pela humildade na partilha do saber e o constante apoio na resolução de todas as etapas desse trabalho. Agradeço também as contribuições profissionais, pessoais e em especial a valiosíssima amizade que com certeza irá “romper os muros” da universidade.

Aos meus coorientadores, Dr. Júlio Zoe e prof. Ricardo Azevedo, pela parceria. Ao professor Ricardo também agradeço pela oportunidade de estágio no Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas (ESALQ/USP).

Aos membros da Banca Examinadora (Prof. José Luís, Profa. Terezinha e Profa. Cynthia), pelas valiosas contribuições ao trabalho. Ao Prof. Zezinho também agradeço pela paciência e orientação na estatística do trabalho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e aos professores do Programa de Melhoramento Genético de Plantas, minha gratidão pelas contribuições em minha formação profissional.

À FACEPE pela bolsa de estudos concedida e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

A Dra. Salete Gaziola e a equipe do laboratório LGBP/ESALQ (especialmente Lucas Anjos) pelas valiosas discussões e contribuições.

À minha “eterna orientadora” Cynthia Cavalcanti (já citada no texto), pelo incentivo e contribuições desde os primeiros passos acadêmicos. Agradeço, sobretudo, os laços dessa amizade tão nobre e especial.

À professora e grande amiga Cláudia Ulisses, pela orientação nas decisões profissionais, mas, em especial, pela preciosa amizade que construímos e por me permitir “entrar em sua vida e ouvir suas palavras”.

A toda família LCTV (Arqui, Duda, Jayne, Joãozim, Lu (Luciana), Linda, Mima, Martinha, Maizinha, Nathy, Simone, Thamirys, Vini...) que tornou os dias de trabalho mais “leves” e divertidos... Todos foram importantes em diferentes etapas. Agradeço especialmente a Well pela ajuda nas análises e alegria contagiante; Mari pelas ótimas discussões científicas; e aos alunos diretamente envolvidos nesta pesquisa (Lais, Lu (Luana), Nando, Nanda e Ronaldo). Com carinho especial, agradeço a Lalá (minha “escrava branca”, rs) que me acompanhou em TODAS as fases da pesquisa.

À querida e tão especial amiga Claudia Fernandes (Profa. Claudia), por ser uma inspiração de vida e exemplo de dignidade. A você meu eterno respeito, admiração e carinho por me acompanhar mesmo distante.

À minha “mana” Jocileide (Jozinha), pela amizade incondicional e por estar sempre “tão perto” independente das barreiras impostas pelas linhas geográficas.

Aos queridos amigos Thiago, Eveline, Noelia, Simone, Renata e Escarião pela sincera amizade e pelos bons e memoráveis momentos que tornaram nossos dias (em Recife) mais divertidos.

Por fim, **de maneira mais especial**, agradeço:

A Deus, que em sua magnitude me concedeu a oportunidade da atual existência.

Aos que me ajudaram (nesse orbe terreno) a entender, praticar e vivenciar em diferentes dimensões, o verdadeiro sentido do amor em plenitude. Além de sempre estarem ao meu lado *“me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória”* (pais, irmãos, cunhados, sobrinhos e esposo).

**Nos versos de meu pensamento
Vou gratidão registrar,
E nem as marcas do tempo
Conseguirão apagar.**

(Marciana Moraes)

Muito obrigada!

*“A educação se bem compreendida, é a
chave para o progresso moral”.*

Allan Kardec

RESUMO

No semiárido da região do Nordeste brasileiro onde ocorre frequentemente estresse múltiplo (déficit hídrico, salinidade, altas temperaturas e excesso de luminosidade), é fundamental o desenvolvimento de estudos sobre interações fisiológicas e bioquímicas para compreensão do estado de equilíbrio das plantas frente a condições adversas. Como em toda cultura agrícola, a produção da cana-de-açúcar é influenciada por um grande número de fatores ambientais e, nesse cenário, destaca-se a importância da identificação de variedades tolerantes a flutuações ambientais, visando o máximo desempenho das culturas. Portanto, na busca de aprofundar e ampliar os conhecimentos sobre o metabolismo de tolerância da cana-de-açúcar objetivou-se, neste trabalho, estudar a importância do sistema antioxidante na proteção contra danos oxidativos induzidos por estresses isolados e múltiplos. Para tanto, foram realizados dois experimentos em diferentes condições ambientais: um em ambiente natural de casa de vegetação, caracterizando a Zona da Mata, e outro em câmara climática, sob condições controladas semelhantes as do semiárido. Nesses experimentos, plantas de seis genótipos (RB 966928, RB 98710, RB 855453, RB 99395, RB 867515 e RB 855156) procedentes de micropropagação foram submetidos à avaliação da ação combinada ou isolada da salinidade, da suspensão de rega e de elevada temperatura. Os estresses isolados induziram um aumento na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) que, nas variedades tolerantes, foram eficientes no combate ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a peroxidação lipídica. O estresse múltiplo induziu, em variedades mais sensíveis, um incremento no teor de malonaldeído (MDA) associado, na maioria das vezes, a uma menor atividade das enzimas. Esses resultados indicam que a combinação dos estresses causa maiores danos que podem, inclusive, inibir a ação de enzimas. Destacou-se como tolerante a RB 867515 que apresentou uma controlada sincronia entre a atividade enzimática na regulação e desintoxicação das ROS, produzidas na célula vegetal durante situações de estresse ambiental, garantindo a manutenção do teor relativo de água e, conseqüentemente, a manutenção dos processos fisiológicos e o crescimento da planta.

Palavras-chave: Enzimas antioxidativas, estresse múltiplo, *Saccharum* spp.

ABSTRACT

The development of studies concerned with physiological and biochemical interactions that allow plants to experience a new state of equilibrium when facing adverse situations is essential in the Brazilian semiarid, where multiple stresses (water deficit, seasonality, high temperatures and lightness) are frequent. As any other field crop, the sugarcane production is influenced by a number of environmental factors. Under this scenario, identifying varieties which are tolerant to environmental fluctuations has a great importance, since it leads to a maximum crop performance. Therefore, in order to improve knowledge about sugarcane metabolism of tolerance, this work aimed to study the importance of the antioxidant system on the protection against oxidative damages induced by isolated and multiple stresses. Two experiments were performed under different environmental conditions: one of them in a natural greenhouse environment that characterize an Atlantic Forest area and the other in a climate chamber under controlled conditions that simulated the semiarid region. For each experiment six genotypes (RB 966928, RB 98710, RB 855453, RB 99395, RB 867515 and RB 855156) coming from micropropagation were evaluated to what concerns combined or isolated action of the salinity, watering abortion and high temperature. The isolated stresses induced an increase in the activity of the enzymes superoxido dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbato peroxidase (APX) for the tolerant varieties, which were efficient in the combat of hydrogen peroxide (H₂O₂) and peroxidation. Multiple stresses induced, in smoother varieties, an increase in malondialdehyde (MDA) often associated to a lower enzymatic activity. These results indicate that the combination of stresses cause more damage, even leading to an inhibition in enzymatic action. RB 867515 highlights as a tolerant variety that presents a controlled synchrony between the enzymatic activity for regulation and desintoxication of the ROS which are produced on the plant cell during situations of environmental stress, assuring the maintenance of the relative water content and the consequent maintenance of the physiological processes and plant growth.

Key words: antioxidant enzymes, multiple stresses, *Saccharum* spp.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Formação de espécies reativas de oxigênio: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}).....21

CAPÍTULO II

Figura 1. Teor relativo de água (TRA%) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação. No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....42

Figura 2 Peroxidação lipídica expressa pelo conteúdo de MDA ($\mu\text{mol/g MF}$) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação. No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....42

Figura 3. Conteúdo de H_2O_2 ($\mu\text{mol/g MF}$) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação. No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....43

Figura 4. Atividade da SOD ($\text{U SOD mg prot.}^{-1}$) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação. No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....43

Figura 5. Atividade da CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação. No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....44

Figura 6. Atividade da APX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação. No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....44

CAPÍTULO III

Figura 1. Teor relativo de água (TRA%) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas à elevada temperatura ($36/26\pm 1$ °C) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....60

Figura 2. Conteúdo de H_2O_2 ($\mu\text{mol/g MF}$) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas à elevada temperatura ($36/26\pm 1$ °C) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....60

Figura 3. Peroxidação lipídica expressa pelo conteúdo de MDA ($\mu\text{mol/g MF}$) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas à elevada temperatura ($36/26\pm 1$ °C) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....61

Figura 4. Atividade da SOD ($\text{U SOD mg prot.}^{-1}$) para folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas à elevada temperatura ($36/26\pm 1$ °C) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....61

Figura 5. Atividade da CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) para folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas à elevada temperatura ($36/26\pm 1$ °C) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....62

Figura 6. Atividade da APX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) para folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas à elevada temperatura ($36/26\pm 1$ °C) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental.....62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APX – Peroxidase de Ascorbato

BSA – Albumina de soro bovino

CAT – Catalase

CuSOD – Enzima superóxido dismutase contendo cobre

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilendiaminotetracético

Fe²⁺ – Ferro

FeSOD – Enzima superóxido dismutase contendo ferro

HO₂[•] – Radical hidroperóxido

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

MDA – Malondialdeído

MnSOD – Enzima superóxido dismutase contendo manganês

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NBT – Nitro blue tetrazolium

¹O₂ – Oxigênio singleto

O₂ – Oxigênio molecular

O₂^{•-} – Radical superóxido

OH[•] – Radical hidroxila

POD – Peroxidase

RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

TRA – Teor Relativo de Água

TCA – Ácido tricloroacético

TBA – Ácido 2-tiobarbitúrico

UR – Umidade Relativa

ZnSOD – Enzima superóxido dismutase contendo zinco

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Cana-de-açúcar.....	15
2.1.1. Aspectos gerais	15
2.2. Estresses ambientais	17
2.3. Estresse oxidativo: estresse secundário	20
2.3.1 Sistema antioxidativo.....	23
3.0. REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO II	31
Metabolismo antioxidativo em variedades de cana-de-açúcar sob estresse hídrico e salino.....	32
Resumo.....	32
Intrrodução	33
Material e métodos.....	34
Resultados e discussão	37
Referências	39
Figuras	42
CAPÍTULO III	45
Efeito do estresse múltiplo no metabolismo oxidativo de variedades de cana-de-açúcar	46
Resumo.....	47
Introdução	47
Materiais e métodos	49
Resultados e discussão	52
Referências	56
Figuras	60
CAPÍTULO IV	63
Considerações Finais.....	64
ANEXOS	65

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). A área plantada compreende 8,6 milhões de hectares com estimativas da safra para 2012/13 de 602 milhões de toneladas (CONAB, 2012). O país também se destaca no setor sucroalcooleiro, sendo o principal a implantar um combustível renovável alternativo ao petróleo (CARVALHO, 2012).

O aumento das temperaturas em decorrência do aquecimento global tende a provocar um grande impacto na agricultura. No Brasil, esse aumento das temperaturas associado ao déficit hídrico, provoca perdas nas safras de várias culturas (DECONTO et al., 2008). Outro fator preocupante e considerado limitante de produção agrícola é a salinidade, que afeta principalmente regiões semiáridas e é um dos mais disseminados riscos ambientais (PITMAN; LAÜCHLI, 2002).

Os estresses abióticos podem retardar o crescimento e o desenvolvimento, reduzir a produtividade e, em casos extremos, levar a planta à morte (QUIANG et al., 2000). Apesar de consideráveis avanços obtidos nesta área, a maioria dos estudos está focada na resposta da planta a um único estresse abiótico, sob condições controladas. Entretanto, em condições ambientais naturais, frequentemente as plantas são submetidas a diversos estresses, os quais, quase sempre, ocorrem simultaneamente (RIZHSKY et al., 2004).

Esses estresses ambientais podem provocar o estresse oxidativo, que pode ser definido como um desequilíbrio na relação entre a produção de compostos antioxidantes *versus* compostos oxidantes. A elevada produção de espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species – ROS, em inglês) pode afetar a homeostase celular, pois essas moléculas podem reagir com diversos metabólitos, enzimas e ácidos nucleicos (CASSELLS; CURY, 2001), agravando os danos nos vegetais que se refletem, seja na redução do crescimento, seja na produtividade.

Para evitar as consequências danosas do estresse, as plantas desenvolveram um complexo mecanismo de defesa antioxidante que resulta na eliminação das ROS para reajustar o equilíbrio redox celular. O sistema antioxidativo é constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes (DEWIR et al., 2006). A interação entre o controle do nível das ROS, o sistema de defesa e a sinalização são tópicos que estão sendo bastante estudados na tolerância das plantas ao estresse.

O entendimento desses processos fisiológicos e bioquímicos é necessário para que seja possível o desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar, que

apresentem resistência e adaptação a estresses provocados por fatores climáticos e salinidade (estresses múltiplos). Nessa perspectiva, no Nordeste do Brasil, destacam-se as variedades RB (República Brasileira) lançadas pelo Programa Nacional de Melhoramento de Cana-de-Açúcar, conduzido pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA. As variedades RB caracterizam-se pela alta produtividade e adaptação às condições edafoclimáticas da região para a qual foram indicadas (RIDESA, 2005).

Assim, considerando a importância econômica da cana-de-açúcar, a compreensão dos mecanismos da cultura frente aos estresses abióticos é um desafio que deve agregar esforços para a obtenção de cultivares com maior tolerância ao estresse múltiplo, visando incrementar a produtividade agrícola. Portanto, objetivou-se neste trabalho, estudar a importância do sistema antioxidante na proteção contra danos oxidativos induzidos por estresses isolados e múltiplos, em busca da compreensão dos processos metabólicos das plantas sob estresse isolado e combinado em variedades lançadas pela RIDESA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-açúcar

2.1.1. Aspectos gerais

A cana-de-açúcar é uma monocotiledônea pertencente à Divisão Magnoliophyta, Classe Liliopsida, Família Poaceae e ao Gênero *Saccharum*. É originária do Sudeste Asiático, na grande região central da Nova Guiné e Indonésia (SACIOTO, 2003).

A cana-de-açúcar é considerada uma planta tropical de ciclo semiperene e hábito herbáceo, que caracteristicamente, desenvolve-se em forma de touceira, possuindo uma estrutura subterrânea formada de raízes e rizomas (CESNIK; MIOCQUE, 2004) e uma parte aérea formada por colmos, folhas e inflorescências.

Cada genótipo expressa os caracteres que lhe são inerentes com a influência de fatores do ambiente, como a eficiência fotossintética. Além disso, outras questões influenciam diretamente a expressão dos caracteres, por exemplo, manejo, práticas culturais e as variações climáticas que prevalecem durante todo o desenvolvimento (RODRIGUES, 1995).

Até o fim do século 19, variedades de cana-de-açúcar eram principalmente clones da espécie *S. officinarum*, que possui um alto conteúdo de açúcar (DANIELS; ROACH, 1987). A partir de cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum* foi possível a obtenção de variedades mais produtivas e resistentes a doenças e estresses (GRIVET et al. 1996; GRIVET; ARRUDA 2001). A partir de então, foi realizado o retrocruzamento dos híbridos obtidos com *S. officinarum* (BERDING; ROACH, 1987). Os cultivares da atualidade são originários desses genótipos interespecíficos, seguido por poucos ciclos de intercruzamento e seleção.

O cultivo da cana-de-açúcar possui importância histórica, política, social e econômica por ser uma das primeiras atividades econômicas documentadas na história do Brasil, sendo desde o século XVI o setor mais importante da economia colonial (CUENCA; NAZÁRIO, 2005). Nos dias atuais aumenta a necessidade de pesquisas em larga escala sobre a cultura, especialmente pelo impacto de novas alternativas como biocombustíveis (AZEVEDO et al., 2011).

O Brasil é líder mundial na produção de etanol proveniente de cana-de-açúcar e é considerado referência no setor. O país possui a cadeia produtiva bastante estruturada e domínio de todos os estágios da tecnologia de produção (VIDAL, 2010). Além disso, é considerado o principal produtor e exportador de açúcar, sendo responsável por aproximadamente 62% das exportações no mundo (BRASIL, 2011), com os maiores níveis de produtividade e rendimento industrial e os menores custos de produção (UNICA, 2009).

A área plantada com essa cultura no país compreende 8,6 milhões de hectares, com a produtividade média brasileira estimada em 69.963 kg/ha, 4,3% maior que na safra 2011/12, que foi de 67.060 kg.ha⁻¹. A previsão do total de cana moída na safra 2012/13 é de 596,63 milhões de toneladas, significando um aumento de 6,5% em relação à safra 2011/12 (CONAB, 2012).

No cenário mundial, estima-se que o aumento global da temperatura ambiente será um fator crítico para o crescimento das plantas no futuro (AZEVEDO et al., 2011). Espera-se que ocorra elevação da evapotranspiração resultando na intensificação da deficiência hídrica, o que vai provocar um aumento de áreas com alto risco climático e consequente impacto na agricultura. No Brasil, estimativas da Embrapa mostram que, se nada for feito para mitigar os efeitos das mudanças climáticas e adaptar as culturas para a nova situação, o aumento das temperaturas e do déficit hídrico, em decorrência do aquecimento global, pode provocar perdas nas safras de grãos de R\$ 7,4 bilhões já em

2020 (com previsões de R\$ 14 bilhões em 2070) e alterar profundamente a geografia da produção agrícola no Brasil (EMBRAPA, 2008).

A cana-de-açúcar, ao contrário do que deve acontecer com as outras culturas, é promissora na tolerância à elevação da temperatura prevista para as próximas décadas (EMBRAPA, 2008). Na região Nordeste o cultivo da cultura é realizado, tradicionalmente, nas zonas úmidas de Mata e Litoral, mas vem se expandindo para regiões semiáridas (SEAGRI, 2007). Dessa forma, a cultura estará exposta a um ambiente mais propício a problemas de salinidade e deficiência hídrica. Com o aquecimento global o semiárido do Nordeste é apontado como uma das regiões mais suscetíveis ao agravamento das condições climáticas e, portanto, mais estressantes para as plantas (DECONTO et al., 2008).

A opção de cultivos adaptados e tolerantes às condições adversas é uma alternativa viável e econômica para o cultivo em áreas afetadas. Uma das mais importantes tecnologias do agronegócio em geral, e da cana-de-açúcar em particular, é a utilização de genótipos. Portanto, a biotecnologia vegetal deve agir de forma integrada como os programas de melhoramento clássico para alcançar a máxima eficiência na obtenção de genótipos tolerantes às condições de estresse (WANG et al., 2003).

Na região Nordeste, a RIDESA é responsável pelo melhoramento genético da cana-de-açúcar e as variedades lançadas por essa rede representam 58% de área cultivada no Brasil (RIDESA, 2010a). Este programa vem lançando novas variedades, que se caracterizam pela produtividade e/ou pela adaptação às condições edafoclimáticas da região (RIDESA, 2010b), visando melhorar a produtividade do setor.

2.2.1. Estresses ambientais

O estresse pode ser considerado desfavorável quando uma condição em que a demanda de energia pela planta para sua sobrevivência é maior que a produção. Nesse caso, inicialmente pode ocorrer uma desestabilização inicial de suas funções que pode ser seguida ou não por uma estabilização e indução dos processos fisiológicos de adaptação (LARCHER, 2000). Por outro lado, o estresse pode ser importante no desenvolvimento dos vegetais quando significa uma restrição, no sentido de sobrevivência, pois sem causar nenhum dano pode ativar o metabolismo vegetal e aumentar a atividade fisiológica da planta (LIMA, 2007).

As plantas são organismos sésseis e precisam resistir aos estresses aos quais elas são expostas frequentemente em ambientes naturais, o que pode gerar influência negativa em seu desenvolvimento (TAIZ; ZEIGER, 2004; SHAO et al., 2007). Nesse sentido, o termo resistência está relacionado ao estresse e significa uma aptidão dessas plantas para enfrentar ambientes desfavoráveis (TAIZ; ZEIGER, 2004). A tolerância, por sua vez, é um mecanismo que permite à planta manter o seu metabolismo em níveis considerados normais mesmo na presença do agente agressor, sem influências prejudiciais ao desenvolvimento. Neste aspecto, alguns fatores são limitantes para um quadro de irreversibilidade, tais como: o estágio de desenvolvimento da planta, o genótipo utilizado (WILLADINO; CAMARA, 2010), a duração e severidade do estresse (CHAVES et al., 2003; GHELFI et al., 2011).

A estratégia de sobrevivência das plantas às condições adversas é equilibrar rendimento e sobrevivência. Para tanto, uma série de processos surgem a partir de alterações da expressão gênica, resultando em alterações fisiológicas e bioquímicas. A evolução de diferentes respostas metabólicas e a habilidade na percepção dos sinais ambientais externos (FUJITA, 2006) são citados como mecanismos desenvolvidos e aprimorados pelas plantas.

Os produtos gênicos ativados nessas respostas podem estar envolvidos na transdução de sinais e na regulação da expressão de genes associados aos mecanismos de tolerância. Dentre eles estão os genes que codificam e modulam as proteínas da síntese metabólica, antioxidantes, proteínas estabilizadoras de membrana e síntese de osmoprotetores, chaperonas e detoxificação (MAHAJAN; TUTEJA, 2005; GRENNAN, 2006; SHAO et al., 2007). Entre as respostas, o sistema antioxidante, que faz parte do metabolismo natural, pode ser intensificado em condições de estresse, sendo considerado um dos principais mecanismos de defesa. O conjunto dessas características atreladas aos aspectos fisiológicos e agrônômicos embasam os procedimentos de seleção de germoplasma, por meio do melhoramento tradicional, do melhoramento molecular e as abordagens por transgenia.

Muitos trabalhos desenvolvidos relatam estratégias das plantas a estresses abióticos isolados. No caso do déficit hídrico, quanto mais severo mais dificuldade as plantas terão para manter o equilíbrio entre a captação e a perda de água, sendo inevitável a redução do potencial hídrico (CIA, 2010). A planta deve, então, possuir estratégias e habilidades de funcionar com seus tecidos parcialmente desidratados (MITRA, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2004), mantendo a sua pressão de turgescência. Entre os mecanismos são citados: o

fechamento dos estômatos, o ajuste osmótico e o aumento na atividade do sistema de defesa antioxidante (ASADA, 1999).

A salinidade rompe a homeostase hídrica e iônica em consequência do déficit hídrico gerado pela redução do potencial osmótico ou por elevados teores de Na^+ e Cl^- , além da alterada relação K^+/Na^+ decorrente do efeito iônico. Nesse caso, o ajuste osmótico favorece a manutenção do turgor e do volume celular, garantindo o crescimento vegetal ainda que a uma taxa reduzida (WILLADINO; CAMARA, 2010). Além disso, no processo de tolerar a salinidade, a planta evita ou reduz os danos através da exclusão iônica, que diminui a concentração de sal no citoplasma (ZHU, 2001; MUNNS, 2005).

A temperatura é outro fator abiótico que também pode afetar as plantas de inúmeras maneiras. Como uma típica planta tropical e subtropical, a cana-de-açúcar responde com drásticas alterações na fotossíntese quando submetida a temperaturas baixas (AZEVEDO et al., 2011). Entretanto, elevadas temperaturas (40 °C) também podem afetar no metabolismo da cana. Os estresses térmicos podem induzir a produção de proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins – HSPs*) que atuam na recuperação dos danos causados pelas altas temperaturas (XIONG et al., 2002).

Combinações de tipos de estresses podem incluir seca e calor, seca e frio e, muitas vezes, incluem combinações triplas como seca, salinidade e calor (MILLER et al., 2010). Nestes casos, as respostas metabólicas tendem a ser únicas e não podem ser simplesmente extrapoladas a partir das respostas dos fatores abióticos aplicados isoladamente (MITTLER, 2006).

No estresse múltiplo, a defesa da planta deve incluir a manutenção e as interações de processos e esta capacidade é observada em vários níveis de organização da planta (morfologia, fenologia, fisiologia, bioquímica e genética). A interação desses fatores de estresse pode proporcionar adaptação à escassez de recursos ou sobrevivência em condições adversas (CHAVES; PEREIRA, 2003).

Segundo a Matriz do Estresse elaborada por Mittler (2006), a interação do estresse salino com o estresse por elevada temperatura ou déficit nutricional é considerada uma sinérgica potencialmente negativa, ou seja, ocorre um maior dano ou letalidade em função do estresse múltiplo. Da mesma maneira o estresse por déficit hídrico associado ao estresse por elevada temperatura também é considerado potencialmente negativo (RIZHSKY et al., 2004). Por outro lado, a associação do estresse salino ao estresse hídrico ainda é pouco conhecida.

Neste aspecto, destaca-se a importância de estudos das interações fisiológicas e bioquímicas e os mecanismos pelos quais as plantas ativam suas respostas de aclimação às novas condições impostas, uma vez que a planta deve alcançar um novo estado de homeostase quando submetida a estresse (MILLER et al., 2010). Esse entendimento tem grande importância para a biologia e é fundamental para melhorar a resistência das culturas aos estresses abióticos (XIONG; ZHU, 2002).

2.3. Estresse oxidativo: estresse secundário

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio, em qualquer compartimento celular, entre os níveis endógenos de compostos antioxidantes e compostos oxidantes, ocasionando o acúmulo de ROS (CASSELLS; CURY, 2001, MØLLER, 2001). As ROS são subprodutos do metabolismo celular regular e ocorrem naturalmente em processos como fotossíntese e respiração (SOARES; MACHADO, 2007), sendo continuamente produzidas e removidas das células por mecanismos antioxidativos enzimáticos ou não enzimáticos (MITTLER, 2002). As ROS podem inclusive atuar como moléculas sinalizadoras nos processos de crescimento e desenvolvimento celular (HUNG et al., 2005; DEL RÍO et al., 2006).

Quando a planta é exposta a condições adversas como seca, salinidade, alta temperatura, patógenos e etc., ocorrem alteração na homeostase celular e a produção de ROS se torna maior do que a capacidade antioxidante da célula, caracterizando assim o estresse oxidativo (PANDHAIR; SEKHON, 2006). Em distintos tipos de estresse abiótico pode ocorrer a limitação da fixação de CO₂ promovendo um incremento na produção de ROS decorrentes da reação de Mehler e dos pigmentos antena dos cloroplastos (HARIR; MITLLER, 2009).

As ROS podem ser encontradas no apoplasto, citosol, cloroplasto, mitocôndria e peroxissomo (NOCTOR et al., 2004), mas também existem indícios que essas moléculas também podem ser geradas na membrana plasmática, através da enzima NADPH oxidase para explosão oxidativa contra patógenos (LAMB; DIXON, 1997). Quando em excesso ou quando os sistemas de defesa antioxidante não estão trabalhando de forma eficiente, elas podem causar danos às células (GIL; TETEJA, 2010).

A toxicidade dos compostos oxidantes está na sua capacidade de iniciar cascatas de reações que resultam em danos como, por exemplo, a peroxidação lipídica (NOCTOR;

FOYER, 1998). Além disso, o acúmulo de ROS pode afetar severamente a funcionalidade e integridade celular com alterações na homeostase redox, danos a macromoléculas, e desnaturação de proteínas (PARIDA et al., 2004; BEN-AMOR et al., 2006; GILL; TUTEJA, 2010). Na planta, a consequência do estresse reflete-se diretamente na redução do crescimento e produtividade das culturas.

Existem algumas ROS que são classificadas como radicais livres. Essas moléculas são formas reduzidas do oxigênio molecular (O_2), extremamente reativas e que podem causar danos oxidativos a diversos componentes celulares (MITTLER, 2002). Eles incluem o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxílico ($\bullet OH$) e oxigênio “singleto” (1O_2) (MITTLER, 2002).

As ROS possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua estrutura. No processo de respiração celular, o oxigênio (O_2) é completamente reduzido ao longo da cadeia respiratória por quatro elétrons, gerando duas moléculas de água (SOARES; MACHADO, 2007). Entretanto, podem escapar alguns elétrons da cadeia resultando em uma redução parcial do O_2 , formando moléculas reativas (BARTOSZ, 1997; MITTLER, 2002) (Figura 1).

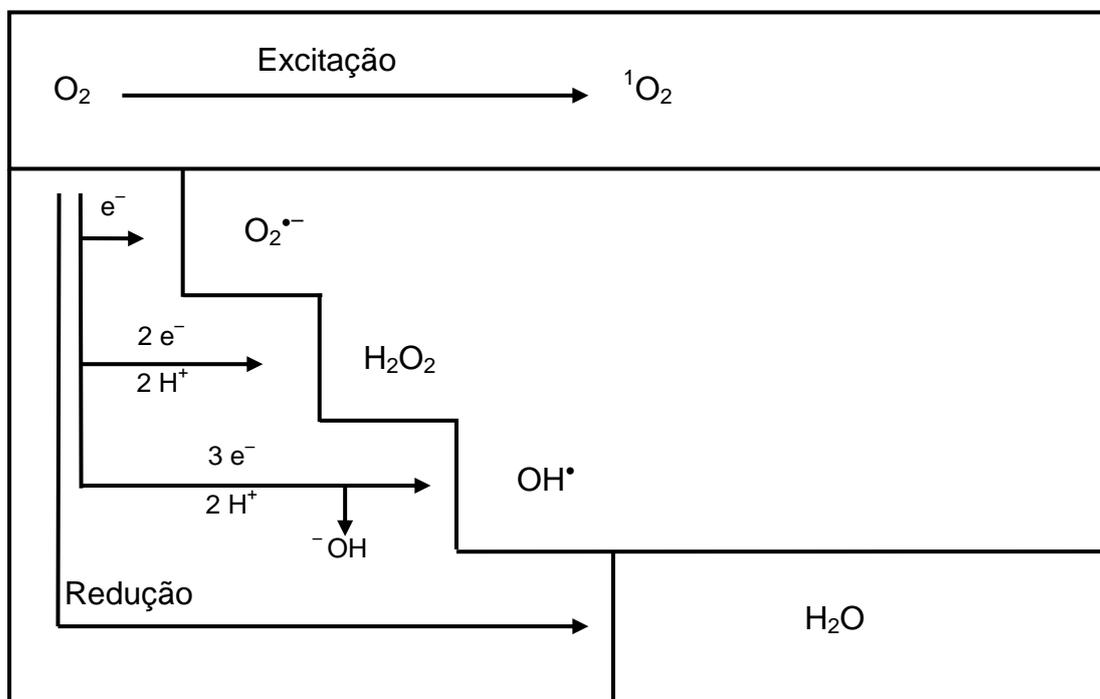


Figura 1. Formação de espécies reativas de oxigênio: oxigênio singleto (1O_2), radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}). Fonte: adaptado de Bartosz, 1997.

O $O_2^{\bullet-}$ é um radical moderadamente reativo que não consegue atravessar as membranas biológicas e é prontamente dismutado a H_2O_2 pela superóxido dismutase (PRASAD, 2004). Os radicais superóxidos podem ser produzidos espontaneamente durante a etapa fotoquímica da fotossíntese, por meio da transferência direta de um elétron de moléculas associadas ao fotossistema I (PSI) para o oxigênio molecular, sob condições de alta relação NADPH/NADP (APEL; HIRT, 2004).

O H_2O_2 é uma molécula moderadamente reativa, que pode atravessar membranas através das aquaporinas (BIENERT et al., 2006). Dessa forma, as ROS produzidos nos cloroplastos e nas mitocôndrias, por exemplo, podem afetar outros compartimentos celulares (LIMA, 2007). Em função de sua mobilidade, o H_2O_2 está envolvido na sinalização de vários estresses abióticos, porém é tóxico quando sua concentração se eleva (DAT et al., 2000).

O H_2O_2 e os $O_2^{\bullet-}$ são considerados menos danosos quando comparados a outras ROS, mas podem gerar espécies extremamente reativas, como os radicais hidroxílicos ($\bullet OH$), que danificam componentes celulares essenciais (ARORA et al., 2002). O OH^{\bullet} é considerado o mais reativo dos radicais de oxigênio, formado a partir do H_2O_2 como resultado das reações de Haber-Weiss ou de Fenton, a partir de catalisadores metálicos como o Fe^{2+} (VAN BREUSEGEM et al., 2001). Os radicais hidroxílicos podem ser formados pela combinação do H_2O_2 com o Fe^{+2} , na reação denominada de “reação de Fenton” (BECANA et al., 1998). O Fe^{+3} , resultante desta reação, pode ser reduzido novamente pelo radical superóxido, provendo substrato para que a “reação de Fenton” continue. O conjunto destas duas reações é conhecido como reação de “Haber-Weiss” (BECANA et al., 1998). Por não existirem mecanismos enzimáticos que consigam eliminar esse radical, o seu excesso pode ocasionar a morte celular (VRANOVÁ et al., 2002).

Outra ROS conhecida é o 1O_2 . Molécula altamente reativa e extremamente prejudicial à planta (MÜLLER et al., 2001). Essa molécula é formada na fotossíntese durante o processo de dissipação do excesso de energia de moléculas de clorofila excitadas associadas ao fotossistema II (MÜLLER et al., 2001). A absorção de luz, de determinado comprimento de onda, resulta na excitação de moléculas de clorofila para o estado singleto, e o excesso de energia deste estado excitado pode ser dissipado pela emissão de calor, fluorescência, processo fotoquímico, ou então, pela formação de clorofila no estado tripleto ($^3Chl^*$) (MÜLLER et al., 2001). O estado tripleto da clorofila pode transferir energia para o oxigênio molecular (O_2), gerando o oxigênio “singleto” (1O_2), que é uma molécula capaz de atravessar membranas biológicas, e é quase

exclusivamente responsável pela peroxidação lipídica em organismos fotossintéticos (TRIANANTAPHYLIDÈS et al., 2008).

Para desintoxicar a célula das ROS, várias estratégias são utilizadas pelas plantas e outros organismos interrompendo as cascatas de oxidação (FOYER; NOCTOR, 2009). Entre os principais mecanismos está a síntese de compostos antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos.

2.3.1 Sistema antioxidativo

O processo pelo qual a planta percebe os diferentes sinais de estresse e os transmite para toda a maquinaria celular é chamado de transdução de sinais (XIONG; ZHU, 2001). Foi necessário às plantas desenvolverem, ao longo da escala evolutiva, essa maquinaria de proteção para manter a homeostase redox celular, resultando em processos como a ação de enzimas do sistema antioxidativo e, síntese de metabólitos de baixo peso molecular, como o ascorbato e a glutatona (STASOLLA, 2010) e a prolina (RADYUKINA et al., 2008) entre outros. Esse complexo sistema constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes atua no combate aos efeitos prejudiciais do acúmulo das ROS (DEWIR et al., 2006), seja na remoção ou na neutralização dessas moléculas.

As enzimas do sistema antioxidante são bastante sensíveis às condições de estresse abiótico e servem, inclusive, como sinalizadoras do estresse. Destacam-se dentre elas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (NOCTOR; FOYER, 1998).

As superóxidos dismutases (SOD, E.C. 1.15.1.1) dismuta o $O_2^{\bullet-}$ ocasionando a formação de outra ROS, o H_2O_2 . As SOD são divididas em três grupos: a CuSOD e ZnSOD (contendo cobre e zinco, respectivamente), são localizadas no citosol e cloroplastos; a FeSOD (contendo ferro), está presente nos cloroplastos e a MnSOD (contendo manganês) é encontrada nas mitocôndrias e peroxissomos (ALSCHER et al., 2002).

As catalases (CAT, E.C. 1.11.1.6) são oxidorreductases encontradas nos glioxissomos e, principalmente, nos peroxissomos. Esta enzima atua na conversão do H_2O_2 à água e oxigênio molecular, liberado durante a β -oxidação de ácidos graxos (HOLTMAN et al., 1994) ou durante a fotorrespiração (IGAMBERDIEV; LEA, 2002). As CAT são responsáveis pela remoção do excesso de ROS durante o estresse,

pois a baixa afinidade pelo H_2O_2 requer a ligação de duas moléculas dessa ROS para que a reação ocorra (MITTLER, 2002; GRATÃO, 2005),

A ascorbato peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11) é considerada a enzima mais importante na eliminação do H_2O_2 de certos compartimentos celulares, como os cloroplastos, onde não existem catalases para atuar nessa função (MITTLER, 2002). A APX oxida duas moléculas de ascorbato na redução do H_2O_2 . O ascorbato oxidado é regenerado pelo ciclo metabólico do ascorbato-glutationa, mediante a ação de outras enzimas (NOCTOR; FOYER, 1998).

Trabalhos sobre estresse múltiplo envolvendo enzimas antioxidativas vêm demonstrando a plasticidade do genoma das plantas submetidas a diferentes condições ambientais (RIZHSKY et al., 2004). A ação combinada do déficit hídrico e elevadas temperaturas resulta em maiores danos a plantas de *Jatropha curcas* do que o estresse por temperatura isoladamente. Essas plantas exibiram uma elevada atividade das enzimas CAT, APX e SOD e apresentaram um balanço redox favorável entre a forma reduzida e oxidada do ascorbato quando o estresse foi induzido apenas pela elevação de temperatura (SILVA et al., 2010).

O estresse múltiplo resulta em diversas respostas metabólicas que variam em função do tipo de estresse aplicado, da espécie e variedade em estudo (WANG et al., 2003; RIZHSKY et al., 2004; SILVA et al., 2010). Em função da diversidade de estratégias de aclimatização é fundamental avaliar os efeitos isolados e combinados de fatores adversos, visando uma compreensão das interações ambientais que afetam o metabolismo e o desempenho vegetal de variedades e espécies de interesse agrônomico.

A compreensão dos mecanismos de tolerância ao estresse múltiplo nas variedades de cana-de-açúcar permitirá direcionar os cruzamentos em programas de melhoramento, visando à obtenção de progênies com maior tolerância, o que aumentará a viabilidade da cultura canavieira nestas áreas.

6.0. REFERÊNCIAS

- 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, p. 1331-1341, 2002.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v. 82, p. 1227-1238, 2002.
- 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**, v. 50, p. 601-639, 1999.
- AZEVEDO, R. A.; CARVALHO, R. F.; CIA, M. C.; GRATÃO, P. L. Sugarcane Under Pressure: An Overview of Biochemical and Physiological Studies of Abiotic Stress. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 42-51, 2011.
- BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 19, p. 47-64, 1997.
- BECANA, M.; MORAN, J. F.; ITURBE-ORMAETXE, I. Iron-dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stress: toxicity and antioxidant protection. **Plant and Soil**, v. 201, p. 137-147, 1998.
- BEN-AMOR, N.; JIMENEZ, A.; MEGDICHE, W.; LUNDQVIST, M.; SEVILLA, F.; ABDELLEY, C. Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 446-457, 2006.
- BERDING, N.; ROACH, B. T. Germplasm collection, maintenance, and use. In: HEINZ, D. J. (ed). **Sugarcane Improvement Through Breeding**. 1987. p. 143-210.
- BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 8, p. 994-1003, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário estatístico da agroenergia 2010**. Brasília, 2011. 225p. (Boletim Técnico).
- CARVALHO, G. **Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli subsp. xyli*, agente causal do aquitismo-das-soqueiras**. 2012. 147 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- CASSELLS, A. C.; CURY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p.145-157, 2001.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. Melhoramento de cana-de-açúcar. **Embrapa informações tecnológicas**, p. 24-49, 2004.

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

CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S. Respuestas de las plantas al estrés múltiple y la habilidad de enfrentarse a un ambiente cambiante. In: REIGOSA-ROGER, M.; PEDROL-BONJOCH, N.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. (eds.). **La Ecofisiología Vegetal. Una ciencia de síntesis**. Paraninfo, Thompson, Madrid, Spain, 2003.

CIA, M. C. **Resposta antioxidativa em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) sob déficit hídrico**. 2010. 90f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

CONAB. Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2012 - Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos>. Acesso em: 02 dezembro 2012.

CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C. **Caracterização agrossocio-econômica da atividade canavieira no Brasil, distribuição espacial na produção mundial entre 1961 e 2003 - situação no Brasil nos entre 1990 e 2002**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2005. 24p. (Documentos, 74)

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. (ed). **Sugarcane Improvement Through Breeding**. 1987. p. 7-84.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 57, p. 779-795, 2000.

DECONTO, J. G. **Aquecimento global e a nova geografia da produção agrícola no Brasil**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária: Unicamp, 2008. 84p.

DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes: production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiology**, v. 141, p. 330-335, 2006.

DEWIR, Y. H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 93-99, 2006.

EMBRAPA. **Aquecimento Global e Cenários Futuros da Agricultura**. Coordenadores: ASSAD, E.; PINTO, H. S. Cepagri/Unicamp, São Paulo, 2008. 84p.

FOYER, C.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. **Antioxid Redox Signal**, v.11, p. 1–45, 2009.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUSAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 436-442, 2006.

GHELFI A., GAZIOLA S. A., CIA M. C., CHABREGAS S. M., FALCO M. C., KUSER-FALCÃO P. R., Azevedo R. A. Cloning, expression, molecular modeling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. *Annals of Applied Biology*, v. 159, p. 267–280, 2011.

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

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

GRENNAN, A. K. Abiotic Stress in Rice. An “Omic” Approach. **Plant Physiology**, v. 140, p. 1139-1141, 2006.

GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomes: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 122-127, 2001.

GRIVET, L.; D'HONT, A.; ROQUES, D.; FELDMANN, P.; LANAUD, C.; GLASZMANN, J. C. RFLP mapping in cultivated Sugarcane (*Saccharum spp.*): genome organization in a highly polyploid and aneuploidy interspecific hybrid. **Genetics**, v. 142, p. 987-1000, 1996.

HARIR, Y.; MITTLER, R. The Ros Signaling Network of Cells. In: DEL RIO, L. A.; PUPPO, A. (eds). **Reactive Oxygen Species in Plants Signaling**. Berlin: Springer-Verlag, 2009. p.165-174.

HUNG, S. H.; YU, C. W.; LIN, C. H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, p. 1-10, 2005.

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**, 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 photosynthetic organism, **Phytochemistry**, v. 60, n. 7, p. 651-674, 2002.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 251-275, 1997.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, SP: RiMa Artes e Texto. 2000. 319p.

LIMA, J. P. M. S. Sincronia entre catalases e peroxidases de ascorbato na proteção contra danos oxidativos em folhas de feijão caupi expostas ao estresse hídrico e salino. 136p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stress: an overview. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 444, p. 139-158, 2005.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 453-467, 2010.

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

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

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 15-19, 2006.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, v. 167, n. 3, p. 645-663. 2005.

MØLLER, I. M. Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561-591, 2001.

MÜLLER, P.; LI, X.-P.; NIYOGI, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1558-1566, 2001.

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

NOCTOR, G.; DUTILLEUL, C.; DE PAEPE, R.; FOYER, C. H. Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, 36 stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 394, p. 49-57, 2004.

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

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MOHANTY, P. Investigations on the oxidative defense responses to NaCl stress in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential regulations of isoforms of some antioxidative enzymes. **Plant Growth Regulation**, v. 42, p. 213-226, 2004.

PITMAN, M. G.; LAÜCHLI, A. Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: LAÜCHLI, A.; LÜTTGE, U. (eds). **Salinity: Environment-Plants-Molecules**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2002. p. 3-20.

PRASAD, M. N. V. Radicales libres (FR¹) Y species reactivas del oxígeno (ROS²). In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; SÁNCHEZ, A. **La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis**. Madrid: Thompson, 2004. p. 775-790.

QUIANG, L.; NANMING, Z.; YAMAGUCHSHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. **Chinese Science Bulletin**, v. 45, n. 11, p. 970-975, 2000.

RADYUKINA, N. L.; SHASHUKOVA, A. V.; SHEVYAKOVA, N. I.; KUZNETSOV, VI. V. Proline Involvement in the Common Sage Antioxidant System in the Presence of NaCl and Paraquat. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 55, n. 5, p. 649-656, 2008.

RIDESA – Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Boletim Técnico de Lançamento de novas variedades RB de Cana-de-açúcar**. (Ed.: SIMÕES-NETO, D. E.; MELO, L. J. O.; CHAVES, A.; LIMA, R. O. R.). Recife: Imprensa Universitária da UFRPE, 28p. 2005. (Boletim Técnico Nº 1).

RIDESA. **Catálogo Nacional de variedades RB de cana-de-açúcar**, 2010a.

RIDESA. **Liberação Nacional de novas variedades RB de cana-de-açúcar**, 2010b.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITTLER, R. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. **Plant Physiology**, v. 134, p. 1683-1696, 2004.

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, 1995. 99p. (Apostila)

SACILOTO, R. F. Z. **Inserção do gene PR5K em cana-de-açúcar visando induzir resistência ao fungo da ferrugem *Puccinia melanocephala***. 2003. 74 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SEAGRI – **Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária da Bahia**, 2007. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/programas.asp?qact=viewprogram&prgid=49>>. Acesso em: 22 out. 2010.

SHAO, H. B.; GUO, Q. J.; CHU, L. Y.; ZHAO, X. N.; SU, Z. L.; HU, Y. C.; CHENG, J. F. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 54, p. 37-45, 2007.

SILVA, E. N.; RIBEIRO, R. V.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIÉGAS, R. A.; SILVEIRA, J. A. G. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Arid Environments**, v. 74, p. 1130-1137, 2010.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Tropicã**, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

STASOLLA, C. Glutathione redox regulation of in vitro embryogenesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 319-327, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Sunderland: Sinauer Associates, v. 2004. 798p.

TRIANANTAPHYLIDÈS, C.; KRISCHKE, M.; HOEBERICHTS, F. A.; KSAS, B.; GRESSER, G.; HAVAUX, M.; VAN BREUSEGEM, F.; MUELLER, M. J. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. **Plant Physiology**, v. 148, p. 960-968, 2008.

UNICA/União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br/portalunica/?Secao=referencia>>. Acesso em: 9 mai. 2010.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVA, E.; DAT, J. F.; INZE, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001.

VRANOVÁ, E.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress. **Journal Experimental Botany**, v. 53, p. 1227-1236, 2002.

VIDAL, M. F. **Produção e área colhida de cana-de-açúcar no Nordeste**. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE, 2010. 10p. (Informe rural ETENE, 20).

WANG, W.; VINO CUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, p. 1-14, 2003.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer**, v. 6, p. 1-23, 2010.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. **Physiologia Plantarum**, v. 112, n. 2, p. 152-166, 2001.

XIONG, L.; LEE, H.; ISHITANI, M.; ZHU, J. K. Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 10, p. 8588-8596, 2002.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant Cell Environment**, v. 25, n. 2, p. 131-139, 2002.

ZHU, J. K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 2, p. 66-71, 2001.

CAPÍTULO II

METABOLISMO ANTIOXIDATIVO EM VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB ESTRESSE HÍDRICO E SALINO

Trabalho a ser enviado para a Revista Biologia Plantarum

Metabolismo antioxidativo em variedades de cana-de-açúcar sob estresse hídrico e salino

¹M.B. MORAIS*, R.A. AZEVEDO** e L.G. WILLADINO*

*Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife CEP: 52171-900 PE, Brasil**

*Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, CEP13400-970, SP, Brasil***

Resumo

A produção vegetal é influenciada por um grande número de fatores ambientais que podem gerar estresse oxidativo, afetando o equilíbrio redox celular. O cultivo da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é um dos mais importantes agronegócios do Brasil. Objetivou-se neste trabalho identificar a resposta antioxidante de variedades de cana-de-açúcar sob condições adversas. Mudanças de seis genótipos, procedentes de micropropagação, foram submetidas à avaliação da ação isolada e combinada do estresse hídrico e salino. Avaliou-se o a peroxidação lipídica, o teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o teor relativo de água (TRA) e ação do sistema de defesa antioxidativo mediante a atividade da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT). As variedades RB 867515 e RB 99395 apresentaram-se mais eficientes quanto a resposta ao estresse e a manutenção de conteúdo hídrico celular nos estresses isolados. Tanto essas variedades quanto as mais sensíveis exibiram maior peroxidação lipídica e/ou maior concentração de peróxido de hidrogênio quando submetidas ao estresse combinado. As enzimas apresentaram respostas diferenciadas de acordo com a variedade e intensidade de estresse nos tratamentos isolados, no entanto, podem ter sido inativadas perante o estresse combinado. Esses resultados indicam que a resposta do estresse combinado é diferente da soma das respostas dos fatores abióticos aplicados isoladamente.

Palavras-chave: ascorbato peroxidase, catalase, estresse oxidativo, peróxido de hidrogênio, salinidade, superóxido dismutase

Abreviações: APX – ascorbato peroxidase, BSA – bovino serum albumin, CAT – catalase, EDTA – ácido Etilenodiaminatetracético, MDA – malondialdeído, NBT – nitroblue tetrazolium, TRA – teor relativo de água, ROS – espécies reativas de oxigênio, SOD – superóxido dismutase, PVPP – polivinilpolipirrolidona.

Agradecimentos: Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida à primeira autora e financiamento da pesquisa (PBPG-0924-5.01/10).

**Autor para correspondência:* willadino.lilia@gmail.com

Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura tropical e subtropical que se destaca como uma das espécies mais cultivadas no Brasil. Possui grande importância econômica associada principalmente à produção de açúcar e etanol (Azevedo *et al.* 2011), combustível que possui potencial para atender a crescente demanda por energia renovável (Goldemberg 2007).

O cultivo de cana-de-açúcar na região Nordeste é praticado, tradicionalmente, nas zonas úmidas de Mata e Litoral, mas vem se expandindo para regiões semiáridas (Seagri 2007), expondo a cultura a um ambiente mais propício à combinação de estresses abióticos como salinidade e déficit hídrico. Esses fatores podem alterar a absorção de água e a permeabilidade das membranas, o que em conjunto pode provocar mudanças no metabolismo e na produção das moléculas oxidantes.

Os efeitos do estresse abiótico sobre as plantas vêm sendo estudados ao longo do tempo, entretanto, a maioria dos estudos está focada na resposta da planta a um único estresse abiótico, sob condições controladas. Em contraste, em condições de campo, as plantas são submetidas a mais de um tipo de estresse simultaneamente (Rizhsky *et al.* 2004).

Esses estresses isolados ou combinados podem desencadear o estresse oxidativo. Nas plantas, esses estímulos estão sempre associados a uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas em nível celular (Gratão *et al.* 2005, Farooq *et al.* 2009). Fatores como duração e severidade do estresse, bem como o genótipo analisado, podem influenciar diretamente na resposta das plantas (Chaves *et al.* 2003, Ghelfi *et al.* 2011).

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre os níveis endógenos de compostos antioxidantes e compostos oxidantes ocasionando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species - ROS) (Cassells e Cury 2001). As ROS são subprodutos do metabolismo celular regular e ocorrem naturalmente em organelas como cloroplastos e mitocôndrias (Noctor *et al.* 2004, Soares e Machado 2007). Quando em baixas concentrações, elas podem atuar como moléculas sinalizadoras nos processos de crescimento e desenvolvimento celular (Del Rio *et al.* 2006). O excesso dessas moléculas potencialmente citotóxicas favorece reações com diferentes componentes celulares, resultando em danos e mesmo morte celular (Harrir e Mitller 2009).

A sobrevivência das plantas a condições adversas é resultante da evolução de mecanismos como as respostas metabólicas e a habilidade na percepção dos sinais ambientais externos (Fujita 2006). Entre essas respostas, a capacidade de ativar o sistema antioxidante é um dos principais mecanismos que permite à planta tolerar o estresse oxidativo (Azevedo *et al.* 2011). Esse sistema complexo atua de forma coordenada e é composto por um grande número de compostos

antioxidantes hidrofílicos além de enzimas antioxidantes, das quais as mais importantes são as superóxido dismutases (SOD), as catalases (CAT) e as ascorbato peroxidases (APX) (Miller *et al.* 2008, 2010).

A compreensão dos mecanismos de tolerância a estresses ambientais em cana-de-açúcar é um desafio que deve agregar esforços para possibilitar a seleção de cultivares mais adaptados, visando maior produtividade agrícola. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estudar a resposta do sistema antioxidativo de variedades de cana-de-açúcar frente ao estresse isolado e combinado causado pelo déficit hídrico e pela salinidade.

Material e métodos

Material Vegetal e obtenção de plantas: Foram utilizadas seis variedades “RB” (República Brasileira) de cana-de-açúcar, micropropagadas, obtidas da SBW do Brasil Agrifloricultura Ltda. As variedades utilizadas foram: RB 966928, RB 98710, RB 855453, RB 99395, RB 867515 e RB 855156. As plantas foram aclimatadas em condições de casa de vegetação, selecionadas e cultivadas em tubetes plásticos em forma de cone, com capacidade de 115 cm³, contendo areia lavada.

Estratégia experimental: Foi elaborada uma abordagem experimental envolvendo dois diferentes agentes: o estresse hídrico e o salino em condição de ambiente natural de casa de vegetação, no campus Recife da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizada na Zona da Mata pernambucana, com temperaturas médias de 30,1±2,7 °C durante o dia e 28,8±1,3 °C durante a noite, com fotoperíodo natural e UR média de 65±5,5%.

Após a aclimação, foram estabelecidos os tratamentos. As plantas dos grupos T1 e T2 permaneceram irrigadas diariamente com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com metade da sua força iônica. As plantas dos grupos T3 e T4 receberam solução nutritiva acrescida de NaCl na concentração de 50 mM e condutividade elétrica de, aproximadamente, 5,8 dS/m. Ocorreu suspensão de rega no 9º dia em T2 e T4. Portanto, as condições de cultivo foram: T1= tratamento sem NaCl com rega contínua (Controle); T2= tratamento sem NaCl com suspensão de rega (estresse hídrico); T3= rega contínua com solução salina (estresse salino); e T4= suspensão de rega após estresse salino (estresse salino+hídrico).

O período experimental teve duração de 12 dias e o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 4 (seis variedades e quatro condições de cultivo), com quatro repetições, sendo cada uma composta de uma planta por tubete. Para a análise estatística foi

utilizado o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2008) e aplicado o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Após a coleta, parte do material vegetal foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido a -20°C até a realização das análises.

Características Avaliadas:

Teor relativo de água (TRA): O TRA foi determinado seguindo o método de Cairo (1995). Em cada repetição foram retiradas seis amostras da região central da folha, acondicionadas em gelo e rapidamente transferidas para o laboratório. A determinação da massa fresca (MF) foi realizada em balança analítica em um período de até duas horas após a excisão. Essas amostras foram então mantidas em água deionizada durante 24 h e após remoção do excesso de água em papel filtro, foi obtido a massa túrgida (MT). Após isso, as amostras foram secas a 70 °C por 48 h (MS) para determinação da massa seca do tecido. Os valores do TRA foram determinados pela equação: $(MF-MS)/(MT-MS) \times 100$.

Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂): O peróxido foi quantificado segundo protocolo de Alexieva *et al.* (2001). As amostras frescas foram maceradas com ácido tricloroacético (TCA) 0,1% na relação de 1 g/10 mL (w:v). As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 min, a 4 °C. Do sobrenadante, foram retirado 200 µL ao qual foram adicionado 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de iodeto de potássio. As amostras permaneceram em gelo e no escuro durante uma hora. Após este período, as amostras foram retiradas do gelo e mantidas em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

Quantificação de malondialdeído (MDA): A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com Health e Packer (1968), com modificações. A reação foi determinada através da produção de MDA, um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Amostras biológicas foram maceradas em TCA 0,1% na proporção de 0,2 g/2mL de tampão, juntamente com 20% de PVPP (polivinilpolipirrolidona). Após homogeneização, a amostra foi centrifugada a 10.000g durante 5 min. Foi retirado do sobrenadante 0,25 mL e transferido para outro tubo juntamente com 1,0 mL de solução contendo 20% de TCA e 0,5% de TBA. A mistura foi mantida em banho-maria a 95 °C durante 30 min e, em seguida, passou por rápido resfriamento por 10 min. Antes da leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm, as amostras foram centrifugadas por mais 10 min a 10.000g.

Extração de proteínas: Amostras congeladas foram maceradas e homogeneizadas com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 1 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), 3 mM de DL-ditioneitol e 20% de PVPP sob temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na relação de 1 g/3 mL (w:v) (Azevedo *et al.* 1998). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000g durante 30 min e o sobrenadante separado em alíquotas e mantido armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a determinação das atividades enzimáticas.

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. A reação foi realizada com adição de 20 μL de amostra (previamente diluída) a 1 mL do reagente de Bradford e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

Atividade da catalase (CAT): A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Havir e Mchale (1987) com modificações conforme Azevedo *et al.* (1998). Em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 25 μL do extrato proteico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H_2O_2 por 60 segundos, através das alterações a 240 nm, sob temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, em espectrofotômetro.

Ascorbato peroxidase (APX): A atividade da APX foi determinada conforme descrito por Nakano e Asada (1981). O meio de reação composto por 650 μL de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,5, 100 μL de ascorbato 5 mM, 100 μL de EDTA 1 M, 100 μL de H_2O_2 1 mM e 50 μL do extrato protéico. A atividade da APX foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 60 segundos, em espectrofotômetro.

Atividade de superóxido dismutase (SOD): O protocolo foi padronizado de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Por esse método, é determinada a inibição da redução do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. A solução de reação (3 mL) foi constituída de 85 mM de tampão fosfato (pH 7,8), 75 μM de NBT, 5 μM riboflavina, 13 mM de metionina, 0,1 mM EDTA e 50 μl de extrato enzimático. A solução foi adicionada em tubos de vidro e irradiada com luz branca (lâmpada fluorescente de 15 W) por 5 min. Após esse período de exposição, a solução foi analisada por espectrofotômetro a 560 nm.

Resultados e discussão

A análise do TRA é considerada por Pimentel (2004) indispensável para avaliação do status hídrico do vegetal. O estresse hídrico provocou redução do TRA em todas as variedades, os menores valores ocorreram nas variedades RB 98710 e RB 855453 com TRA de 70%. Sob estresse salino o valor do TRA não foi inferior a 75%, o que indica que as variedades de cana-de-açúcar apresentaram uma perda moderada de água. A capacidade das variedades RB 99395, RB 867515 e RB 855156 de restringir a perda de água, em situações de estresse hídrico e salino ou combinado, pode ser evidenciada pelos altos valores de TRA (Fig. 1). Essas variedades mantiveram elevado conteúdo de água nos diferentes tratamentos. Trabalhos com diferentes genótipos de cana-de-açúcar (HOCP85-845, TCP02-4587, TCP02-4620 e US01-40), evidenciaram que as menores reduções de TRA caracterizam as variedades tolerantes ao estresse (Silva *et al.* 2007).

Sob estresse múltiplo ocorreram as maiores perdas de água, sobretudo nas variedades RB 966928 e RB855453, que apresentaram um TRA de, aproximadamente, 60%, evidenciando a severidade da associação dos dois tipos de estresse. A variedade RB 966928 apresentou, paralelamente ao baixo TRA, elevado dano às membranas (alto teor de MDA) e elevado teor de H₂O₂ (Fig. 2 e 3). Este mesmo comportamento foi observado, por outros autores, nas variedades SP90-3414 e SP90-1638 de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico (Cia *et al.* 2012). Na maioria das variedades há uma correlação negativa, altamente significativa ($\geq 0,5$), entre o teor relativo de água e o teor de H₂O₂, evidenciando os efeitos nocivos do acúmulo dessa espécie reativa de oxigênio.

O acúmulo de H₂O₂ (Fig. 3) contribuiu ativamente para a peroxidação dos lipídeos de membrana como indicado pelo aumento no nível de MDA observado tanto nos estresses isolados como no combinado (Fig. 2). A análise de MDA é amplamente utilizada como indicadora da ocorrência de estresse oxidativo, uma vez que esse composto é resultado da reação entre as ROS e ácidos graxos poliinsaturados (Gratão *et al.* 2005).

O incremento da atividade das enzimas de defesa do estresse oxidativo SOD, CAT e APX apresentou uma correlação positiva altamente significativa (0,66 a 0,96) nas variedades RB 867515 e RB 99395. O aumento da atividade conjunta da SOD, geradora de H₂O₂, com a CAT e APX, eliminadoras de H₂O₂, é fundamental para a manutenção do equilíbrio redox, corroborando os resultados encontrados por outros autores (Nayyar e Gupta 2006, Wang *et al.* 2009, Cia 2010). O aumento da atividade da CAT e da APX foi observada na variedade RB 867515 sob estresse salino concomitantemente com a menor redução do peso fresco e do teor de clorofila caracterizando esta variedade como mais tolerante do que a variedade RB863129 (Willadino *et al.* 2011).

Em função dessa elevada atividade conjunta das enzimas SOD, CAT e APX nas variedades RB 867515 e RB 99395 (Fig. 4, 5 e 6) não houve, conseqüentemente, aumento no teor de MDA nas plantas submetidas a estresses isolados (Fig. 2 e 3). A tolerância da variedade RB 867515 ao estresse hídrico foi verificada também por outros autores considerando outras variáveis (Dellabiglia *et al.* 2010, Embrapa 2011, Picoli *et al.* 2012). Em situação de estresse combinado a variedade RB 867515 também se destaca como a única a manter elevada atividade da CAT e APX, garantindo baixos teores de H₂O₂, baixa peroxidação lipídica e elevado valor de TRA, este conjunto de variáveis converge na manutenção dos processos fisiológicos e crescimento da planta. Em contrapartida, na variedade RB 99395 ocorreu um colapso no sistema antioxidativo durante o estresse combinado, resultando na baixa atividade da CAT e da APX (Fig. 5 e 6) com o conseqüente aumento do teor de H₂O₂ e de MDA. A inibição da maquinaria antioxidante pode também levar ao acúmulo de ROS que podem ser relocadas em compartimentos celulares específicos (Torres 2010).

Um comportamento interessante das enzimas antioxidantes, em resposta ao estresse, foi observado na variedade RB 966928. Nesta variedade, apenas a SOD apresentou alta atividade provavelmente decorrente de alta produção do O₂⁻ causada pelo estresse. O incremento da atividade da SOD, entretanto, não foi acompanhado na mesma proporção pelas enzimas CAT e APX (Fig. 4, 5 e 6), o que explica os elevados níveis de H₂O₂ observados (Fig. 3). Sabe-se que a SOD é responsável pela formação direta de H₂O₂ (Apel e Hirt 2004, Sankar *et al.* 2007), que também é uma molécula tóxica e precisa da ação de outras enzimas para ser reduzida a H₂O e O₂ (Monteiro *et al.* 2011). A SOD é, portanto, considerada uma enzima chave envolvida a partir da detecção de estresse (Gratão *et al.* 2005).

A variedade RB 855453 exibiu características diferentes das demais por apresentar elevada atividade enzimática da SOD, da CAT e da APX mesmo no tratamento controle. Sob condições de estresse a atividade dessas enzimas foi aumentada resultando em reduzido teor de H₂O₂ e MDA. O TRA, entretanto, foi baixo atingindo, sob estresse múltiplo, o valor de 56 %, o que indica uma condição de estresse hídrico. Esses resultados apontam, portanto, para elevada transpiração nesta variedade. Esta suposição é confirmada considerando-se que esta variedade foi considerada sensível ao estresse hídrico com base nas variáveis de condutância estomática e potencial hídrico foliar que se mostraram, entre distintas variáveis fisiológicas, as mais adequadas para distinção entre tolerância e sensibilidade em cana-de-açúcar (Dellabiglia *et al.* 2010).

Para a maioria das variedades estudadas, o estresse hídrico e salino combinados foi mais severo do que a aplicação desses estresses isoladamente, o que se reflete nas maiores reduções do TRA e de maiores teores de H₂O₂ e MDA. Quanto à atividade das enzimas do estresse oxidativo,

ocorreu redução na atividade da SOD e da CAT na maioria das variedades, o que sugere inativação destas enzimas. Altos níveis de H₂O₂ podem danificar organelas e também inativar a SOD (Halliwell 1974).

Os níveis elevados no teor de MDA associado ao baixo TRA podem ser indicadores efetivos de sensibilidade a estresse múltiplo em variedades de cana-de-açúcar. O comportamento das enzimas nas variedades RB 867515 e RB 99395 perante uma situação de estresse mostrou que há uma sincronia entre os sistemas antioxidantes enzimáticos da SOD, CAT e APX na regulação e desintoxicação das ROS produzidas na célula vegetal, durante situações de estresse ambiental. No geral, os resultados apresentados sugerem que os danos provocados pelos estresses isolados podem estar relacionados a um estresse oxidativo, mas ficou evidente que a combinação desses estresses causa maiores danos que podem inclusive inibir a ação de enzimas. O comportamento das variedades sugere respostas diferenciais frente ao controle das ROS e do estresse oxidativo.

Referências

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E.: The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. - *Plant Cell Env.* **24**: 1337-344, 2001.
- Apel, K., Hirt, H.: Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. - *Annu Rev Plant Biol.* **55**: 373-399, 2004.
- 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 fumigation, in leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. - *Physiol Plant.* **104**: 280-292, 1998.
- Azevedo, R.A., Carvalho, R.F., Cia, M.C., Gratão, P.L.: Sugarcane Under Pressure: An Overview of Biochemical and Physiological Studies of Abiotic Stress. - *Trop. Plant Biol.* **4**: 42-51, 2011.
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. - *Anal. Biochem.* **72**: 248-254, 1976.
- Cairo, P.A.R.: Curso básico de relações hídricas de plantas. - UESB, Vitória da conquista. 1995. 32p.
- Cassells, A.C., Cury, R.F.: Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. - *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **64**: 145-157, 2001.
- Chaves, M.M., Maroco, J., Pereira, J.S.: Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. - *Funct Plant Biol.* **30**: 239-264, 2003.
- Cia, M.C.: Resposta antioxidativa em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob déficit hídrico. 2010. 90 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- Cia, M.C., Guimarães, A.C.R., Medici, L.O., Chabregas, S.M., Azevedo, R.A.: Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. - *Anna Appl Biol.* **161**: 313-324, 2012.
- Dellabiglia, W.J., Silva, M.A., Pincelli, R.P., Rhein, A.F.L., Arantes, M.T., Santos, C.M., Sorrilla, P.F., Bassetto, S.C.: Avaliação de tolerância à seca em cultivares comerciais de cana-de-açúcar por meio de marcadores morfo-fisiológicos. ISBN: 978-85-7029-093-9. Anais, 4º Congresso Internacional de Iniciação Científica – CIIC, 2010. Instituto Agrônomo-IAC, Campinas/SP.

- Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B.: Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes: production, scavenging, and role in cell signaling. - *Plant Physiol* **141**: 330-335, 2006.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2011. Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html. Acessado em: 28/01/2013.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A.: Plant drought stress: effects, mechanisms and management. - *Agron. Sustain. Dev.* **29**: 185-212, 2009.
- Ferreira, D.F.: SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. - *Rev. Sympos.* **6**: 36-41, 2008.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.: Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. - *Curr Opin Plant Biol* **9**: 436-442, 2006.
- Ghelfi A., Gaziola S.A., Cia M.C., Chabregas S. M., Falco M.C., Kuser-Falcão P.R., Azevedo R.A. Cloning, expression, molecular modeling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. *Ann Appl Biol.* **159**: 267-280, 2011.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K.: Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. - *Plant Physiol* **59**: 309-314, 1977.
- Goldemberg, J.: Ethanol for a sustainable energy future. - *Science* **315**: 808-810, 2007. Graça, J.P., Rodrigues, F.A., Farias, J.R.B., Oliveira, M.C.N., Hoffmann-Campo, C.B., Zingaretti, S.M.: Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. - *Braz. J. Plant Physiol.* **22**: 189-197, 2010.
- Gratão P.L., Polle A., Lea P.J., Azevedo R.A.: Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. - *Funct. Plant Biol.* **32**: 481-494, 2005.
- Halliwell B.: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problems of living with oxygen. - *New Phytol.* **73**: 1075-1086, 1974.
- Harris, Y., Mittler, R.: The ROS Signaling Network of Cells. - In: Del Rio, L.A., Puppò, A. (ed.): *Reactive oxygen species in plants signaling*. Pp. 165-174. Springer-Verlag - Berlin 2009.
- Havir, E.A., Mchale, N.A.: Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. - *Plant Physiol* **84**: 450-455, 1987.
- Heath, R.L., Packer L.: Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. - *Arch. Biochem. Biophys.* **125**: 189-198, 1968.
- Hoagland, D., Arnon, D.I.: The water culture method for growing plants without soil. California Agriculture Experimental Station Circular, 1950, 347 p.
- Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R.: Reactive oxygen signaling and abiotic stress. - *Physiol Plant.* **133**: 481-489, 2008.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R.: Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. - *Plant Cell Environ.* **33**: 453-467, 2010.
- Monteiro, C.C., Carvalho, R.F., Gratão, P.L., Carvalho, G., Tezotto, T., Medici, L.O., Peres, L.E.P., Azevedo, R.A.: Biochemical responses of the ethylene-insensitive Never ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. - *Environ. Exp. Bot.* **71**: 306-320, 2011.
- Nakano, Y., Asada, K.: Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. - *Plant Cell Physiol* **22**: 867-880, 1981.
- Nayyar, H., Gupta, D.: Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. - *Environ. Exp. Bot.* **58**: 106-113, 2006.
- Noctor, G., Dutilleul, C., De Paepe, R., Foyer, C. H.: Use of mitochondrial electron transport mutants to evaluate the effects of redox state on photosynthesis, stress tolerance and the integration of carbon/nitrogen metabolism. - *Journal of Experimental Botany.* **55**: 49-57, 2004.
- Pimentel, C. (ed.): *A relação da planta com a água*. - Seropédica: EDUR, 2004. 191 p.

- Picoli, M.C.A., Lamparelli, R.A., Sano, E.E., Rocha, J.V.: Imagens multipolarizadas do sensor Palsar/Alos na discriminação das fases fenológicas da cana-de-açúcar. - *Pesq. agropec. bras.* [online]. **47**: 1307-1316, 2012.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R.: When Defense Pathways Collide. The Response of to a Combination of Drought and Heat Stress. - *Plant Physiol* **134**: 1683-1696, 2004.
- Sankar, B., Jaleel, C.A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Panneerselvam, R.: Effect of paclobutrazol on water stress amelioration through antioxidants and free radical scavenging enzymes in *Arachis hypogaea* L. - *Colloid Surface B.* **60**: 229-235, 2007.
- Seagri – Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária da Bahia, 2007. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/programas.asp?qact=view_program&prgid=49>. Acesso em: 22 out. 2010.
- Silva, M.A., Jifon, J.L., Silva, J.A.G., Sharma, V.: Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. - *Braz. J. Plant Physiol.* **19**: 193-201, 2007.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K.: Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. - *J. Exp. Bot.* **53**: 1305-1319, 2002.
- Soares, A.M.S., Machado, O.L.T.: Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. - *Revista Trópica.* **1**: 9-19, 2007.
- Torres, M.A.: ROS in biotic interactions. - *Physiol Plant.* **138**: 414-429, 2010.
- 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 Physiol Biochem* **47**: 570-577, 2009.
- Willadino, L., Camara, T.R.: Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. - *Enc. Biosf. Cent. Cient. Conhec.* **6**: 1-23, 2010.
- Willadino, L., Oliveira Filho, R.A, Silva Junior, E.A, Gouveia Neto, A. and Camara, T.R: Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. - *Revista Ciência Agronômica* **42**: 417-422., 2011.

Figuras

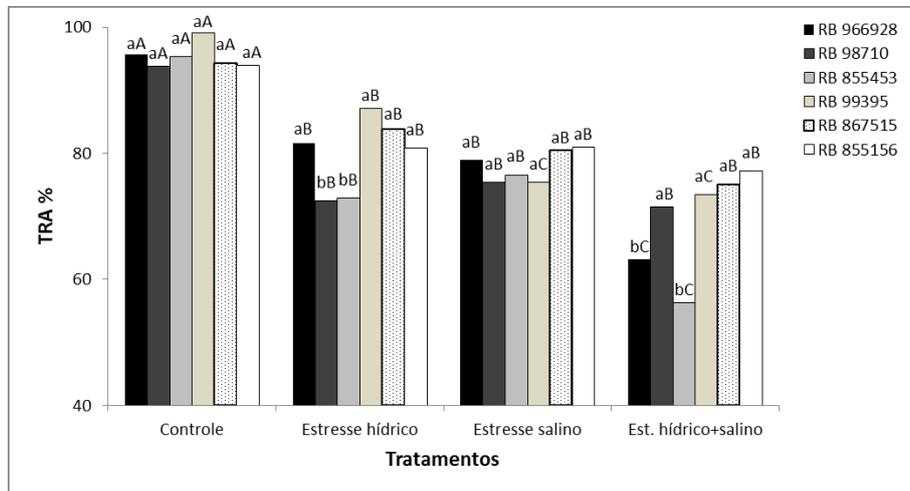


Fig. 1. Teor relativo de água (TRA%) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação sob diferentes regimes de estresse: T1= tratamento sem NaCl com rega contínua (Controle); T2= tratamento sem NaCl com suspensão de rega (estresse hídrico); T3= rega contínua com solução salina (estresse salino); e T4= suspensão de rega após estresse salino (estresse salino+hídrico). (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

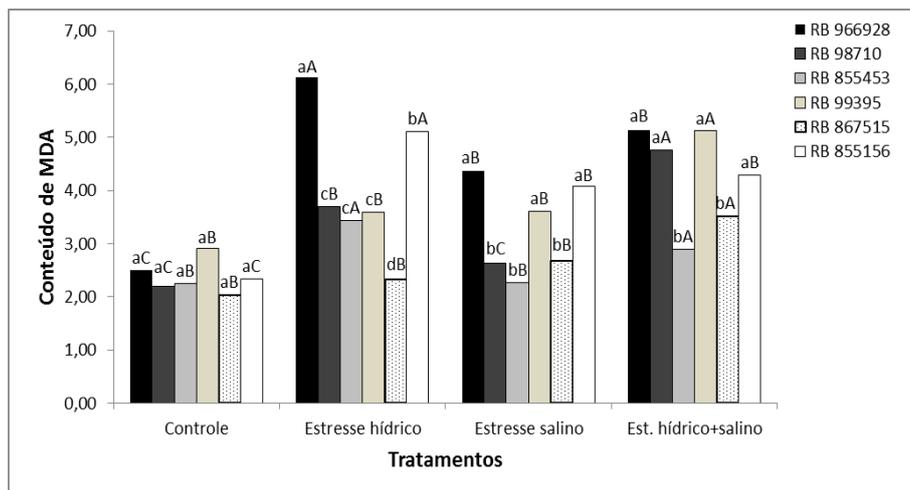


Fig. 2. Peroxidação lipídica expressa pelo teor de MDA ($\mu\text{mol/g MF}$) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação sob diferentes regimes de estresse: T1= tratamento sem NaCl com rega contínua (Controle); T2= tratamento sem NaCl com suspensão de rega (estresse hídrico); T3= rega contínua com solução salina (estresse salino); e T4= suspensão de rega após estresse salino (estresse salino+hídrico). (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

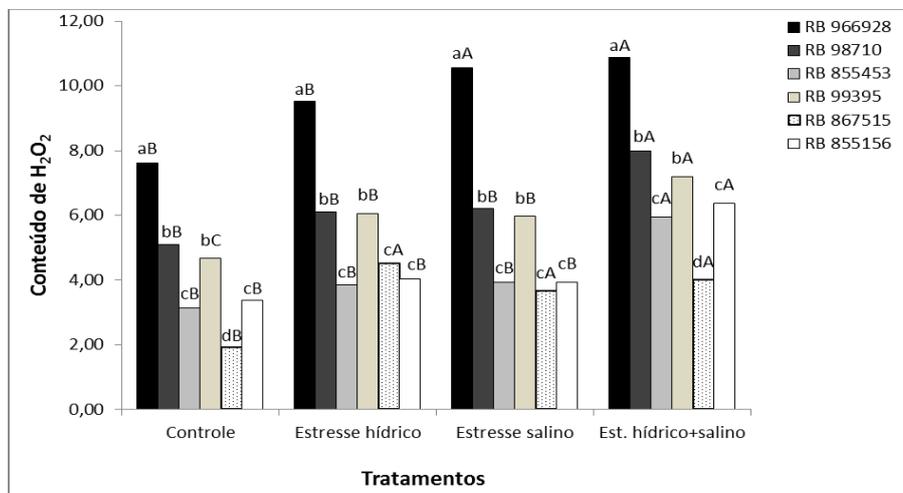


Fig. 3. Teor de H₂O₂ (µmol/g MF) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação sob diferentes regimes de estresse: T1= tratamento sem NaCl com rega contínua (Controle); T2= tratamento sem NaCl com suspensão de rega (estresse hídrico); T3= rega contínua com solução salina (estresse salino); e T4= suspensão de rega após estresse salino (estresse salino+hídrico). (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

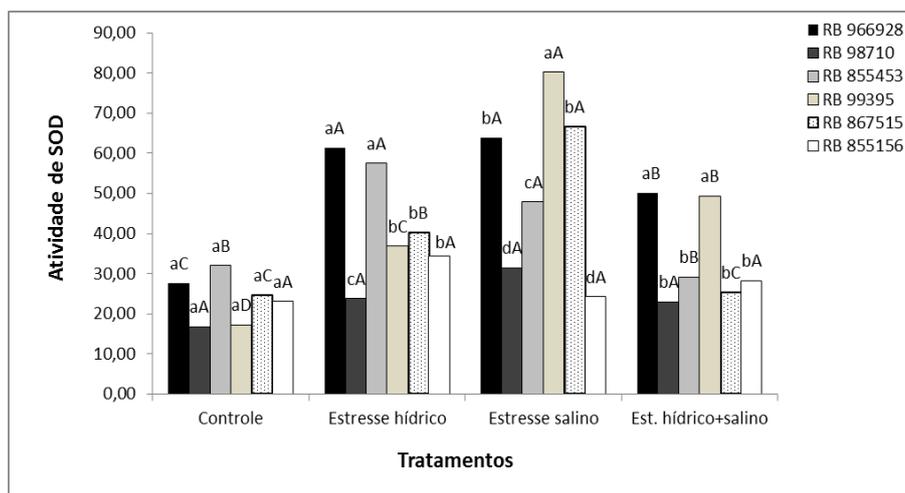


Fig. 4. Atividade da SOD (U SOD mg prot.⁻¹) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação sob diferentes regimes de estresse: T1= tratamento sem NaCl com rega contínua (Controle); T2= tratamento sem NaCl com suspensão de rega (estresse hídrico); T3= rega contínua com solução salina (estresse salino); e T4= suspensão de rega após estresse salino (estresse salino+hídrico). (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

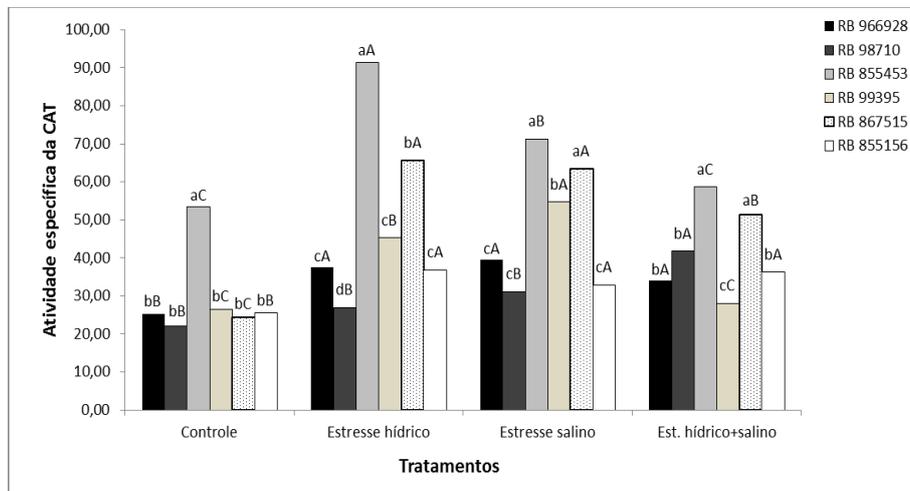


Fig. 5. Atividade da CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação sob diferentes regimes de estresse: T1= tratamento sem NaCl com rega contínua (Controle); T2= tratamento sem NaCl com suspensão de rega (estresse hídrico); T3= rega contínua com solução salina (estresse salino); e T4= suspensão de rega após estresse salino (estresse salino+hídrico). (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

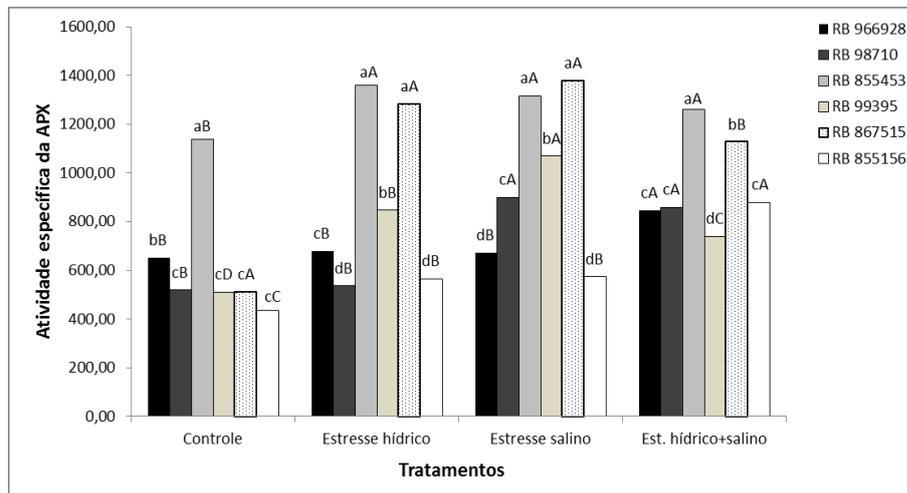


Fig. 6. Atividade da APX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas a condições de casa de vegetação sob diferentes regimes de estresse: T1= tratamento sem NaCl com rega contínua (Controle); T2= tratamento sem NaCl com suspensão de rega (estresse hídrico); T3= rega contínua com solução salina (estresse salino); e T4= suspensão de rega após estresse salino (estresse salino+hídrico). (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

CAPÍTULO III

EFEITO DO ESTRESSE MÚLTIPLO NO METABOLISMO OXIDATIVO DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR

Trabalho a ser enviado para a Revista Crop Breeding and Applied Biotechnology

Efeito do estresse múltiplo no metabolismo oxidativo de variedades de cana-de-açúcar

Marciana Bizerra de Moraes¹, Ricardo Antunes de Azevedo² e Lilia Willadino¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Rua Dom Manoel de Medeiros S/N, CEP: 52171-900. Bairro de Dois Irmãos, Recife, Pernambuco – Brasil. * Autor correspondente: lilia.willadino@bol.com.br

² Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, CEP13400-970, SP, Brasil

Efeito do estresse múltiplo no metabolismo oxidativo de variedades de cana-de-açúcar

Resumo – A exposição de plantas a condições de estresse múltiplo pode causar uma superprodução de espécies reativas de oxigênio causando desequilíbrio no sistema redox. Objetivou-se neste trabalho estudar a importância do sistema antioxidante na proteção contra danos oxidativos induzidos por estresses isolados e múltiplos. Mudanças micropropagadas de cana-de-açúcar de seis genótipos (RB 966928, RB 98710, RB 855453, RB 99395, RB 867515 e RB 855156) foram submetidas a avaliação da ação isolada do estresse por alta temperatura e da combinação com o estresse hídrico e salino. Avaliou-se a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), bem como a peroxidação lipídica (teor de MDA) e teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), indicadores de estresse. A variedade RB 867515 destacou-se por garantir sincronia entre a atividade enzimática na regulação e desintoxicação das ROS, produzidas na célula vegetal durante situações de estresse ambiental, garantindo a manutenção do teor relativo de água e, conseqüentemente, a manutenção dos processos fisiológicos e o crescimento da planta.

Palavras-chave: ascorbato peroxidase, catalase, estresses abióticos, *Saccharum*, superóxido dismutase

Introdução

Dentro de seu habitat natural as plantas estão sujeitas a uma série de combinações de condições abióticas que pode alterar o seu metabolismo. Tais combinações podem incluir: alta luminosidade, déficit hídrico, altas temperaturas e/ou salinidade. O estudo do estresse oxidativo associado a estresses abióticos em plantas tem avançado consideravelmente nos últimos anos (Azevedo et al. 2011). Grande parte das pesquisas, entretanto, tem como foco os estresses isolados, mesmo sendo conhecido que, no campo, a planta está exposta a condições adversas que ocorrem simultaneamente (Rizhsky et al. 2004).

Estudos realizados em *Arabidopsis* submetidas ao estresse combinado de seca e calor revelaram um novo padrão de resposta de defesa, diferente dos padrões de estudos com fatores

isolados (Rizhsky et al. 2004, Koussevitzky et al. 2008). No Brasil, esse tipo de pesquisa ainda é pouco frequente embora seja necessário selecionar ou desenvolver variedades de diversas culturas, que possam tolerar os efeitos de fatores ambientais extremos. Neste sentido, culturas de grande importância econômica como a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), exigem uma melhor compreensão das interações fisiológicas e bioquímicas responsáveis pela aclimatização das plantas às flutuações ambientais, para que elas alcancem um novo estado de homeostase quando submetidas a estresse (Miller et al. 2010).

A importância econômica da cultura da cana-de-açúcar está associada, principalmente, à produção de açúcar e etanol (Azevedo et al. 2011). O país é considerado o principal produtor de açúcar do mundo, além de possuir a cadeia produtiva bastante estruturada e dominar todos os estágios da tecnologia de produção (Vidal 2010). A área plantada com cana-de-açúcar no Brasil compreende 8,6 milhões de hectares (CONAB 2012) e continua em expansão.

A área de plantio vem se expandindo para a região semiárida do país que, dentre suas características, apresenta condições edafoclimáticas favoráveis tanto à salinização dos solos (Willadino et al. 2011), como a deficiência hídrica e as temperaturas elevadas. Apesar das projeções da EMBRAPA indicarem a cana-de-açúcar como uma das poucas culturas promissoras quanto à tolerância à elevação da temperatura prevista para as próximas décadas em função do aquecimento global (EMBRAPA 2008), a expansão da cultura canavieira para a região semiárida deixará a cultura exposta à ocorrência de combinações de fatores estresses.

Estímulos ambientais como estresses isolados ou combinados podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e desencadear o estresse oxidativo, que pode gerar grandes impactos no metabolismo da planta em diferentes níveis devido à ação tóxica das ROS (Mittler 2002, Gratão *et al.* 2005). Neste sentido, a análise da peroxidação lipídica, que revela mudança na composição dos lipídeos, é amplamente utilizada como indicadora da ocorrência de estresse

oxidativo (Gratão *et al.* 2005). Porém, fatores como duração, severidade do estresse e genótipo analisado (Chaves *et al.* 2003, Ghelfi *et al.* 2011) podem influenciar nesses processos.

As plantas possuem um mecanismo de defesa que atua mediante a ativação de um sistema enzimático (Agarwal e Pandey 2004) e que inclui as enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Essas enzimas catalisam a decomposição de moléculas oxidativas que podem reagir com diversos metabólitos, causando danos oxidativos a enzimas, proteínas, e ácidos nucleicos. Isso afeta gravemente a integridade e funcionalidade das células causando, frequentemente, danos irreversíveis (Moller *et al.* 2007). Sendo assim, a capacidade de ativação do sistema antioxidante desempenha um papel fundamental no equilíbrio redox (Mittler 2002).

A aquisição de conhecimentos sobre o metabolismo e a compreensão dos mecanismos de tolerância virá direcionar os programas de melhoramento genético de plantas, visando à obtenção de progênes com maior tolerância. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta do sistema antioxidativo de diferentes variedades de cana-de-açúcar frente ao estresse múltiplo.

Material e métodos

Foram utilizadas mudas micropropagadas de seris variedades “RB” (República Brasileira) de cana-de-açúcar adquiridas da SBW do Brasil Agrifloricultura Ltda. As variedades utilizadas foram: RB 966928, RB 98710, RB 855453, RB 99395, RB 867515 e RB 855156. As plantas foram aclimatadas em casa de vegetação, selecionadas e cultivadas em tubetes plásticos em forma de cone, com capacidade de 115 cm³, contendo areia lavada. Após 15 dias de aclimação em casa de vegetação (UR média de 65±5,5% e temperatura média de 29,61±0,97 °C), as plantas foram transferidas para a uma câmara climática (Fitotron), modelo SL-205//1370, marca SOLAB, sob fotoperíodo de 12 horas, permaneceram 5 dias recebendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com metade da sua força iônica antes da aplicação dos estresses.

A abordagem experimental envolveu três diferentes agentes estressantes: elevada temperatura, salinidade e déficit hídrico, de forma isolada e combinada. O experimento foi conduzido em ambiente controlado com alta temperatura e luminosidade, simulando as condições climáticas típicas do semiárido brasileiro (36 ± 1 °C durante o dia e 26 ± 1 °C durante a noite, média de $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiação na altura das plantas e UR média de $40\pm 8\%$).

Após a aclimatação as condições da câmara, foram estabelecidos os tratamentos. As plantas dos grupos T1 e T2 permaneceram irrigadas diariamente com solução nutritiva e as plantas dos grupos T3 e T4 receberam solução nutritiva acrescida de NaCl na concentração de 50 mM e condutividade elétrica de, aproximadamente, 5,8 dS/m. Ocorreu suspensão de rega no 9º dia em T2 e T4. Portanto, as condições de cultivo foram: T1= tratamento sem NaCl com rega contínua (estresse por temperatura); T2= tratamento sem NaCl com suspensão de rega (estresse hídrico + temperatura); T3= rega contínua com solução salina (estresse salino + temperatura); e T4= suspensão de rega após estresse salino (estresse salino + hídrico + temperatura).

O período experimental teve duração de 12 dias e o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 6 x 4 (seis variedades e quatro condições de cultivo), com quatro repetições, sendo cada uma composta de uma planta por tubete. Para a análise estatística foi utilizado o programa Sisvar 5.3 (Ferreira, 2008) e aplicado o teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Após a coletada, parte do material vegetal foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido a -20°C até o processamento das análises.

O TRA foi determinado seguindo o método de Cairo (1995). Em cada repetição foram retiradas seis amostras da região central da folha, acondicionadas em gelo e rapidamente transferidas para o laboratório. A determinação da massa fresca (MF) foi realizada em balança analítica em um período de até duas horas após a excisão. Essas amostras foram então mantidas em água deionizada durante 24 h e após remoção do excesso de água em papel filtro, foi obtido a massa túrgida (MT). Após isso, as amostras foram secas a 70°C por 48 h (MS) para determinação da

massa seca do tecido. Os valores do TRA foram determinados pela equação: $(MF-MS)/(MT-MS) \times 100$.

O peróxido foi quantificado segundo protocolo de Alexieva et al. (2001). As amostras frescas foram maceradas com TCA 0,1% na relação de 1 g/10 mL (w:v). As amostras foram centrifugadas a 10.000g por 15 min, a 4 °C. Do sobrenadante, foram retirados 200 µL ao qual foram adicionados 200 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de iodeto de potássio. As amostras permaneceram em gelo e no escuro durante uma hora. Após este período, as amostras foram retiradas do gelo e mantidas em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com Health e Packer (1968), com modificações. A reação foi determinada através da produção de malondialdeído (MDA), um metabólito reativo a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Amostras biológicas foram maceradas em TCA 0,1% na proporção de 0,2 g/2mL de tampão, juntamente com 20% de PVPP (polivinilpirrolidona). Após homogeneização, a amostra foi centrifugada a 10.000g durante 5 min. Foi retirado do sobrenadante 0,25 mL e transferido para outro tubo juntamente com 1,0 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi mantida em banho-maria a 95 °C durante 30 min e, em seguida, passou por rápido resfriamento por 10 min. Antes da leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm, as amostras foram centrifugadas por mais 10 min a 10.000g.

Amostras congeladas foram maceradas e homogeneizadas com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 1 mM ácido tilenodiaminotetracético ácido (EDTA), 3 mM de DL-ditiotreitol e 20% de polivinilpirrolidona sob temperatura de - 4 °C (Azevedo et al. 1998). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g durante 30 min e o sobrenadante foi separado em alíquotas e mantido armazenado a -20°C até a determinação da atividade enzimática.

A concentração das proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (Bovine Serum Albumin) como padrão. A reação foi realizada com adição de

20 µL de amostra (previamente diluída) a 1 mL do reagente de Bradford e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Havir e Mchale (1987) com modificações conforme Azevedo et al. (1998). Em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL do extrato proteico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H₂O₂ por 60 segundos, através das alterações a 240 nm, sob temperatura de 25 °C, em espectrofotômetro.

A atividade da APX foi determinada conforme descrito por Nakano e Asada (1981). O meio de reação composto por 650 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,5), 100 µL de ascorbato 5 mM, 100 µL de EDTA 1 M, 100 µL de H₂O₂ 1 mM e 50 µL 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.

O protocolo foi padronizado de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), Por esse método, é determinada a inibição da redução do NBT (nitro blue tetrazolium) pelo extrato enzimático, evitando assim a formação do cromóforo. A solução de reação (3 mL) foi constituída de 85 mM de tampão fosfato (pH 7,8), 75 µM de NBT, 5 µM riboflavina, 13 mM de metionina, 0,1 mM EDTA e 50 µl de extrato enzimático. A solução foi colocada em tubos de vidro e irradiada com luz branca (lâmpada fluorescente de 15 W) por 5 min. Após esse período de exposição, a solução foi analisada por espectrofotômetro a 560 nm.

Resultados e Discussão

A maioria das variedades apresentou decréscimos significativos no TRA quando as plantas foram submetidas ao estresse por elevada temperatura associado ao estresse hídrico (T2). Por outro lado quando foi induzido o estresse térmico e salino simultaneamente (T3), apenas as variedades RB 855453 e RB 855156 apresentaram redução no TRA. A intensidade e significância dessa

redução no TRA foi maior quando às plantas foram submetidas ao estresse triplo (térmico + hídrico + salino = T4). Neste tratamento (T4) foram observadas elevadas reduções no TRA, em torno de 35%, com exceção das variedades RB 867515 e RB 855156 que apresentaram reduções de apenas 17 e 22%, respectivamente. Na variedade RB 855453 a temperatura elevada pode ter causado desidratação devido à perda rápida de água nos tecidos (Figura 1).

Wahid e Close (2007) demonstraram que plantas de *Saccharum officinarum* (clone NCO-310) sob condição de altas temperaturas ($40/35 \pm 1$ °C) também exibiram diminuição do TRA, reduzindo o conteúdo hídrico na célula. Os valores apresentados, porém, foram semelhantes aos das plantas controle após 72 horas de tratamento, sugerindo que as plantas foram capazes de se ajustar osmoticamente. Um comportamento estatisticamente semelhante ao controle foi observado nas variedades RB 98710, RB 99395 e RB 867515 submetidas ao estresse combinado de alta temperatura e déficit salino. Esse comportamento pode favorecer a tolerância ao estresse salino associado a altas temperaturas, uma vez que as plantas preservaram seu conteúdo hídrico mantendo valores de TRA semelhantes às plantas controle (Figura 1).

O peróxido de hidrogênio, como um forte oxidante provoca danos e atinge as funções metabólicas no local onde se acumula (Foyer et al. 1997). Outras moléculas como radical hidroxila (OH^\bullet), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) podem também ocasionar efeitos diretos ou indiretos na célula, como por exemplo, a peroxidação lipídica (Smirnoff 1993), que pode ser indicada pelo aumento no nível de MDA. Nas variedades de cana-de-açúcar estudadas não houve correlação entre o teor de MDA e a concentração de H_2O_2 em nenhuma das variedades (Figuras 2 e 3). Sabe-se que o $^1\text{O}_2$ é uma ROS que se forma constitutivamente em organismos fotossintéticos, mas que frequentemente pode ter sua produção aumentada devido à exposição a condições ambientais adversas. A peroxidação lipídica em folhas é quase exclusivamente mediada por essa molécula (Triantaphylidès et al. 2008).

O conteúdo de MDA variou de acordo com a variedade e tipo de estresse. Resultados semelhantes foram encontrados por Tayebimeigooni et al. (2012) que estudaram salinidade em couve. A RB 99395 parece ser bastante sensível à elevação de temperatura, pois altos níveis de MDA foram observados no tratamento em que as plantas foram submetidas exclusivamente a este estresse (T1) e elevados níveis de MDA foram mantidos constantes quando se fez a associação do estresse térmico ao salino e hídrico. Nas variedades RB 98710 e RB 966928, a elevação no conteúdo de MDA foi acompanhada por uma redução no TRA (Figuras 1 e 3) nas quais se observou uma correlação negativa ($r = -0,5705^*$ e $r = -0,5425^*$, respectivamente). Incrementos no teor de MDA têm sido relacionados com estresse oxidativo e podem ser, dentre outros fatores, resultado de insuficiência do sistema antioxidativo (Tayebimeigooni 2012).

Segundo Scandalios (2005), danos na membrana plasmática podem estar relacionados à liberação de eletrólitos e morte celular, assim, a peroxidação tem sido usada como marcador na seleção de cultivares (Shao et al. 2005, Lata et al. 2011). A variedade RB 867515 apresentou os níveis mais baixos de MDA nos tecidos das folhas sob estresse isolado e combinado (Figura 3). A variedade RB 98710 manteve baixo o conteúdo de MDA no estresse térmico (T1) e na combinação dupla do estresse térmico com o estresse hídrico ou salino (T2 e T3). Na combinação de estresse triplo foi observado um aumento no conteúdo de MDA. Baixos valores de MDA caracterizam tolerância em genótipos de cana-de-açúcar (Cia et al. 2012).

O sistema antioxidante, representado pela atividade enzimática, apresentou diferenças significativas nas respostas genotípica. A atividade da SOD deve estar associada à atividade da CAT e/ou APX, pois o produto da ação da SOD, considerada responsável pela dismutação de O_2^- , é o H_2O_2 cujo seu acúmulo é tão prejudicial quanto o O_2^- . Neste estudo, foi observado que a atividade da CAT apresentou correlação positiva com a da SOD, independente da tolerância ou sensibilidade nas variedades: RB 966928 (0,7884**), RB 855453 (0,8796**), RB 99395 (0,6593**) e RB 867515 (0,6518**).

As enzimas APX e CAT, que comandam a eliminação de H_2O_2 , possuem diferentes afinidades por essa ROS. A APX tem alta afinidade (μM) e a CAT, baixa afinidade (mM) (Mittler 2002). Portanto, as APX podem eliminar H_2O_2 que estão inacessíveis à CAT, como no caso dos cloroplastos (Foyer e Noctor, 2011). Os resultados deste trabalho indicaram a importância do aumento concomitante na atividade dessas duas enzimas na proteção contra danos oxidativos. Na RB 867515, a CAT e a APX apresentaram correlação positiva altamente significativa (0,8316**). Comportamentos semelhantes a esses foram associados com tolerância à seca em trigo (Sairam et al. 1998) e à salinidade em cana-de-açúcar (Willadino et al. 2011). O aumento ou a manutenção da atividade da APX e da CAT indicam a importância dessas enzimas na desintoxicação do H_2O_2 e da proteção contra danos oxidativos (Cia et al. 2012).

O padrão de resposta das variedades RB 966928 e RB 855453, por outro lado, mostram claramente que cada genótipo exibe diferentes respostas frente à mesma situação de estresse. Ambas apresentaram maiores decréscimos nos níveis de TRA paralelo a incrementos nos níveis de MDA, entretanto, na RB 966928 o sistema antioxidativo enzimático se manteve quase inalterado em todos os tratamentos, enquanto que na variedade RB 855453, ocorreu uma elevada atividade da CAT e da APX.

Em condições de estresse pode ocorrer uma diminuição no teor de proteínas em plantas, em virtude do aumento da proteólise (Parida e Das 2005, Silveira et al. 2005). Em tais situações, porém, geralmente ocorre aumento no teor de proteínas específicas envolvidas na sinalização de respostas ao estresse ou na estabilização das membranas celulares (Tester e Davenport, 2003). A resposta mais comum das plantas submetidas a elevadas temperaturas é a expressão de proteínas de choque térmico (HSPs), que também atuam na recuperação dos danos causados pelos estresses térmico, osmótico e por desidratação (Xiong et al. 2002). Foi relatado para cana-de-açúcar a expressão de outro grupo de proteínas conhecidas como deidrininas (DNHs), elas possuem

semelhanças na função, fisiologia e estrutura com as HPS, o que fornece indícios de seu papel na tolerância ao calor em plantas (Wahid e Close 2007).

Neste trabalho, as plantas foram submetidas a estresse combinado de elevada com déficit hídrico, com estresse salino ou com estresse hídrico + salino. A combinação dos três estresses foi que resultou em efeitos mais severos e prejudiciais ao desenvolvimento das plantas, como foi visto pelo TRA que na maioria das variedades ficou abaixo de 58%. Destacaram-se a variedade RB 855156 que manteve um TRA de 66% e a RB 867515 com, aproximadamente, 70%. A variedade RB 867515 apresentou além dos maiores valores de TRA os mais baixos teores de MDA, e foi também a única variedade que apresentou correlação positiva entre todas as enzimas do estresse oxidativo SOD, CAT e APX. Este comportamento enzimático sincronizado da variedade RB 867515 foi eficiente na regulação e desintoxicação das ROS produzidas na célula vegetal, indicando uma maior tolerância dessa variedade aos diferentes tipos de estresse, isolados ou combinados, quando comparada as demais variedades testadas.

Agradecimentos: Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida à primeira autora e financiamento da pesquisa (PBPG-0924-5.01/10).

Referências

- Agarwal S and Pandey V (2004) Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifoli*. **Biologia Plantarum** **48**: 555-560.
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S and Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment** **24**: 1337-1344.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ and Lea PJ (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum** **104**: 280-292.
- Azevedo RA, Carvalho RF, Cia MC and Gratão PL (2011) Sugarcane Under Pressure: An Overview of Biochemical and Physiological Studies of Abiotic Stress. **Tropical Plant Biology** **4**: 42-51.

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** **72**: 248-254.
- Cairo PAR (1995) **Curso básico de relações hídricas de plantas**. Editora UESB, Vitória da conquista. 32p.
- Chaves MM, Maroco J and Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology** **30**: 239-264.
- Cia MC, Guimarães ACR, Medici LO, Chabregas SM and Azevedo RA (2012) Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology** **161**: 313-324.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2012 - Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos>. Acesso em: 02 dezembro 2012.
- EMBRAPA (2008) **Aquecimento Global e Cenários Futuros da Agricultura**. Coordenadores: Assad E, Pinto HS. Cepagri/Unicamp, São Paulo, 84p.
- Ferreira DF (2008) Sisvar: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium** **6**: 36-41.
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF and Scott IM (1997) Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum** **100**: 241-254.
- Foyer CH and Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. **Plant Physiology** **155**: 2-18.
- Ghelfi A, Gaziola SA, Cia MC, Chabregas S. M, Falco M.C, Kuser-Falcão PR, Azevedo RA (2011). Cloning, expression, molecular modeling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. **Ann Appl Biol.** **159**: 267-280.
- Giannopolitis CN and Ries SK (1977) Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. - **Plant Physiology** **59**: 309-314.
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ and Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology** **32**: 481-494.
- Havir EA and Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology** **84**: 450-455.
- Heath RL and Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics** **125**: 189-198.
- Hoagland DR and Arnon DI (1950) **The water culture method for growing plants without soil**. California Agriculture Experimental Station Circular, California, 347p.

- Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev V and Mittler R (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. **The Journal of Biological Chemistry** **283**: 34197-34203.
- Lata C, Jha S, Dixit V, Sreenivasulu N and Prasad M (2011) Differential antioxidative responses to dehydration-induced oxidative stress in core set of foxtail millet cultivars. **Protoplasma** **248**: 817-828.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S and Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment** **33**: 453-467.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants e stress tolerance. **Trends in Plant Science** **7**: 405-410.
- Moller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology** **58**: 459-481.
- Nakano Y and Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant & Cell Physiology** **22**: 867-880.
- Parida AK and Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety** **60**: 324-349.
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S and Mittler R (2004) When Defense Pathways Collide. The Response of to a Combination of Drought and Heat Stress. **Plant Physiology** **134**: 1683-1696.
- Sairam RK, Deshmukh PS and Saxena DC (1998) Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. **Biologia Plantarum** **41**: 387-394.
- Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **38**: 995-1014.
- Shao HB, Liang ZS, Shao MA and Wang BC (2005) Changes of antioxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficits among 10 wheat genotypes at seedling stage. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** **42**: 107-113.
- Silveira JAG, Lima JPMS, Cavalcanti FR, Maia JM and Viégas RA (2005) Salt induced oxidative response in plants: damage or protection? In: Nogueira RJMC, Araújo EL, Willadino LG and Cavalcante UMT (eds). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. MXM Gráfica e Editora, Recife, parte II, cap. 9, p.106-117.
- Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation **New Phytol** **125**:27-58.
- Tayebimeigooni A, Awang Y, Mahmood M, Selamat A and Wahab Z (2012) Leaf water status, proline content, lipid peroxidation and accumulation of hydrogen peroxide in salinized Chinese kale (*Brassica albolabra*). **Journal of Food, Agriculture & Environment** **10**: 371-374.

- Tester M and Davenport R (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Annals of Botany** **91**: 503-527.
- Triantaphylidès C, Krischke M, Hoerberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F and Mueller MJ (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. **Plant Physiology** **148**: 960-968.
- Vidal MF (2010) **Produção e área colhida de cana-de-açúcar no Nordeste**. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste - ETENE, 10p. (Informe rural ETENE, 20).
- Wahid A and Close TJ (2007) Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. **Biologia Plantarum** **51**: 104-109.
- Willadino L and Camara TR (2010) Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer** **6**: 1-23.
- Willadino L, Oliveira Filho RA, Silva Junior EA, Gouveia Neto A and Camara TR (2011) Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. **Revista Ciência Agronômica** **42**: 417-422.
- Xiong L, Lee H, Ishitani M and Zhu J K (2002) Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry** **277**: 8588-8596.

Figuras

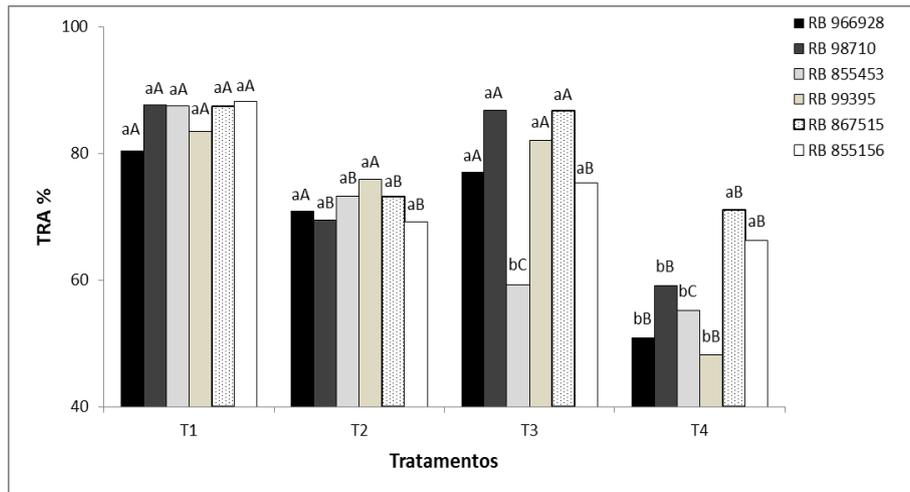


Figura 1. Teor relativo de água (TRA%) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas à elevada temperatura ($36/26\pm 1$ °C) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental. (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

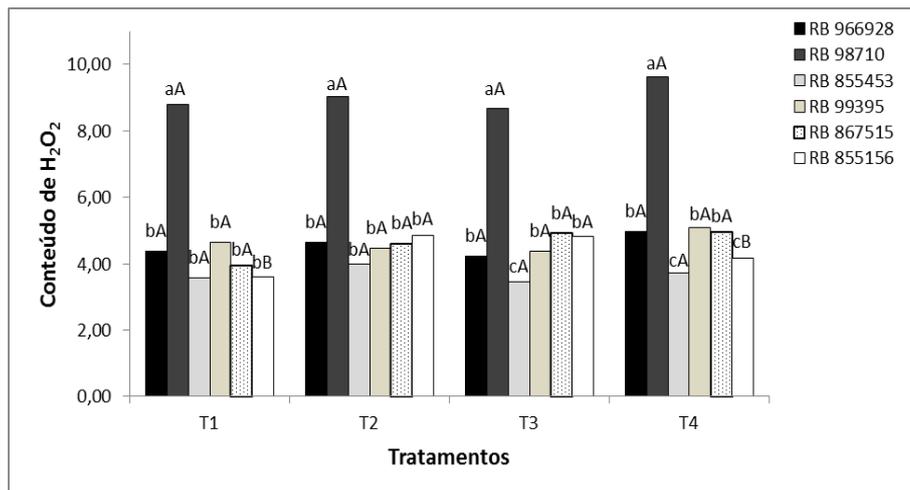


Figura 2. Conteúdo de H₂O₂ (μmol/g MF) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas à elevada temperatura ($36/26\pm 1$ °C) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental. (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

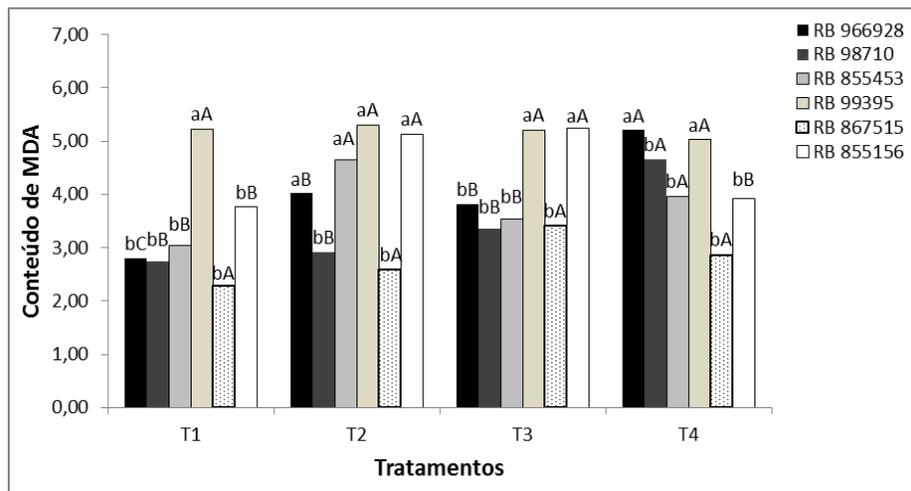


Figura 3. Peroxidação lipídica expressa pelo conteúdo de MDA ($\mu\text{mol/g MF}$) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas à elevada temperatura ($36/26\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental. (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

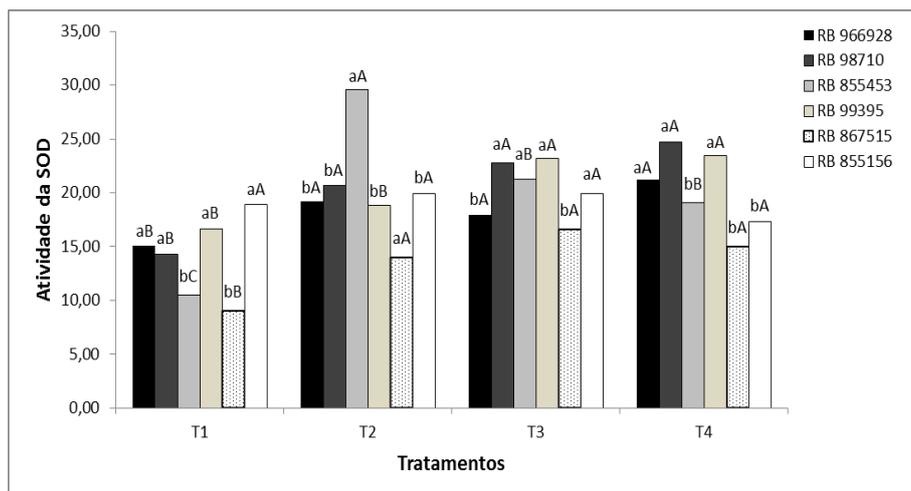


Figura 4. Atividade da SOD ($\text{U SOD mg prot.}^{-1}$) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas à elevada temperatura ($36/26\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental. (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

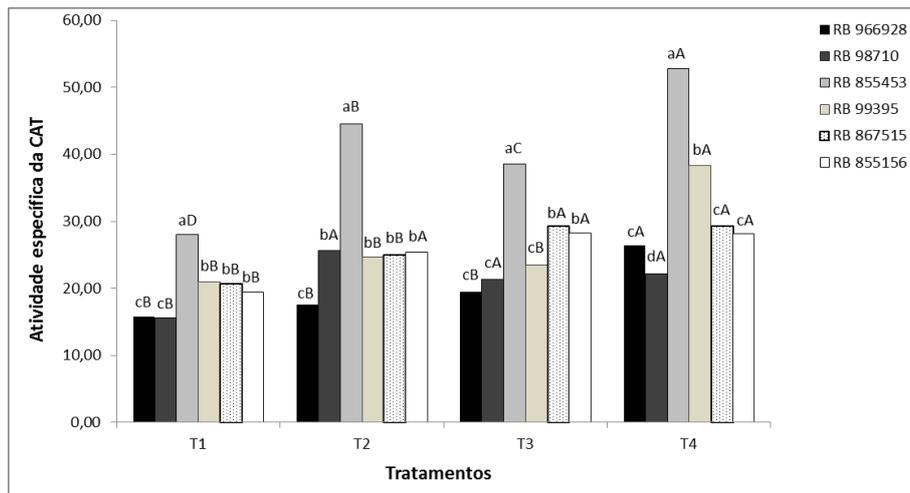


Figura 5. Atividade da CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) para folhas de variedades de cana-de-açúcar submetidas à elevada temperatura ($36/26 \pm 1$ °C) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental. (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

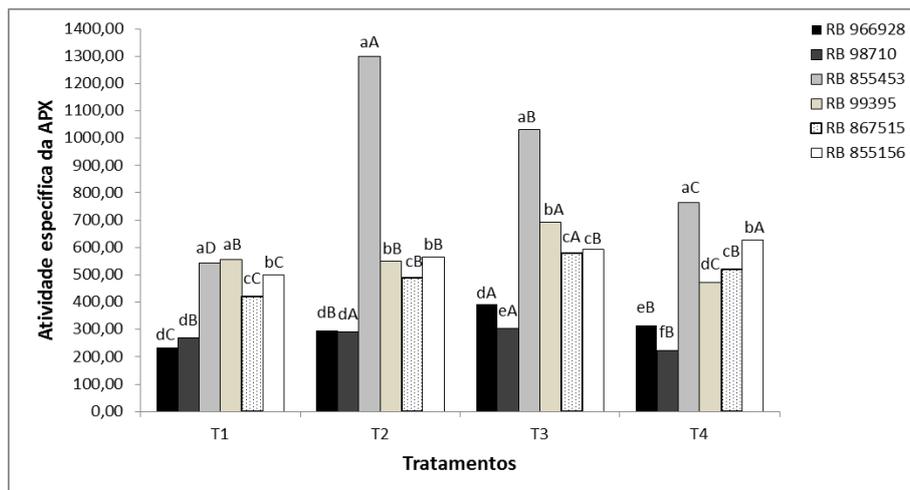


Figura 6. Atividade da APX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína) em folhas de variedades de cana-de-açúcar submetida à elevada temperatura ($36/26 \pm 1$ °C) associada ao estresse hídrico (T2), salino (T3) e múltiplo (T4). No controle (T1) as plantas receberam rega durante todo o período experimental. (Letras minúsculas iguais entre os genótipos no mesmo tratamento e maiúsculas entre os diferentes tratamentos para o mesmo genótipo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade).

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerações Finais

A maioria das variedades aumentou a atividade das enzimas antioxidantes frente ao estresse isolado. Porém, o estresse múltiplo foi mais severo, evidenciando que a combinação desses estresses causam maiores danos que podem, inclusive, causar o colapso do sistema de defesa antioxidante;

A resposta do sistema de defesa antioxidante ao estresse hídrico variou em função do ambiente e das variedades analisadas. O estresse combinado aumentou a peroxidação lipídica na maioria das variedades e em alguns casos também os níveis de H₂O₂;

A variedade RB 867515 apresentou, tanto em condições ambientais da Zona da Mata quanto em condições ambientais que simulam às do semiárido, uma controlada sincronia entre as enzimas antioxidativas, o que resultou na regulação e desintoxicação das ROS produzidas na célula vegetal durante situações de estresse caracterizando esta variedade como tolerante a estresses ambientais.

ANEXOS

ANEXO 1

Notice to contributors

BIOLOGIA PLANTARUM is an international journal for experimental botany. It publishes original scientific papers and brief communications, reviews on specialized topics, and book reviews in plant physiology, biochemistry, physiological anatomy, ecophysiology, genetics, molecular biology and pathophysiology. Only papers presenting generally valid findings are usually accepted. Papers should not be published or under consideration for publication elsewhere.

The manuscripts in English should be prepared in electronic version (text in MS Word for Windows, figures and photographs as JPG or TIF files). The authors are strongly recommended to get their papers checked by a native English speaker to avoid language inaccuracies. The manuscripts have to be submitted on-line (new submission on new submission). Other correspondence should be sent to editorial office by e-mail: biol.plant@ueb.cas.cz. Please, do not forget to use manuscript number.

Every manuscript is reviewed by at least two reviewers familiar with the relevant field of research, being from a different country or at least from different institution from the author (one of them can be associate editor).

When accepted and at the date of issuing, the corresponding author receives a PDF file with a final version of the paper free of charge.

FOLLOWING SECTIONS:

Original papers
Brief communications
Review articles
Book reviews
Announcements
SI units and symbols
Examples of figure design
Most common abbreviations

ORIGINAL PAPERS

The length of a paper including figures, tables and references should not exceed 12 pages (final size in the journal). The paper should be arranged as follows:

- Title
- Names and addresses of the author(s)

- Abstract with additional key words
- Abbreviations
- Acknowledgements
- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion
- References
- Tables with a heading
- Figure legends.

The results and discussion might be joined together. Units, dimensions, terms, symbols, abbreviations, etc., recommended by the *Système International d'Unités* (SI) (see the section SI units and symbols) should be used.

Line drawings should be surrounded by a frame which forms their axes. Grid marks should point inwards. As far as possible, different curves should be individually labelled. Alongside the scale of the ordinate and abscissa the quantity measured should be given, followed by appropriate dimension in SI units in brackets, e.g.: TRANSPIRATION RATE [$\text{mg (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$] (see the Examples of figure design).

Photographs must be of the press quality with a full range of tones and of good contrast. Colour photographs are printed on authors' expenses (ca. 120 EUR per page).

References in the text should contain the authors' names followed by the year of publication, e.g. Amesz (1989) or (Lüttge et al. 1989, Herbert and Nilson 1991). References at the end of the paper should be arranged alphabetically (by authors' names) (for abbreviations of journal titles see the section: Most common abbreviations):

Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C.: Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves. - *Biol. Plant.* **44**: 41–46, 2001.

Tausz, M.: The role of glutathione in plant response and adaptation to natural stress. - In: Grill, D., Tausz, M., De Kok, L.J. (ed.): *Significance of Glutathione in Plant Adaptation to the Environment*. Pp. 101–122. Kluwer Academic Press, Dordrecht - Boston - London 2001.

Koch, G.W., Mooney, A.A. (ed.): *Carbon Dioxide and Terrestrial Ecosystems*. - Academic Press, San Diego - New York - Boston - London - Sydney - Tokyo - Toronto 1996.

Gribova, Z.P., Antonovskii, V.L.: [Ultraviolet radiation effect on paramagnetic centres of plant leaves and chloroplasts.] - *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol.* 1991(1): 51–58, 1991. [In Russ.]

Titles of articles written in languages other than English are given only in English translation (see the above example). However, book titles should be given also in the original language.

Additional key words (10 or less) best characterizing the contents of article and not contained in its title follow the abstract. The list of abbreviations in alphabetical order is also necessary.

The length of a paper including figures, tables and references should not exceed 12 pages (final size in the journal). The paper should be arranged as follows: title, names and addresses of the author(s), abstract with additional key words, abbreviations, acknowledgements, introduction, materials and methods, results, discussion, references, tables with headings and figure legends. The results and discussion might be joined together. Units, dimensions, terms, symbols, abbreviations, etc., recommended by the *Système International d'Unités* (SI) (see the section SI units and symbols) should be used.

First page

Title fittingly describes the paper and it is as brief as possible. It is written in lower case letters. Names of authors are in capitals (e.g. J. MARAS¹, K.G. XUE² and W.-C. CHEN^{1*}). Addresses are in italics and followed by respective numbers.

Abstract briefly describes the aim and all important results. Please, avoid of discussion and speculations.

Additional key words (10 or less) best characterizing the contents of article and not contained in its title follow the abstract. They are usually used in the Subject Index. The list of abbreviations in alphabetical order is also necessary. After that, the acknowledgements can be presented. Finally, corresponding author (marked by an asterisk) should be indicated together with his/her fax and e-mail.

Introduction

The introduction should be a qualified short review of the problem referencing most relevant papers on the subject. The goal of the paper should be outlined. After the first use of a term with its abbreviation [e.g. net photosynthetic rate (P_N)] use only the abbreviation (P_N) in the following text.

Materials and methods

A detailed and correct description of experimental conditions is a prerequisite of reliable and reproducible results.

The names of plants should be given in full when appearing for the first time in the manuscript (e.g. *Picea abies* [L.] Karst., *Hordeum vulgare* L. cv. Dvoran) and in a shorter version in the following text (e.g. *P. abies*).

The conditions of plant growth in nature, greenhouse or growth chamber should be described in detail. The ontogenetic stage of the plant should be also mentioned.

When presenting instruments or specific materials (chemicals) usually 4 parameters should be given: type, producer, town, state (e.g. *Portable Photosynthesis System* LI-6400, LI-COR., Lincoln, NE, USA).

Statistical treatment should be described in detail. More than 3 replicates are quite necessary for a reliable statistical treatment and hence at least 5 replicates are recommended. Usually means and SD (standard deviation) or SE (standard error) are evaluated. If statistical tests are performed, name of the tests and description of the software used must be given. In case of a series of experiments, a note on reproducibility of the trends or dependences should be given.

Results

All results obtained should be clearly described and logically arranged. References to respective tables or figures should be in brackets after statement e.g. (Table 1) or (Fig. 3A). Use subheadings only when the text is too long and complicated. Avoid of discussion in Results when the both parts are not joined together.

Discussion

Reasonable compromise between length and depth of discussion has to be found to prevent futile words or mere speculations. However, appropriate comparisons of results obtained with those found previously should be presented. Also if some unusual results appeared, they should be explained. Stimulating and well based hypotheses also may be incorporated.

References

References in the text should contain the authors' names followed by the year of publication, e.g. Amesz (1989) or (Lüttge et al. 1989, Herbert and Nilson 1991). References at the end of the paper should be arranged alphabetically (by the first authors' name) and edited as exemplified below (for abbreviations of journal titles see the section: Most common abbreviations):

Scebba, F., Sebastiani, L., Vitagliano, C.: Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves. - Biol. Plant. **44**: 41-46, 2001.

Tausz, M.: The role of glutathione in plant response and adaptation to natural stress. - In: Grill, D., Tausz, M., De Kok, L.J. (ed.): Significance of Glutathione in Plant Adaptation to the Environment. Pp. 101-122. Kluwer Academic Press, Dordrecht - Boston - London 2001.

Koch, G.W., Mooney, A.A. (ed.): Carbon Dioxide and Terrestrial Ecosystems. - Academic Press, San Diego - New York - Boston - London - Sydney - Tokyo - Toronto 1996.

Gribova, Z.P., Antonovskii, V.L.: [Ultraviolet radiation effect on paramagnetic centres of plant leaves and chloroplasts.] - *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. biol.* 1991(1): 51-58, 1991. [In Russ.]

Titles of articles written in languages other than English are given only in English translation (see the above example). However, book titles should be given also in the original language.

Tables and figures

The legends to Tables and Figures should be self-explanatory without reference to a text. Meaning of the points or curves in the graphs (e.g. means) and statistical bars (e.g. SD or SE) should be shown together with the number of replicates (e.g. n = 10).

A single table should not exceed one printed page and it is written as real MS Word table.

Line drawings should be surrounded by a frame formed by their axes. Grid marks (ticks) should point inwards. As far as possible, different curves should be individually labelled. Alongside the scale of the ordinate and abscissa the quantity measured should be given, followed by appropriate dimension in SI units in brackets, e.g.: TRANSPIRATION RATE [$\text{mg}(\text{H}_2\text{O}) \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$] (see the Examples of figure design). The lettering should be in capitals, in Arial or a similar sans-serif type. Lettering for labels and inside legends should be of a consistent size. The same holds for all figures in the same paper. If possible, figures should be combined together and signed as A, B, C, etc.

Photographs must be of the press quality with a full range of tones and of good contrast. All photographs are usually arranged on one or two plates and marked by A, B, C, etc., similarly as line drawings. Colour photographs are printed on authors' expenses (ca. 150 EUR per page). Use the resolution of 200 dpi for gray scale and colour photographs and 600 dpi for line drawings.

Please, check your figure style with recent issue of the journal and try to print all figures to be sure that they are really of printing quality.

BRIEF COMMUNICATIONS

Papers not longer than 4 - 5 pages (final size in the journal) including abstract, text, references, one table and one figure, or two figures, or two tables are usually published more rapidly than the longer papers.

REVIEW ARTICLES

Short but comprehensive reviews with full bibliography are accepted after preliminary discussion of the intended topics with the editors. Reviews should not exceed 14 pages (final size).

BOOK REVIEWS

Reviews of new books up to 1 page (final size in the journal) dealing with experimental botany or related fields, sent to the Editor, are published as soon as possible.

ANNOUNCEMENTS

The journal can publish announcements of conferences, symposia, etc. in the respective fields on the organizers' expense. A limited number of advertisements on the products used in plant experimental research can also be published on the commercial base.

ANEXO II

SUBMISSÃO DE ARTIGOS

Versão em português

CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY

Instruções aos Autores

Política geral e escopo da revista

A **CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY** (ISSN 1518-7853, versão impressa, ISSN 1984-7033, versão on line) - é a revista trimestral oficial da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas (<http://www.sbmp.org.br>). O nome internacional abreviado é CROP BREED APPL BIOTECHNOL. A revista está indexada na ISI Thomson Reuters, Scopus, AGRIS, CAB International Abstracts, Biosys, Latindex, Periódica, Chemical Abstracts Service, Agrícola, Agrobase, Wilson, Ebsco, DOAJ, Acervo Documental da Embrapa and Portal da Capes e destina-se à publicação de artigos científicos originais que possam contribuir para o desenvolvimento científico e tecnológico do melhoramento e da agricultura. Os artigos deverão contemplar as pesquisas básica e aplicada em melhoramento de plantas perenes e anuais, nas áreas de genética, conservação de germoplasma, biotecnologia, genômica, citogenética, estatística experimental, sementes, qualidade de alimentos, estresse biótico e abiótico, e áreas correlatas. O artigo deve ser inédito, sendo vetada a submissão do mesmo a outro periódico. As opiniões e conceitos emitidos são de exclusiva responsabilidade dos autores, não refletindo necessariamente as idéias da Editoria. A Editoria, porém se reserva o direito de sugerir ou solicitar as modificações que se fizerem necessárias. A reprodução completa ou parcial dos artigos é permitida, desde que citada a fonte.

Informação para aquisição

Para associar-se à Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas ou adquirir exemplares avulsos da CBAB envie e-mail para **cbab@ufv.br**.

Artigo

A **CBAB** publica artigo exclusivamente em inglês, porém faculta ao autor a possibilidade de submetê-lo em português para, após o aceite, providenciar a sua tradução. O ônus da tradução é de responsabilidade do autor, porém a **CBAB** recomenda que ela seja feita por seu tradutor oficial. Contribuições são submetidas via WEB acessando <http://www.sbmp.org.br/cbab/sisocab/index.php>, clicando **Submission**. O sistema de

gerenciamento de artigos solicitará o e-mail do autor correspondente e a geração de uma senha. **Os manuscritos deverão ser inseridos sem os nomes dos autores e seus endereços, os quais deverão ser disponibilizados em um formulário à parte.** Como a CBAB opera com revisão do tipo duplo cego, autores não devem revelar suas identidades no manuscrito. Com seu e-mail e sua senha pessoal, o autor poderá acompanhar toda a tramitação do seu artigo. A avaliação do artigo será feita por revisores *ad hoc* especialistas, para auxiliar a Editoria quanto à decisão final de aceite, modificações ou rejeição do mesmo.

O artigo completo deverá conter, preferencialmente, a seguinte sequência: title, abstract, key words, introduction, material and methods, results and discussion, acknowledgements, título, resumo, palavras-chave, references, and tables and black-and-white figures. Ilustrações coloridas serão permitidas, porém com ônus para o autor correspondente. A digitação deverá ser feita em Word for Windows versão 6.0 em diante, em fonte times new roman, tamanho 12, espaçamento duplo, formato A4, com margens de 20 mm e paginação consecutiva no topo à direita. O artigo não deverá exceder a 18 páginas, incluindo tabelas e figuras digitadas em páginas separadas (uma por página) ao final do texto. O Título deverá ser claro, conciso e refletir a essência do artigo. Escrito com a inicial maiúscula e posto a esquerda, não deve conter mais de 15 palavras digitadas em times new roman 14, negrito. O Abstract, tanto quanto o Resumo, não deve exceder a 150 palavras. Um máximo de cinco palavras-chave, diferentes do título, será permitido. A introdução deve incluir uma breve revisão de literatura sobre o tema e os objetivos da pesquisa. O Material e Método deve ser redigido de modo que outro pesquisador possa repetir a experiência. Preferencialmente, Resultados e Discussão devem ser apresentados em conjunto, para maior dinâmica de leitura. Os agradecimentos devem ser sucintos, limitados a colaboradores efetivos e agências financiadoras. O Resumo deve ser precedido do título do artigo em português.

Cuidado com as Referências. Não citar resumos de eventos, teses e nem artigos não publicados. Esses cuidados darão maior credibilidade ao artigo e a revista. As citações feitas no texto pelo sobrenome do autor e ano (por exemplo, Liu 1998, Pereira and Amaral Júnior 2001, William et al. 1990) deverão ser ordenadas alfabeticamente no item Referências, seguindo os exemplos abaixo:

Artigos em periódicos:

Pereira MG and Amaral Júnior AT (2001) Estimation of genetic components in popcorn based on the nested design. **Crop Breeding and Applied Biotechnology 1:** 3-10.

Livro:

Ramalho MAP, Ferreira DF and Oliveira AC (2000) **Experimentação em genética e melhoramento de plantas.** Editora UFLA, Lavras, 326p.

Capítulo de livro:

Sakiyama NS, Pereira AA and Zambolim L (1999) Melhoramento do café arábica. In: Borém A (ed.) **Melhoramento de espécies cultivadas.** Editora UFV, Viçosa, p. 189-204.

Congresso:

Frey KJ (1992) Plant breeding perspectives for the 1990s. In: Stalker HT and Murphy JP (eds.) **Proceedings of the Symposium on Plant Breeding in the 1990s**. CAB, Wallingford, p. 1-13.

A **CBAB** publica ainda outras modalidades de trabalhos, todos submetidos ao crivo de revisores *ad hoc*, do mesmo modo que os artigos.

Revisões

As Revisões, também limitadas a 18 páginas digitadas, serão solicitadas pela Editoria a(os) autor(es) consolidados nas pesquisas que envolvem o tema da revisão. Elas serão elaboradas com o objetivo de lançar luz a um tema instigante que mereça uma análise aprofundada sobre o seu estado-da-arte.

Notas

As Notas são limitadas a 12 páginas digitadas e destinadas a informar pesquisas ou observações novas, para as quais as ferramentas analíticas não se aplicam. Elas podem focar tema de amplo interesse; relato curto de uma pesquisa original; relato de pesquisa participativa; observações de especial interesse nas áreas de pesquisa, ensino, extensão; lançamento de um novo software relacionado com a área de melhoramento.

Programas de melhoramento

Programas de melhoramento inovadores ou que se destaquem pela eficiência, impacto e/ou continuidade poderão ser retratados na **CBAB**, limitados a 18 páginas digitadas.

Lançamento de cultivares

Os novos cultivares merecerão uma seção especial pela importância que representam para o melhoramento e, por conseguinte, para a agricultura nacional. A seção Lançamento de novos cultivares deverá conter abstract, limitado a 50 palavras, palavras chaves, introdução, métodos de melhoramento utilizados, características de desempenho, produção de sementes básicas e um mínimo de referências, tabelas e figuras. Todo o texto ficará limitado a 12 páginas digitadas.

Resenha de livro

Esta nova seção foi criada para anunciar novos livros relacionados ao melhoramento de plantas. A contribuição para essa seção se dará mediante envio, pelo autor, de dois exemplares da obra. O livro será encaminhado para um revisor especializado, escolhido pela Editoria, para elaborar a resenha.

Pontos de vista

Pontos de vista, assim como as revisões, serão elaborados para a **CBAB** a convite da Editoria, para retratar temas de interesse dos melhoristas e da sociedade.

Cartas

Cartas breves, também de interesse geral, serão aceitas para publicação. A Editoria se reserva o direito de editar as cartas por limitações de espaço e clareza de exposição.

Autores de artigos na **CBAB - CROP BREEDING AND APPLIED BIOTECHNOLOGY** terão como benefícios:

- Submissão e revisão de artigos eletronicamente
- Rápida publicação: tempo médio de 6 meses, em 2008
- Artigos disponibilizados em pdf na WEB

Envie artigos acessando **<http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/index.php>** clicando em **Submission**

CBAB - Crop Breeding and Applied Biotechnology
Departamento de Fitotecnia
Universidade Federal de Viçosa
Campus Universitário
S/N36570-000 Viçosa - MG - Brasil
+55 31 3899-2611 - cbab@ufv.br