

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
VINICIUS MENDES DE AZEVEDO

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

RECIFE
2013

VINICIUS MENDES DE AZEVEDO

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.

Orientadora: Prof^a Dra. Lilia Gomes Willadino

RECIFE

2013

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

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 30 de Julho de 2013

Dsc. Lilia Gomes Willadino
ORIENTADORA

Dsc. Terezinha Rangel Câmara
Examinador interno

Dsc. Enio Farias França e Silva
Examinador interno

Dsc. José Nildo Tabosa
Examinador externo

RECIFE
2013

À minha família,

DEDICO

iv

AGRADECIMENTOS

A Família Mendes de Azevedo. Em especial aos meus pais, ao meu pai o senhor Edésio Pereira de Azevedo, minha mãe a senhora Marlene Mendes de Azevedo e a minha irmã Marília Mendes de Azevedo, pelo amor, carinho, companheirismo e paciência durante toda vida e ao longo de mais esta etapa ETERNAMENTE Obrigado!

A Prof^a Lilia Gomes Willadino, por toda orientação, honestidade, paciência, confiança, amizade e respeito ao longo desses dois anos. “- Muito obrigado professora”

Aos membros da banca de defesa, o Prof. Enio Farias França e Silva, o Prof. José Nildo Tabosa e a Prof^a. Terezinha Rangel Câmara. “- Grato pelo aceite para participação, e pelas contribuições adicionais. Obrigado!”

A Prof^a Cláudia Ulisses pelos ensinamentos, conselhos, ajudas e dicas para realização do estagio de docência. “- Obrigado professora Cláudia”.

Ao Prof. Edivan Rodrigues de Souza por toda ajuda e atenção despendida sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da UFRPE pela possibilidade de realização do mestrado.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento e Capacitação de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os amigos da pós pelos momentos de apoio, estudos e companheirismo. Obrigado galera: Alan, Aluizio, Andrea, Antonio, Cleene, Daniel, Diogo, Eduardo, Fabio, Gian, Janice, Jessyka, Jailson, Joel, Luiz, Mara, Miguel, Nadielan, Rafael, Ricardo, Renato, Rochelle, Tatiana Patrícia, Tatyana Keyty, Wellington.

Ao amigo Marcos Vicente Felix Batista, companheiro em mais esta jornada. Juntos nos melhores e nos mais difíceis momentos, sempre. Amigo que terá minha admiração, consideração e respeito para toda a vida. “- Valeu Feliz!”

A todos do grupo LCTV, sem a ajuda deste grupo de fato esta pesquisa não seria realizada. Toda equipe que em algum momento, sempre crucial, contribuiu para o andamento deste trabalho: Arquimedes, Eduarda, Fernanda, Fernando, Gemima, Maiza, Marina, Marta, Ronaldo, Simone, Thamirys.

Agradeço a Well pela atenção em toda fase do experimento e pelos momentos de descontração acompanhados de muito café e boas conversas.

Agradeço em especial a quatro “anjos” LCTVianos que muito aperreei durante esta pesquisa: Lalá (Laís Tomaz), Linda (Lindomar Souza), Lulu (Luciana Herculano) e Marci (Marciana Morais). “– Meninas, muito obrigado por tudo!”

Enfim, Obrigado!

Vinicius Mendes de Azevedo

Oração do Anjo da Guarda

Santo Anjo do Senhor, meu zeloso guardador, se a ti me confiou a piedade divina, sempre me rege me guarde me governe e me ilumine. Amém.

“...se um dia eu, lutar e perder, em vão será o meu pranto ao nascer do sol a nova chance não estará longe...”

SUMÁRIO

RESUMO	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	15
REVISÃO DE LITERATURA	17
1. Cana de açúcar	17
2. Influência do estresse ambiental sobre a produção agrícola	18
3. Efeito isolado do estresse: salino, hídrico e temperatura	19
4. Estresses Múltiplos em plantas	21
5. Estresse oxidativo.....	22
6. Antioxidantes Enzimáticos.....	24
6.1 Superóxido Dismutase (E.C. 1.15.1.1).....	24
6.2 Catalase (CAT; EC: 1.11.1.6)	25
6.3 Ascorbato peroxidase (E.C. 1.11.1.11)	26
7. Literatura citada.....	26
Ação combinada de estresse salino e hídrico na variedade de cana-de-açúcar RB 92 579 sob elevada temperatura respostas fisiológicas e bioquímicas	33
Resumo.....	33
Abstract	34
Introdução	35
Material e Métodos	37
Resultados e Discussão	41
Conclusão.....	52
Literatura citada	53

RESUMO

A cana-de-açúcar em condições naturais esta frequentemente exposta a diversos tipos de estresses os quais, quase sempre, ocorrem de forma combinada, e não isoladamente. Tais combinações podem incluir seca e calor, seca e salinidade e, muitas vezes, incluem combinações triplas como seca, salinidade e calor. A cultura da cana-de-açúcar suporta bem altas temperaturas, sendo grande a expectativa quanto a sua expansão e inserção em áreas semi-áridas, características do nordeste brasileiro. Desta forma é fundamental a importância de estudos das interações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, responsáveis pela aclimatação da cultura. Este trabalho teve por objetivo identificar mecanismos fisiológicos e bioquímicos que favoreçam a aclimatização de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) a condições de estresse: salino, hídrico e de elevadas temperaturas de forma isolada e combinada. Para tal foi realizado um experimento em câmara de crescimento (ambiente controlado), utilizando-se a variedade RB 92579, cinco níveis de salinidade (0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl em solução nutritiva), duas condições de irrigação (rega contínua e suspensão de rega) cada tratamento contendo 10 repetições. Assim, foram estabelecidas duas condições de estresse, o estresse duplo (temperatura e salinidade), e o estresse múltiplo (temperatura, salinidade e déficit hídrico). Ao final do experimento o material vegetal foi coletado uma parte foi congelada em nitrogênio líquido para posterior análise da catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), peroxidação lipídica (MDA) e teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2); a outra parte foi utilizada para determinação da massa fresca (MF) e teor relativo de água (TRA). Sob estresse por temperatura e salinidade a massa fresca e o teor relativo de água reduziram linearmente, o peróxido de hidrogênio atuou como sinalizador do estresse. Ocorreu um incremento na atividade das enzimas superóxido dismutase e ascorbato peroxidase. No estresse múltiplo a salinidade suave 50 mM, promoveu uma manutenção da massa fresca e do teor relativo de água e assim uma menor peroxidação lipídica. As enzimas catalase e ascorbato peroxidase tiveram um incremento, enquanto a superóxido dismutase decaiu.

Palavras-chave: Estresse abiótico, Estresse oxidativo, Cana-de-açúcar

ABSTRACT

The sugar cane under natural conditions is often exposed to various types of stress which occur in combination of factors and never in isolation. Those combinations can include drought and heat, drought and salinity, and often include triple combinations such as drought, salinity and heat. Sugar cane supports high temperatures and because of that expectations regarding its expansion and inclusion in semi-arid areas, characteristics of the Brazilian northeast, are great. Thus it is fundamental to study the morphological, physiological, biochemical and molecular interactions, responsible for acclimatization culture. This study aimed to identify physiological and biochemical mechanisms that favor the acclimatization of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) under stress conditions: saline, water and higher temperatures in isolation and combined. For such experiment was conducted in a growth chamber (controlled environment), using a variety RB 92579, five salinity levels (0, 25, 50, 75 and 100 mM NaCl in nutrient solution), two irrigation conditions (continuous irrigation and irrigation suspension) and 10 repetitions for each treatment. Thus it was established two stress conditions, the double stress (temperature and salinity) and multiple stress (temperature, salinity and drought). At the end of the experiment the plant material was collected and part was frozen in liquid nitrogen for later analysis of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD), lipid peroxidation (MDA) content and hydrogen peroxide (H₂O₂), the other part was used for determination of fresh mass (MF) and relative water content (TRA). Under temperature stress and salinity fresh mass and relative water content decreased linearly hydrogen peroxide served as a marker of stress. There was an increase in the activity of enzymes superoxido dismutase and ascorbate peroxidase. Salinity stress in multiple soft 50 mM promoted maintenance of fresh weight and relative water content and thus a lower lipid peroxidation. The enzymes catalase and ascorbate peroxidase were increased, while superoxide dismutase decreased.

Keywords: abiotic stress, oxidative stress, Sugarcane

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1 - Mecanismos de eliminação de espécies reativas de oxigênio, seus compartimentos celulares e respectivas espécies removidas.....	24
--	----

CAPITULO II

Tabela 1 – Grupos de plantas, variedade RB 92579: (A) rega contínua ao longo do experimento e (B) supressão ao 13o dia; cinco níveis de mM de NaCl.....	37
--	----

Tabela 2 - Resumo das análises de variância dos parâmetros: Matéria Fresca (MF), Teor relativo de água (TRA), Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX), Superóxido dismutase (SOD), Peroxidação lipídica (MDA) e Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	41
--	----

Tabela 3 – Média da produção de matéria fresca e do teor relativo de água em plantas de cana de açúcar, variedade RB 92579, em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (35 °C durante o dia e 27 °C durante a noite) durante todo o período experimental.....	43
---	----

Tabela 4 – Atividade das enzimas Superóxido dismutase, Catalase e ascorbato peroxidase na variedade de cana de açúcar RB 92579, submetida a cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (35 °C durante o dia e 27 °C durante a noite) durante todo o período experimental.....	45
--	----

Tabela 5 – Produção de MDA e H ₂ O ₂ na variedade de cana de açúcar RB 92579, submetida a cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (35 °C durante o dia e 27 °C durante a noite) durante todo o período experimental.....	48
--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO II

- Figura 1** – Massa fresca da parte aérea da variedade de cana de açúcar RB 92579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (35 °C durante o dia e 27 °C durante a noite) durante todo o período experimental..... 42
- Figura 2** – Teor relativo de água na variedade de cana de açúcar RB 92579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (35 °C durante o dia e 27 °C durante a noite) durante todo o período experimental..... 44
- Figura 3** – Atividade enzimática da SOD na variedade de cana de açúcar RB92 579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (35 °C durante o dia e 27 °C durante a noite) durante todo o período experimental..... 46
- Figura 4** – Atividade enzimática da APX na variedade de cana de açúcar RB 92 579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (35 °C durante o dia e 27 °C durante a noite) durante todo o período experimental..... 47
- Figura 5** – Teor de Peróxido de hidrogênio na variedade de cana de açúcar RB 92579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (35 °C durante o dia e 27 °C durante a noite) durante todo o período experimental..... 49
- Figura 6** – Conteúdo de MDA na variedade de cana de açúcar RB 92579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (35 °C durante o dia e 27 °C durante a noite) durante todo o período experimental..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- $\cdot\text{OH}$ - Radical Hidroxila
 $^1\text{O}_2$ - Oxigênio Singleto
APX – Peroxidade do ascorbato
AsA - Ascorbato
BSA - Albumina de soro bovino
CAT – Catalase
CRA - Conteúdo Relativo de água
DM - Dano da membrana
GR - Redutase Glutaciona
 H_2O_2 - Peróxido de Hidrogenio
MDA - Malodialdeído
MDHAR - Monodehidroascorbato
MF - Massa fresca
MS - Massa seca
MT - Massa túrgida
 $\text{O}_2^{\cdot-}$ - Radical Superoxido
PAs - Poliaminas totais
PIA - Porcentagem da integridade da membrana
PVP - Polivinilpirrolidona
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SOD – Superoxido dismutase
Spd - Espermidina
Spm - Espermina
TCA - Ácido tricloroacético
TRA – Teor relativo de água

CAPITULO I
REVISÃO DE LITERATURA

INTRODUÇÃO GERAL

O aumento das temperaturas, em decorrência do aquecimento global, pode provocar um grande impacto na agricultura alterando profundamente a geografia da produção agrícola no Brasil se nada for feito para mitigar os efeitos das mudanças climáticas e adaptar as culturas para a nova situação. (EMBRAPA 2008).

No semiárido brasileiro, onde ocorre frequentemente estresse múltiplo (déficit hídrico, salinidade, altas temperaturas e luminosidade) é fundamental a adoção de estratégias competitivas de manejo da produção agrícola, que permita o máximo desempenho das culturas.

Uma das razões dos distúrbios nos processos fisiológicos em plantas expostas a fatores abióticos danosos é a intensa geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). A formação das espécies reativas de oxigênio pode atacar e modificar quase todas as moléculas orgânicas, resultando em sérios danos às células e aos tecidos (APEL E HIRT, 2004).

As principais formas de ROS são: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e oxigênio singleto (1O_2). O efeito citotóxico destas espécies ocorre quando sua produção é maior que a capacidade antioxidante da célula, desta forma, quando isto ocorre evidencia-se o chamado estresse oxidativo (PANDHAIR E SEKHON, 2006).

A aclimação e adaptação das plantas a vários fatores estressantes dependem grandemente do funcionamento de enzimas antioxidantes, destacando-se a ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), as quais são capazes de eliminar especificamente o superóxido e o peróxido de hidrogênio.

Como toda cultura agrícola, a produção da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L) é influenciada por um grande número de fatores ambientais. Várias regiões brasileiras são produtoras de cana-de-açúcar e o Brasil é o maior produtor mundial.

Para atender ao aumento da demanda mundial de álcool, em função da necessidade crescente de utilização de bicompostíveis, bem como do açúcar, é fundamental conhecer mais detalhadamente a resposta da cultura aos fatores ambientais para que sejam viáveis melhoras genéticas e conseqüentemente alcançados altos

rendimentos a baixos custos. Desta forma é necessário, portanto, ampliar e aprofundar os conhecimentos dos mecanismos de tolerância da cana-de-açúcar ao estresse oxidativo.

O presente trabalho objetiva estudar o estresse múltiplo como um novo estado de estresse abiótico que requer uma nova defesa ou aclimatação da planta. Assim, estudos sobre as variáveis fisiológicas e bioquímicas na cultura da cana-de-açúcar sob estresse combinado é um desafio que deve agregar esforços para seleção de cultivares com maior tolerância ao estresse múltiplo.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Cana de açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum spp.*, cultivada no Brasil desde o século XVI, apresenta grande expansão em sua área cultivada nas últimas décadas, destacando-se como uma das principais plantas cultivadas no país, cobrindo 10% da área cultivada e 1% da área total disponível para agricultura no país (GOLDEMBERG, 2007).

A cana-de-açúcar é uma planta alógama, da classe Monocotiledônea, ordem Glumiflorae graminales, Família Poaceae, e pertencente ao gênero *Saccharum*. Está entre as espécies de maior rendimento fotossintético da família Poaceae, possui metabolismo C₄, apresentando elevada eficiência no resgate e utilização do gás carbônico atmosférico, além de alta adaptabilidade às condições de alta luminosidade e temperaturas elevadas (SEGATO et al. 2006).

A cadeia produtiva sucroalcooleira, representada pelo conjunto amplo e articulado de atividades que vão desde a produção da cana-de-açúcar, até a colocação do açúcar e do álcool no mercado para consumo final, é bastante estruturada no Brasil, único país do mundo que domina todos os estágios da sua tecnologia de produção. (SEBRAE, 2008)

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância socioeconômica e ambiental para o país, sendo cultivada por pequenos, médios e grandes produtores rurais. O Estado de São Paulo é o maior produtor no Brasil, seguido por Minas Gerais, Goiás, Paraná, Mato Grosso do Sul e Alagoas. Pernambuco é o sétimo maior produtor com uma área plantada correspondente a 3,63% ou 309,74 mil hectares do total (CONAB, 2012).

O Brasil encontra-se na posição de maior produtor e exportador mundial de açúcar. A previsão total de cana moída na safra 2012/2013 deve atingir cerca de 596,63 milhões de toneladas, gerando uma estimativa total de produção de açúcar de 38,6 milhões de toneladas enquanto a geração de etanol é estimada em 27 bilhões de litros (CONAB, 2012).

A cana-de-açúcar é uma das maiores conversoras de energia, caracterizando-se como uma verdadeira fábrica de energia renovável e limpa. Tendo o setor sucroalcooleiro um crescimento destacado especialmente no mercado interno devido ao

avanço da tecnologia dos veículos bicompostíveis e como consequência pelo aumento na demanda de etanol.

O cultivo da cana-de-açúcar na região Nordeste é realizado, tradicionalmente, nas zonas úmidas de Mata e Litoral, mas vem se expandindo para regiões semiáridas (SEAGRI, 2007).

Desta forma, torna-se de grande importância à caracterização de materiais genéticos de qualidade superior, seja com relação ao potencial produtivo, seja com respeito à qualidade como matéria prima industrial, a fim de se obter variedades que se adaptem as condições adversas da região semiárida.

2. Influência do estresse ambiental sobre a produção agrícola

A preocupação com a resposta das plantas às condições ambientais desfavoráveis está se tornando cada vez mais importante. O cenário de mudanças climáticas observadas nas últimas décadas sugerem um aumento da aridez em muitas áreas do globo (BLUM, 2011).

De uma forma global, a aridez considerando-se o déficit hídrico, a salinização em combinação com a alta temperatura e radiação coincidentes, determina as restrições ambientais mais importantes para a sobrevivência das plantas e para a produtividade das culturas (BOYER, 1982).

No Brasil, estimativas da EMBRAPA mostram que o aumento das temperaturas e o déficit hídrico, em decorrência do aquecimento global, podem provocar perdas nas safras de grãos de R\$ 7,4 bilhões já em 2020, número que pode subir para R\$ 14 bilhões em 2070 e alterar profundamente a geografia da produção agrícola no Brasil se nada for feito para mitigar os efeitos das mudanças climáticas e adaptar as culturas para a nova situação (EMBRAPA, 2008).

As simulações do impacto da mudança do clima na agricultura apontam para a expansão da cana-de-açúcar, pois a elevação da temperatura prevista para as próximas décadas pode ser no geral, bem tolerada para esta cultura. Segundo pesquisas da EMBRAPA (2008), a cana-de-açúcar pode se espalhar pelo país a ponto de dobrar a área de ocorrência.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o aumento da produtividade do setor agropecuário nos últimos anos no Brasil, que foi em torno de 60%, foi resultado de avanços na pesquisa (EMBRAPA, 2008).

Nesse cenário destaca-se a importância de estudos das interações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, responsáveis pela aclimação das culturas às flutuações ambientais, uma vez que a planta deve alcançar um novo estado de homeostase quando submetida a estresse (MILLER et al., 2010).

3. Efeito isolado do estresse: salino, hídrico e temperatura

A Salinidade é um dos principais fatores ambiental limitante da produtividade e expansão agrícola. É muitas vezes responsável pela perda da produtividade agrícola, chegando a ocasionar em regiões áridas à inviabilização do cultivo de espécies economicamente importantes (SAHI et al., 2006).

Solos salinos provocam estresse osmótico, resultante das altas concentrações de soluto no solo, e estresse iônico, ocasionado pela queda na razão K^+/Na^+ , alterando a homeostase celular. Embora o sódio seja um micronutriente não essencial, em níveis elevados torna-se tóxico para o crescimento vegetal (BLUMWALD, 2000).

Durante o estresse salino, a fotossíntese e o crescimento celular são afetados (MUNNS et al., 2006) diretamente com a queda na disponibilidade de CO_2 (FLEXAS et al., 2007), fechamento estomático e alterações no metabolismo fotossintético (LAWLOR E CORNIC, 2002) ou indiretamente com o estresse oxidativo.

A salinidade compromete severamente a produtividade e qualidade do produto, principalmente devido a uma redução da eficiência fotossintética (AKHTAR et al., 2003), isto é desencadeado principalmente por uma ruptura na homeostase do potencial hídrico da planta e pela distribuição de íons, tanto a nível celular como para a planta inteira (MUNNS E TESTER 2008).

Os efeitos deletérios do estresse salino são minimizados por mecanismos que envolvem a compartimentalização e exclusão iônica, controle da captação de íons pela raiz e transporte para as folhas, síntese de osmoprotetores, mudança no processo fotossintético, alteração na estrutura da membrana, síntese de fitormônios e indução de enzimas antioxidantes (PARIDA E DAS, 2005).

O déficit hídrico afeta a bioquímica, a fisiologia, a morfologia e os processos de desenvolvimento das plantas. A resistência ao estresse hídrico se manifesta geralmente de quatro formas distintas: a) limitação do crescimento com forma de economia de

água; b) adaptações morfológicas; c) adaptações fisiológicas; e d) alterações metabólicas.

No entanto, a capacidade da planta responder e sobreviver ao estresse hídrico celular depende dos mecanismos internos que integram as respostas celulares. Tais respostas podem ocorrer em alguns segundos, minutos ou até mesmo em horas (BRAY, 1997). A primeira reação ao déficit hídrico é a diminuição da condutância estômática, minimizando a perda de água pela transpiração. Contudo, o fechamento dos estômatos têm consequências complexas, exigindo ajustes de fotossíntese, respiração e no fluxo de água (BOHNERT E JENSEN, 1996).

Durante o estresse hídrico, as plantas costumam ter uma menor taxa de assimilação de carbono, o que ocasiona uma baixa utilização dos elétrons gerados na cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, uma superprodução de espécies reativas de oxigênios as chamadas ROS (EDREVA, 2005).

A adaptação de plantas a estresses ambientais é dependente da ativação de cascatas de redes moleculares envolvidas na percepção, transdução de sinal e expressão de genes e metabólitos específicos relacionados ao estresse (VINOCUR E ALTMAN, 2005).

Altas temperaturas podem afetar a fotossíntese modulando a taxa de atividade das enzimas que participam do processo fotossintético e da cadeia transportadora de elétrons (SAGE E KUBIEN, 2007).

Em cana de açúcar, cultivada em regiões com altas temperaturas (40 ° C) mostram um declínio significativo na massa seca da parte aérea provavelmente devido à redução do CO₂ armazenado (WAHID, 2007).

4. Estresses Múltiplos em plantas

Uma ampla variedade de condições ambientais desfavoráveis podem provocar estresse nas plantas, estas condições incluem temperaturas extremas, salinidade, seca, radiação UV, danos mecânicos, déficit nutricional; os quais podem alterar o crescimento, desenvolvimento e metabolismo, chegando a ocasionar inclusive a morte das plantas. (LAWLOR, 2002).

Em condições ambientais naturais frequentemente as plantas são submetidas a diversos estresses os quais, quase sempre, ocorrem de forma combinada, e não isoladamente. Tais combinações podem incluir a associações de estresses como seca e calor, seca e frio e, muitas vezes, incluem combinações triplas como seca, salinidade e calor (MILLER et al., 2010).

Os efeitos do estresse abiótico em as plantas vêm sendo estudados ao longo do tempo e recentemente avanços consideráveis foram obtidos nesta área. A maioria dos estudos, entretanto, 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. A resposta do estresse combinado é diferente da soma das respostas dos fatores abióticos aplicados isoladamente, e os fatores de estresse podem revelar uma interação antagônica ou sinérgica (MITTLER, 2006).

Segundo a Matriz do Estresse elaborada por Mittler (2006), o estresse salino associado ao estresse por elevada temperatura ou déficit nutricional é considerada uma interação 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 ou deficiência nutricional também é considerado potencialmente negativo. Por outro lado, a associação do estresse salino ao estresse hídrico ainda é pouco conhecida.

Diversos tipos de estresse abiótico geram um estresse secundário, o estresse oxidativo, o qual é resultante do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A limitação da fixação de CO₂ resultante do estresse hídrico, salino, excesso de calor e luz promovem um incremento na produção de ROS decorrentes da reação de Mehler e dos pigmentos antena dos cloroplastos (HARIR E MITLLER, 2009). O

acúmulo de espécies reativas de oxigênio induzido pelo estresse é potencialmente citotóxico.

Para evitar os efeitos prejudiciais do acúmulo das ROS, as plantas desenvolveram um complexo mecanismo de defesa antioxidativo constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes (DEWIR et al., 2005). A capacidade de acionar o mecanismo de defesa antioxidativa pode prevenir o acúmulo de ROS e o estresse oxidativo extremo (DEWIR et al., 2005).

O estresse múltiplo resulta em diversas respostas metabólicas que variam em função do tipo de estresse aplicado, da espécie e variedade em estudo (ZHAO et al., 2010).

5. Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio são constantemente produzidas nas plantas como subprodutos da respiração e fotossíntese. Em condições normais de desenvolvimento as plantas produzem estas espécies e as mantém em pequenas concentrações.

A produção de ROS é favorecida por vários fatores ambientais de estresse como a exposição a níveis elevados de luminosidade, seca, concentração de sais, elevada temperatura, metais pesados, radiação UV, poluição do ar, herbicidas, estresse físico e mecânico e também como resposta a estresses bióticos tais como o ataque de patógenos (MALLICK E RAI, 1999).

As principais espécies produzidas incluem os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e oxigênio singleto (1O_2). A caracterização do poder citotóxico destas espécies ocorre quando sua produção é maior que a capacidade antioxidante da célula, desta forma, quando isto ocorre evidencia-se o chamado estresse oxidativo (PANDHAIR E SEKHON, 2006).

As ROS são formadas pela redução parcial do oxigênio molecular (O_2). O oxigênio molecular (O_2) é completamente reduzido por quatro elétrons transportados ao longo da cadeia respiratória, gerando água (H_2O). No entanto, uma pequena parcela dos elétrons escapa da cadeia transportadora resultando em uma redução parcial do O_2 com a consequente produção das ROS. A transferência de um, dois ou três elétrons para o O_2 resulta respectivamente na formação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}).

Os radicais superóxidos (O_2^-) não atravessam membranas ficando confinados onde são produzidos, eles oxidam aminoácidos específicos, como metionina, histidina e triptofano. O superóxido também pode causar peroxidação de lipídica no ambiente celular e nas membranas celulares (BREUSEGEM et al., 2001).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), é uma espécie considerada moderadamente reativa, possui uma relativa longa vida celular e pode atravessar distâncias consideráveis de seu local de produção (VRANOVÁ et al., 2002). A toxicidade do H_2O_2 é reforçada pela presença de catalisadores metálicos (Fe^{2+} e Cu^{2+}) pela reação de Haber-Weiss ou Fenton (VRANOVÁ et al., 2002), formando radicais hidroxila (OH^-).

Considerada a mais reativa das ROS, os radicais hidroxila apresentam uma meia-vida muito curta, pois reagem muito rapidamente com moléculas biológicas, sequestrando aleatoriamente um átomo de hidrogênio (BREUSEGEM et al., 2001).

Pesquisas recentes mostram uma participação das ROS na sinalização celular, atuando como mensageiros secundários, para a ativação de respostas a estresse e em mecanismos de defesa (MITTLER, 2006). O estresse oxidativo pode ativar a morte celular devido à peroxidação lipídica de membranas, oxidação de proteínas, inibição enzimática e danos ao DNA e RNA.

Para evitar os efeitos prejudiciais do acúmulo das ROS, as plantas desenvolveram um complexo mecanismo de defesa antioxidativo constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes (DEWIR et al., 2006). Nos mecanismos enzimáticos destacam-se: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) (NOCTOR E FOYER, 1998).

As ROS podem ser produzidas em qualquer compartimento celular e são controladas por um complexo sistema antioxidante que as plantas evoluíram para atuar de forma coordenada a fim de conter os efeitos deletérios desta produção (EL-SHABRAWI et al., 2010).

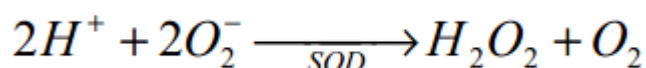
Tabela 1 - Mecanismos de eliminação de espécies reativas de oxigênio, seus compartimentos celulares e respectivas espécies removidas.

Mecanismo	Remoção	Produto	Localização celular
Catalase (CAT)	H ₂ O ₂	H ₂ O	Mitocôndria, Peroxissomos. Citosol, mitocôndria,
Ascorbato Peroxidase (APX)	H ₂ O ₂	H ₂ O	peroxissomos, membrana plasmática, microcorpos, glioxissomos.
Superoxido dismutase (SOD)	O ₂	(H ₂ O ₂)	Citosol, mitocôndria, peroxissomos, microsossomos, glioxissomos.

6. Antioxidantes Enzimáticos

6.1 Superóxido Dismutase (E.C. 1.15.1.1)

A primeira linha de defesa nas células contra a formação dos superóxidos é realizada pela enzima SOD (ALSCHER et al., 2002), esta cataliza a reação de dismutação dos radicais superóxidos a O₂ e H₂O₂ assim descrita na equação de Haber-Weiss (KOPPENOL, 2001):



O primeiro passo consiste na reação do ânion superóxido com o grupo prostético da SOD na sua forma oxidada. Essa ligação conduz à aquisição de um próton e a consequente liberação de oxigênio molecular. A forma reduzida da enzima liga, então, um segundo ânion superóxido e próton, para liberar H₂O₂ e retornar à sua forma oxidada.

As membranas fosfolipídicas são impermeáveis a moléculas carregadas de O₂, desta forma a SOD tem importância fundamental na remoção desses superóxidos nos compartimentos onde são formados.

O número e o tipo de isoformas de SOD são variáveis entre as espécies vegetais, bem como a abundância relativa de cada isoforma.

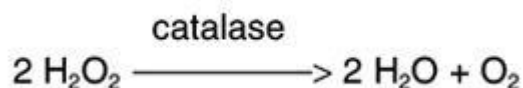
As isoformas da SOD são classificadas em três grupos, de acordo com o co-fator inorgânico ligado a região proteica: ferro SOD (SOD-Fe), localizada no cloroplasto; manganês SOD (SOD-Mn), localizada em mitocôndrias e peroxissomos e a SOD cobre-zinco (SOD Cu-Zn) em cloroplastos, citosol e, possivelmente, no apoplasto (ALSCHER et al., 2002).

Contudo o H₂O₂ gerado na conversão de superóxidos pela SOD também é tóxico e deve ser eliminado pela ação da catalase e/ou peroxidases.

6.2 Catalase (CAT; EC: 1.11.1.6)

As CATs são enzimas de oxirredutases, proteínas tetraédricas, constituídas por 4 grupos heme abundantemente encontradas nos peroxissomos de folhas, glioxissomos de tecidos e mitocôndrias (SCANDALIOS, 1993).

Desta forma, estas enzimas estão divididas em três classes: classe 1, encontradas em tecidos fotossintéticos, responsáveis por remover o H₂O₂ produzido durante a fotorespiração; classe 2, encontradas nos tecidos vasculares e classe 3, encontradas em sementes e plantas jovens e são responsáveis pela remoção do H₂O₂ produzido durante a catálise de ácidos graxos no glioxisomas (RESENDE et al., 2003). Sua reação pode ser descrita como:



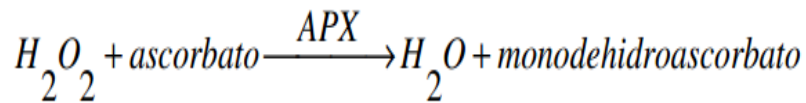
A catalase é a única entre as enzimas que degradam o H₂O₂ que não consome equivalentes redutores da célula e que possui mecanismo muito eficiente para a remoção do peróxido de hidrogênio formado sob condições de estresse (MALLICK E MOHN, 2000).

No entanto a CAT tem uma baixa afinidade pelo peróxido de hidrogênio requerendo a ligação de duas moléculas dessa ROS para que a reação ocorra, desta forma, a CAT é provavelmente responsável pela remoção do excesso do H₂O₂ durante o estresse (GRATÃO et al., 2005), além de proteger a SOD da inativação por altos níveis de desta espécie reativa (FRIDOVICH, 1995).

6.3 Ascorbato peroxidase (E.C. 1.11.1.11)

A ascorbato peroxidase (APXs) é um dos grupos mais importantes de enzimas antioxidantes, sendo encontradas cinco isoformas: citosólica, mitocondrial, peroxissomal, glioxissomal e cloroplástica.

Esta enzima utiliza o ascorbato como seu doador de elétrons específicos para reduzir H_2O_2 a água, constituindo parte do ciclo conhecido como ciclo da ascorbato-glutationa (SHIGEOKA et al., 2002). Sua reação pode ser descrita como:



A APX utiliza duas moléculas de ascorbato (AsA) para a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio, gerando ao mesmo tempo moléculas de monohidroascorbato (MDHA), o qual é reduzido a AsA pela dehidroascorbato redutase (DHAreductase), usando NADH/NADPH como doador de elétrons. A DHAreductase utiliza a glutatona (GSH) como substrato para reduzir o AsA.

Assim, APX em combinação com as funções efetivas do ciclo de AsA-GSH evitam a acumulação de H_2O_2 a níveis tóxicos em organismos fotossintéticos. É uma via eficiente de células de plantas que dispõem do peróxido de hidrogênio em determinados compartimentos onde não existe catalase presente, como por exemplo, no cloroplasto (MITTLER, 2002).

7. Literatura citada

APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

AKHTAR S., WAHID A., RASUL E. Emergence, growth and nutrient composition of sugarcane sprouts under NaCl salini ty. **Biologia Plantarum**, v. 46, p. 113-116, 2003.

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

BLUM, A. Drought resistance – is it really a complex trait? **Functional Plant Biology**, v. 38, p.753–757, 2011.

BLUMWALD, E., AHARON, G.S. and Apse, M.P. Sodium transport in plant cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.140-151, 2000.

BOHNERT, H.J.; JENSEN, R.G. Strategies for engineering water- stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, v.14, p.89–97, 1996.

BOYER, J, S. Plant productivity and environment. **Science**, v.218, p.443-448, 1982.

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

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2012 – Brasília : Conab 2012.

DEWIR, Y.H; CHAKRABARTY, D; ALI, M.B.; PAEK, K.Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany** v. 58, p. 93-99, 2005

.

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

EL-SHABRAWI, H.; KUMAR, B.; KAUL, T.; REDDY, M. K.; SILNGLAPAREEK, S. L.; SOPORY, S. K. Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. **Protoplasma**, v.245, p. 85-96. 2010

EMBRAPA. Aquecimento Global e Cenários Futuros da Agricultura. Coordenadores: Assad, E. e Pinto, H.S. Cepagri/Unicamp, São Paulo p. 84, 2008.

FLEXAS, J., DIAZ-ESPEJO, A., GALMÉS, J., KALDENHOFF, R., MEDRANO, H., RIBAS-CARBO, M. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. **Plant, cell and environment**, v.30, p.1284-1298, 2007.

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

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, v.315, p.808-810, 2007.

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.

HARIR, Y., MITTLER, R. The Ros Signaling Network of Cells. Del Rio, L.A. and Puppo (Eds.). *Reactive Oxygen Species in Plants Signaling*. Springer-Verlag. Berlin, p. 245, 2009.

KOPPENOL, W.H. The Haber-Weiss cycle 70 years later. *Redox Report*, v.6, p.229-234, 2001.

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

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

MALLICK, N., MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, p. 183-193, 2000.

MALLICK, N., RAI, C. L. Response of the Antioxidant Systems of the Nitrogen Fixing Cyanobacterium *Anabaena daliaurn* to Copper. **Journal of Plant Physiology**, v.155, p. 146-149, 1999.

MILLER, G., SUZUKI, H., 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.

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

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

MUNNS R, JAMES RA, LAÜCHLI A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, v.57, p.1025–1043, 2006.

MUNNS, R., TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, 2008.

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.

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

PARIDA, A.K., DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Revista de Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

SAGE, R.F. KUBIEN, D.S. The temperature response of C₃ and C₄ photosynthesis. **Plant, Cell and Environment** , v. 30, p. 1086-1106, 2007.

SAHI, C., SINGH, A., KUMAR, K., BLUMWALD, E. AND GROVER, A. Salt stress response in rice: genetics, molecular biology and comparative genomics. **Functional Integrative Genomics** v. 6, p. 263-284, 2006.

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

SEAGRI. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária da Bahia. <<http://www.seagri.ba.gov.br/programas.asp?qact=viewprogram&prgid=49>>. Bahia 2007. 18 de abril de 2012.

SEBRAE. Cadeia produtiva da indústria sucroalcooleira: Cenários econômicos e estudos setoriais. p. 12, 2008.

SEGATO, S.V.; MATTIUZ, C.F.M.; MOZAMBANI, A.E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO et al. Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: Livroceres, p. 19-36, 2006.

SHIGEOKA, S., ISHIKAWA, T., TAMOI, M., MIYAGAWA, Y., TAKEDA, T., YABUTA, Y., YOUSHIKAWA, K. Regulation and Function of Ascorbate Peroxidase Isoenzymes. **Journal Experimental Botany**, v. 53, p. 1305-1319, 2002.

VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations, **Current Opinion Biotechnology**, v.16, p.123–132, 2005.

VRANOVA, E., INZE, D., BREUSEGEM, F. V. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of experimental botany**, v.53, p. 1227-1236, 2002.

WAHID, A. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. **Journal of Plant Research**, v. 120, p. 219-228, 2007.

ZHAO, F.Y.; LIU, T.; XU, Z.J. Modified Responses of Root Growth and Reactive Oxygen Species Scavenging System to Combined Salt and Heat Stress in Transgenic Rice. **Fiziologiya Rastanii**, v. 57, p. 556–563, 2010.

CAPITULO II

AÇÃO COMBINADA DE ESTRESSE SALINO E HÍDRICO NA VARIEDADE DE CANA DE AÇÚCAR RB 92 579 SOB ELEVADA TEMPERATURA RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS.

Ação combinada de estresse salino e hídrico na variedade de cana-de-açúcar RB 92579 sob elevada temperatura respostas fisiológicas e bioquímicas

Resumo

O presente estudo avaliou o efeito sobre as variáveis fisiológicas e bioquímicas da variedade de cana de açúcar RB 92579 em desenvolvimento inicial, submetida à ação do estresse por calor isolado ou combinado ao NaCl (estresse salino), e à suspensão de rega (estresse hídrico). O experimento foi conduzido em câmara de crescimento (ambiente controlado 35 °C/dia e 27 °C/ noite), em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 5 sendo, 2 (condições de irrigação: rega contínua e suspensão de rega) × 5 (níveis de salinidade 0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl). As mudas, provenientes de micropropagação, foram transplantadas para tubetes contendo areia lavada como substrato, e irrigadas diariamente com solução nutritiva em ambiente protegido. Após a fase de aclimação e desenvolvimento, aos 41 dias, as plantas foram submetidas às temperaturas de 35° C/dia e 27° C/noite em câmara de crescimento para início dos tratamentos. 15 dias após a diferenciação dos tratamentos a parte aérea das plantas foi coletada, uma parte foi congelada em nitrogênio líquido para posterior análise da catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), peroxidação lipídica (MDA) e teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂); a outra parte foi utilizada para determinação da massa fresca (MF) e teor relativo de água (TRA). Sob estresse por temperatura e salinidade a massa fresca e o teor relativo de água reduziram linearmente, o peróxido de hidrogênio atuou como sinalizador do estresse. Ocorreu um incremento na atividade das enzimas superóxido dismutase e ascorbato peroxidase. No estresse múltiplo a salinidade suave 50 mM, promoveu uma manutenção da massa fresca e do teor relativo de água e assim uma menor peroxidação lipídica. As enzimas catalase e ascorbato peroxidase tiveram um incremento, enquanto a superóxido dismutase decaiu.

Palavras-chave: Sistema antioxidante, Peroxido de hidrogênio, Peroxidação lipídica.

Abstract

Combined action of water and salt stress on the variety of cane sugar RB 92 579 under high temperature physiological and biochemical

The present study evaluated the effect of physiological and biochemical variables of the sugarcane variety RB 92579 in early development, submitted to the action of heat stress isolated or combined to NaCl (salt stress), and the suspension of irrigation (water stress). The experiment was conducted in a growth chamber (35 ° C controlled environment / day and 27 °C / night) in a completely randomized design in a factorial arrangement with 2 x 5, 2 (irrigation conditions: continuous irrigation and irrigation suspension) × 5 (salinity levels 0, 25, 50, 75, and 100 mM NaCl). The plant seedlings, obtained from micropropagation, were transplanted to plastic pots containing washed sand as substrate and irrigated daily with nutrient solution in a greenhouse. After the acclimatization phase and development, until 41 days, the plants were submitted to temperatures of 35 °C /day 27 °C/night in a growth chamber for starting the treatments. 15 days after differentiation treatments, aerial parts of the plants were collected, a portion was frozen in liquid nitrogen for later analysis of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD), lipid peroxidation (MDA) content and hydrogen peroxide (H₂O₂), the other part was used for determination of fresh mass (FM) and relative water content (TRA). Under temperature stress and salinity fresh mass and relative water content decreased linearly hydrogen peroxide served as a marker of stress. There was an increase in the activity of enzymes superxido dismutase and ascorbate peroxidase. Salinity stress in multiple soft 50 mM promoted maintenance of fresh weight and relative water content and thus a lower lipid peroxidation. The enzymes catalase and ascorbate peroxidase were increased, while superoxide dismutase decreased.

Keywords: Antioxidant system, Hydrogen Peroxide, Lipid peroxidation

Introdução

A cultura da cana-de-açúcar é de grande importância socioeconômica e ambiental para o país, sendo cultivada por pequenos, médios e grandes produtores rurais, em áreas que totalizam mais de 8,5 milhões de hectares. Pernambuco é o sétimo maior produtor do Brasil com uma área plantada correspondente a 3,63% ou 309,74 mil hectares do total, com produtividade média aproximada de 55,6 T/ha (CONAB, 2012).

O plantio da cana de açúcar é tradicionalmente realizado em regiões do litoral brasileiro, contudo estudos apontam uma expansão do cultivo para áreas de clima semiárido (SEAGRI 2007). Com esta expansão para regiões onde frequentemente a cultura poderá estar exposta a um estresse combinado, múltiplo, torna-se de grande importância à caracterização de materiais genéticos de qualidade superior.

Em condições naturais as plantas estão constantemente submetidas a diversos tipos de estresses os quais, quase sempre, ocorrem de forma combinada, e não isoladamente. Tais estresses podem incluir combinações como seca, salinidade e calor. (Miller et al., 2010). A resposta do estresse combinado é diferente da soma das respostas dos fatores abióticos aplicados isoladamente, e os fatores de estresse podem revelar uma interação antagônica ou sinérgica Mittler (2006).

Diversos tipos de estresse abiótico geram um estresse secundário, o chamado estresse oxidativo, o qual é resultante do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Foyer & Noctor 2005). Estas espécies são resultantes da alteração do estado estacionário da molécula de oxigênio, com formação do oxigênio singleto ou pela transferência de um, dois ou três elétrons para o O₂ para formar, respectivamente, o radical superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ou o radical hidroxilo (OH[•]) (Mittler, 2002).

Em níveis elevados nos tecidos, o acúmulo destas espécies reativas torna-se tóxico podendo ocasionar inclusive a morte celular (Forman et al., 2010). As ROS provocam diversos danos celulares por causarem peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, quebras na cadeia de DNA e distúrbios na homeostase intracelular de íons de cálcio. (Nguyen et al., 2009).

As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas em diversas organelas celulares. Nos cloroplastos a limitação da fixação de CO₂ juntamente com o excesso de elétrons gerados na cadeia de transporte de elétrons é a principal causa da produção de ROS. O excesso de elétrons da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria é

também um importante mecanismo de geração de ROS. Já em peroxisomos, o H_2O_2 é produzido durante fotorespiração (Miller et al., 2010).

As plantas, por outro lado, podem mobilizar um complexo sistema antioxidante para conter os efeitos deletérios das ROS (El-Shabrawi et al., 2010). As principais defesas enzimáticas incluem a atuação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (Noctor & Foyer, 1998). A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as ROS, sendo responsável pela dismutação do $O_2^{\cdot-}$ para formar H_2O_2 e O_2 . A CAT e a APX são enzimas que catalisam a conversão do H_2O_2 à água e O_2 (Mittler, 2002).

Compreender a atuação do sistema antioxidante envolvidos nas respostas ao estresse oxidativo em diferentes condições ambientais, é determinante para identificar as estratégias das plantas que permitam seu desenvolvimento em situações adversas.

O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas da variedade de cana-de-açúcar RB 92579 submetida ao estresse combinado ou isolado ao NaCl (estresse salino), e à suspensão de rega (estresse hídrico) sob elevada temperatura.

Material e Métodos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE. Foram utilizadas mudas de cana-de-açúcar da variedade RB-92579 micropropagadas, provenientes de biorreatores de imersão temporária da biofabrica Governador Miguel Arraes do CETENE (Centro de Tecnologias Estratégias para o Nordeste).

As mudas, acondicionadas em bandejas de germinação inicialmente foram cultivadas em ambiente protegido para aclimatização a uma nova condição. Após cinco dias as mudas foram transplantadas para tubetes contendo areia lavada como substrato posteriormente estas foram transferidas para casa de vegetação permanecendo por mais 41 dias para um melhor desenvolvimento. As mudas foram irrigadas diariamente com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) garantindo a manutenção da capacidade máxima de retenção de água.

Para condução do experimento foram selecionadas 100 plantas devidamente padronizadas, os tubetes foram identificadas de acordo com a diferenciação de cada tratamento, sendo posteriormente transferidos para câmara climática onde eram controlados o fotoperíodo e a temperatura. As plantas foram submetidas à temperaturas de 35 °C durante o dia (12 horas) e 27 °C durante a noite (12h).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em um arranjo fatorial (5 x 2) que incluíam cinco níveis de salinidade 0, 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl acrescido em solução nutritiva e duas condições de rega: rega contínua e suspensão de rega), cada tratamento contou com 10 repetições (Tabela 1).

Tabela 1 – Grupos de plantas, variedade RB 92579: (A) rega contínua ao longo do experimento e (B) suspensão ao 13o dia; cinco níveis de mM de NaCl. As plantas foram mantidas a 35 °C durante o dia e 27°C durante a noite.

Regime de rega		Níveis de NaCl (mM)				
		0,0	25	50	75	100
Grupo A	Contínuo	Estresse por temperatura			Estresse duplo (temperatura+ salino)	
Grupo B	Suspensão	Estresse duplo (temperatura + hídrico)		Estresse múltiplo (temperatura + salino+ hídrico)		

As plantas foram irrigadas com solução nutritiva correspondente ao seu respectivo nível de salinidade, durante 13 dias. Após este período, houve a supressão total da rega para o grupo “B” de plantas, e as plantas do grupo “A” tiveram a irrigação mantida durante todo o período experimental. As plantas foram mantidas na câmara durante 15 dias.

O pH das soluções nutritivas foi mantido constante em 5,9, e a condutividade elétrica referente aos cinco níveis de salinidade corresponderam respectivamente a 1,92; 3,84; 7,77; 10,45; 13,0 dS⁻¹m).

Ao final do experimento o material vegetal fresco da parte aérea foi colhido, parte foi utilizada para determinação da massa fresca e do teor relativo de água e outra parte foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -20°C ate realização das análises.

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Assistat, as variáveis foram analisadas estatisticamente pelo teste de F. O fator quantitativo, relativo aos níveis de salinidade, foi analisado estatisticamente por meio de regressão, visando o ajuste de equações a fim de correlacionar os níveis de salinidade com as variáveis estudadas. O fator condição de rega foi analisado mediante teste de comparações de médias, a 5% de probabilidade.

Parâmetros Analisados:

Teor relativo de água (TRA)

Foi determinado seguindo o método de Cairo (1995). Em cada repetição foram retiradas cinco amostras da região central da folha, estas tiveram sua massa fresca (MF) determinada em balança. Essas amostras foram então mantidas em água deionizada durante 24 h e após remoção do excesso de água em papel filtro, foi obtida a massa túrgida (MT). Após isso, foram secas a 70 °C por 48h para determinação da massa seca (MS) do tecido. Os valores do TRA foram determinados pela equação: $(MF-MS)/(MT-MS) \times 100$.

Atividade enzimática

A extração de proteínas foi realizada a partir das amostras congeladas, maceradas e homogeneizadas com tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 1 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), 3 mM de DL-ditiotreitol e 20% de PVPP sob temperatura de - 4 °C na relação de 0,2g/2 mL (w:v) (AZEVEDO et al. 1998). O

homogeneizado foi centrifugado a 10.000g durante 15 min, A solução sobrenadante foi armazenada a -20°C e utilizada como fonte para determinação das proteínas totais solúveis e da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX).

Atividade da catalase

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, em espectrofotômetro a 240 nm, sob temperatura de 25 °C.

Atividade da Ascorbato peroxidase

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, em espectrofotômetro a 290 nm, a 30 °C, durante 60 segundos.

A atividade de superóxido dismutase

A SOD foi determinada a partir da inibição da redução do NBT (nitroblue 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 (GIANNOPOLITIS E RIES., 1977).

Peroxidação lipídica (MDA)

Baseada na quantificação de malondialdeído (MDA) 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 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.

Peróxido de hidrogênio

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 retirados 200 µL, 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 realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

Resultados e Discussão

Observou-se efeito significativo para a interação dos fatores salinidade e regime de rega sobre as variáveis MF, TRA, APX, SOD, MDA e H₂O₂ (Tabela 2). Para CAT foi constatado efeito significativo apenas para ação isolada dos fatores.

Tabela 2 - Resumo das análises de variância dos parâmetros: Matéria Fresca (MF), Teor relativo de água (TRA), Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX), Superóxido dismutase (SOD), Peroxidação lipídica (MDA) e Peroxido de hidrogênio (H₂O₂).

FV	GL	Quadrado Médio						
		MF	TRA	CAT	APX	SOD	MDA	H ₂ O ₂
Regime de Rega	1	9,44**	10467,5**	144,5**	449,9**	2474,2**	82,5**	29,6**
Níveis de Salinidade	4	1,36**	800,6**	9,12**	1493,6**	3,47ns	12,7**	4,84**
Interação (R x S)	4	2,35**	407,9*	4,7 ^{ns}	1191,1**	253,8**	9,24**	8,03**
Resíduo	40	0,08	130,6	2,06	27,53	2,12	0,24	0,12
CV (%)		17,42	17,35	12,16	10,62	9,25	9,47	6,79

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

O peso fresco das plantas submetidas à rega contínua decresceu linearmente (Figura 1) em função da elevação dos níveis de sal. Comparando as plantas que não receberam NaCl com as plantas submetidas ao nível mais elevado de salinidade, 100mM de NaCl, é possível observar um decréscimo de 60% na matéria fresca da parte aérea da variedade RB 92 579.

Altas concentrações de sódio e de cloreto inibem o crescimento vegetal, em função dos efeitos osmóticos e tóxicos dos íons (MUNNS et al., 2002). O fechamento estomático é uma das respostas fisiológicas mais rápidas ao estresse salino, sendo esta resultante da redução do potencial hídrico do solo (Munns & Tester, 2008). Dentre os mecanismos de adaptação à salinidade o controle na abertura dos estômatos é uma estratégia fundamental utilizada pelas plantas para reduzir as perdas de água por transpiração.

Associado ao fechamento estomático ocorre uma redução na taxa fotossintética constituindo uma das causas do reduzido crescimento das plantas sob estresse salino (Flowers, 2004). Esta redução no crescimento com o incremento da salinidade foi observada claramente nas plantas submetidas ao estresse salino sob elevadas temperaturas.

A redução do peso da matéria fresca das plantas submetidas ao estresse múltiplo (elevada temperatura, salino e hídrico) apresentou um comportamento polinomial (Figura 1). O menor valor absoluto ocorreu nas plantas do tratamento com ausência de salinidade, aumentando gradativamente nos níveis com 25 e 50 mM de NaCl, e novamente decrescendo nas plantas submetidas ao estresse mais severo, 75 e 100 mM de NaCl.

Este comportamento observado nos níveis 25 e 50 mM de NaCl indica que o estresse salino suave favoreceu a tolerância das plantas ao estresse hídrico aplicado posteriormente. O estresse salino severo associado ao estresse hídrico, por sua vez, foi prejudicial resultando na redução da produção da matéria fresca.

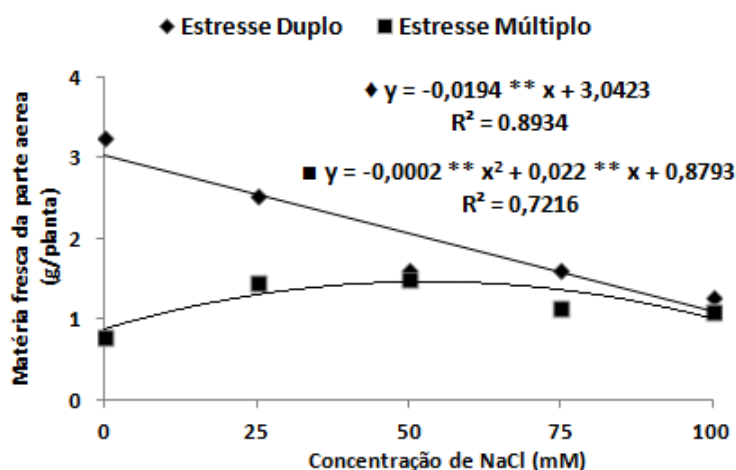


Figura 1 – Matéria fresca da parte aérea da variedade de cana de açúcar RB 92 579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de rega. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (37 °C durante o dia e 27 °C durante a noite).

Analisando os valores da matéria fresca entre os dois regimes de rega observa-se que o estresse múltiplo resultou em maiores reduções desta variável quando comparados ao estresse duplo para todos os níveis de salinidade, não diferindo significativamente apenas para o nível de 50 e 100 mM NaCl (Tabela 3).

Em relação ao TRA também foram observadas reduções na turgescência das folhas, sendo estas mais severas nas plantas submetidas a estresse múltiplo. Observa-se que sob estresse múltiplo as plantas do tratamento com ausência de salinidade, 0 mM de NaCl, apresentaram uma redução bem superior aos demais tratamentos com aplicação dos crescentes níveis de salinidade.

Na ausência da salinidade a perda na turgescência foi de aproximadamente 53%, enquanto nos níveis 25, 50, 75 e 100 mM a redução foi respectivamente de (28, 16, 43 e 38%). Apenas o nível com 50 mM de NaCl não diferiu significativamente entre os regimes de rega.

Nas duas menores concentrações de NaCl a salinidade atuou como um fator de condicionamento osmótico para as plantas, promovendo atividades pré-metabólicas, que permitiu às plantas suportarem melhor o déficit hídrico imposto em seguida. Esta menor perda da turgescência no nível com 50 mM de NaCl, sugere a eficiência do mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos, condicionado pelo estresse salino anterior à aplicação do deficit hídrico, e justifica o pico de massa fresca observado neste mesmo tratamento.

Tabela 3 – Média da produção de matéria fresca e do teor relativo de água em plantas de cana de açúcar, variedade RB 92579, em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (37 °C durante o dia e 27 °C durante a noite).

Regime de rega		Níveis de NaCl (mM)				
		0	25	50	75	100
Produção de matéria fresca da parte aérea (g/planta)						
Grupo A	Contínuo	3,25 a	2,54 a	1,62 a	1,63 a	1,28 a
Grupo B	Suspensão	0,72 b	1,46 b	1,50 a	1,14 b	1,10 a
Teor relativo de água (%)						
Grupo A	Contínuo	90,33 a	86,59 a	80,82 a	78,24 a	65,73 a
Grupo B	Suspensão	42,48 b	61,93 b	67,39 a	44,69 b	40,53 b

As médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si. Foi aplicado o Teste F ao nível de 5% de probabilidade.

O controle das funções fisiológicas das plantas está diretamente relacionado com o seu conteúdo hídrico e alterações no TRA afetam diretamente todo o aparato fotossintético (Angelocci, 2002), e na conseqüente produção de matéria seca.

O TRA em função dos níveis de salinidade mostrou um comportamento similar ao da matéria fresca, ou seja, em combinação dupla de estresse as plantas apresentaram redução da turgescência das folhas de forma linear em função da elevação dos níveis de salinidade, enquanto que na combinação tripla do estresse é observado um comportamento em forma de parábola (Figura 2).

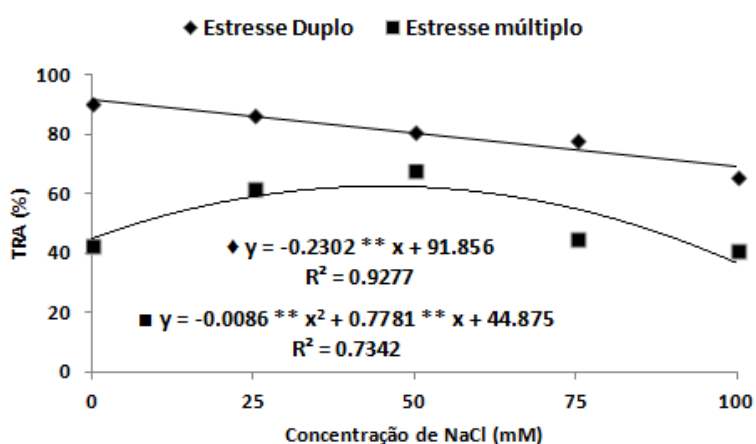


Figura 2 – Teor relativo de água da variedade de cana de açúcar RB 92 579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (37 °C durante o dia e 27°C durante a noite).

Os parâmetros, matéria fresca e TRA apresentaram uma correlação positiva ($r = 0,83 **$) para condição do estresse duplo, por temperatura e salinidade, bem como ($r = 0,94 **$) para a condição do estresse tripla, evidenciando o elevado grau de correlação entre a disponibilidade de água na planta e o crescimento.

Para a condição do estresse duplo o valor do TRA não foi inferior a 75% quando as plantas foram submetidas até 75 mM NaCl o que indica que a variedade de cana-de-açúcar apresenta uma perda moderada de água.

Sob a combinação tripla de estresses, as plantas que vinham sendo irrigadas com as soluções nos níveis de salinidade 25 e 50 mM, quando passam a sofrer um déficit hídrico tendem a manter níveis de turgescência maiores, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Martínez et al. (2004) afirma que o aumento nos valores do

teor relativo de água induzido pelo NaCl são indicativos de um efetivo ajustamento osmótico em plantas com estresse.

Para as enzimas do sistema antioxidante (Tabela 4) foi observada diferença significativa ($p < .01$) para interação dos fatores na enzima superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX), tendo a catalase (CAT) diferido apenas entre os fatores isoladamente.

As enzimas do sistema antioxidativo são amplamente distribuídas pela célula e atuam de forma coordenada para conferir proteção oxidativa (MØLLER et al., 2007). O balanço entre as atividades das enzimas SOD, APX e CAT, determina o teor dos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio nas células.

Neste estudo foi constatada uma maior atividade desta enzima nas plantas submetidas ao estresse múltiplo do que as submetidas ao estresse duplo. Houve diferença significativa na atividade desta enzima entre as duas simulações do estresse (Tabela 4) em todos os níveis de salinidade, exceto para o nível com 100 mM de NaCl.

Tabela 4 – Atividade enzimática das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase do ascorbato na variedade de cana de açúcar RB 92579, submetida a cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (37 °C durante o dia e 27 °C durante a noite)

Regime de rega		Níveis de NaCl (mM)				
		0	25	50	75	100
Superoxido dismutase (U / g MF / min)						
Grupo A	Contínuo	5,39 b	5,43 b	5,00 b	10,37 b	17,39 a
Grupo B	Suspensão	26,03 a	26,83 a	25,42 a	19,97 a	15,68 a
Ascorbato peroxidase (umol AsA / g MF / min)						
Grupo A	Contínuo	31,71 a	48,28 a	51,14 a	49,42 b	61,42 a
Grupo B	Suspensão	26,85 a	48,57 a	52,00 a	83,42 a	51,14 b
Catalase (umol H ₂ O ₂ / g MF / min)						
Grupo A	Contínuo	9,20 b	10,40 b	9,60 b	11,20 b	10,20 b
Grupo B	Suspensão	11,40 a	13,00 a	13,20 a	15,20 a	14,60 a

As médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si. Foi aplicado o Teste F ao nível de 5% de probabilidade.

O aumento na atividade da SOD, associado ao déficit hídrico, já foi reportado em culturas como o arroz (REDDY et al., 2004), milho (JIANG; ZHANG, 2002), e o trigo (SHAO et al., 2005).

O alto grau de severidade da combinação entre a alta temperatura, salinidade e déficit hídrico certamente proporcionou uma maior geração do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), contribuindo desta maneira para o incremento da atividade da SOD.

A superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira linha de defesa contra as ROS, agindo contra o radical superóxido, transformando-o em H_2O_2 e água. A SOD é uma metaloenzima possível de ser classificada de acordo com seu cofator metálico (Mn, Fe, ou Cu-Zn), é encontrada em quase todos os compartimentos celulares, participando no ciclo água-água nos cloroplastos, bem como do ciclo ascorbato-glutationa nos cloroplastos, citosol, mitocôndrias, apoplastos e peroxissomos.

Alterações na atividade da SOD têm sido verificadas em diversas culturas sob diferentes condições de estresse, BOR et al., 2003 associa a resposta da SOD em beterraba a diferentes estresses salino, YU et al, 1998 a nutrição em tabaco e CATANEO et al., 2005 a aplicação de herbicida em soja.

Analisando a atividade enzimática da SOD em função do incremento da salinidade (Figura 3), observa-se um comportamento distinto entre o estresse duplo e triplo.

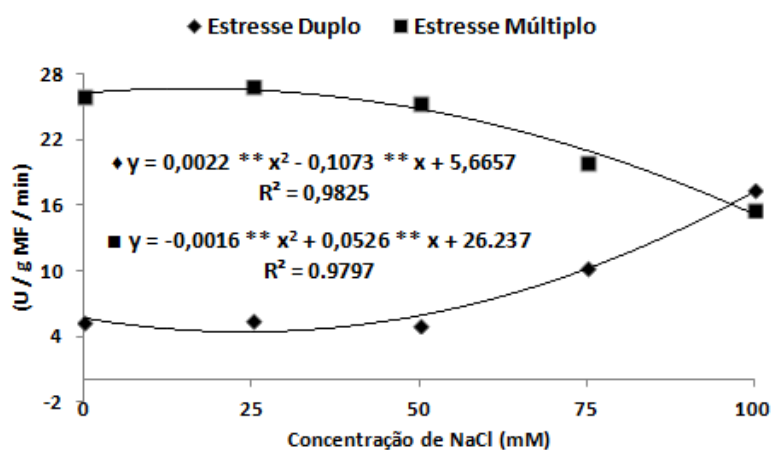


Figura 3 – Atividade enzimática da SOD na variedade de cana de açúcar RB 92 579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de rega. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (37 °C durante o dia e 27 °C durante a noite).

Para a combinação dupla do estresse, verifica-se um aumento na atividade desta enzima acompanhando os crescentes níveis de salinidade. Comparando as plantas que não receberam NaCl com as plantas submetidas ao nível de 100mM de NaCl, é possível

observar um incremento na atividade da SOD tres vezes maior. Este comportamento evidencia a resposta da planta para minimizar o acúmulo do radical superóxido, gerado em maior quantidade nos maiores níveis de sal. Alguns autores relatam que este incremento na atividade da SOD induzido pela salinidade pode estar relacionado a uma tolerância em situação de estresse. (Demiral & Turkan, 2005; Koca et al.,2006).

Em condição de estresse múltiplo a atividade enzimática da SOD decai nos maiores níveis de salinidade, 75 e 100 mM de NaCl, indicando uma tendência ao colapso da atividade desta enzima em função da severidade destes tratamentos. Sob estresses combinado ate o nível de 50 mM de NaCl a SOD mantém-se atuante na dismutação do radical superoxido.

As enzimas APX e CAT são responsáveis pela eliminação do peróxido de hidrogênio, mesmo atuando sobre o mesmo substrato elas apresentam diferenças de afinidade. A APX pode ser encontrada em quase todas as organelas celulares, enquanto que a CAT encontra-se nos peroxissomos e citoplasma.

Sob estresse salino e de elevada temperatura a atividade da APX aumenta em função dos níveis de sal, atingindo um incremento de 50% quando comparados o tratamento com ausência de sal ao tratamento com maior nível de salinidade, 100 mM de NaCl.

Foi verificada uma correlação positiva de ($r = 0,93^{**}$) entre a APX e os teores de peróxido para o estresse duplo, sugerindo que a elevação observada nos teores de peróxido é acompanhada pela maior atividade desta enzima favorecendo o equilíbrio redox. A enzima APX é responsável pela redução do H_2O_2 à água, e utiliza o ascorbato como doador de elétrons para eliminar o peróxido de hidrogênio no ciclo do ascorbato-glutationa (Shigeoka et al., 2002).

No estresse múltiplo a atividade da enzima APX foi sempre maior nas plantas submetidas à salinidade, evidenciando uma vez mais que a salinidade atuou como um fator de condicionamento osmótico para as plantas, promovendo atividades pré-metabolicas, que permitiu às plantas suportarem melhor o déficit hídrico imposto em seguida (Figura 4).

Foi observado um pico na atividade enzimática da APX no nível com 75 mM de NaCl, porem a atividade decresce no nível mais severo de estresse 100 mM de NaCl. Apenas nestes níveis foi contatada diferença significativa entre as duas simulações de estresse.

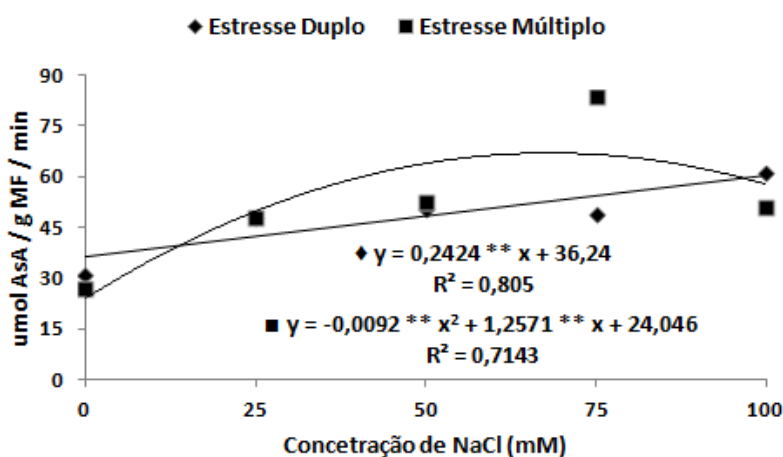


Figura 4 – Atividade enzimática da APX na variedade de cana de açúcar RB 92 579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de rega. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (37 °C durante o dia e 27°C durante a noite).

A catalase (CAT) apresentou valores de atividade superiores sempre para a condição do estresse múltiplo, diferindo significativamente entre os regimes de rega em todos os níveis de salinidade (Tabela 3).

Não houve significância no comportamento da CAT para o estresse duplo, os crescentes níveis de salinidade não alteram a atividade desta enzima. Para o estresse múltiplo os maiores valores de catalase foram verificados nos níveis 75 e 100 mM de NaCl diferido estes significativamente dos demais.

Foi observada uma correlação positiva entre a CAT e o H₂O₂ ($r = 0,78^{**}$). A CAT tem uma baixa afinidade pelo peróxido de hidrogênio requerendo a ligação de duas moléculas dessa ROS para que a reação ocorra, em função desta particularidade a CAT é provavelmente responsável pela remoção do excesso do H₂O₂ durante o estresse (GRATÃO et al., 2005), além de proteger a SOD da inativação por altos níveis de desta espécie reativa (FRIDOVICH, 1995).

Para os teores de H₂O₂, e MDA foram observadas diferenças significativas ($p < .01$) para a interação dos fatores (TABELA 5).

Tabela 5 – Produção de MDA e H₂O₂ na variedade de cana de açúcar RB 92579, submetida a cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (37 °C durante o dia e 27 °C durante a noite).

Regime de rega		Níveis de NaCl (mM)				
		0	25	50	75	100
MDA (UNIDADE)						
Grupo A	Contínuo	2,98 b	3,79 b	4,45 a	4,19 b	4,54 b
Grupo B	Suspensão	6,10 a	5,16 a	4,32 a	8,16 a	9,05 a
H ₂ O ₂ (UNIDADE)						
Grupo A	Contínuo	3,12 b	3,31 b	4,52 b	5,25 b	6,18 a
Grupo B	Suspensão	5,06 a	6,92 a	7,05 a	5,91 a	5,14 b

As médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si. Foi aplicado o Teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Os teores de H₂O₂, espécie formada diretamente pela ação da SOD, apresentaram comportamento similar à ação desta enzima. A elevação na concentração de H₂O₂ observado no estresse duplo sugere exatamente um possível papel sinalizador desta ROS na ativação das enzimas e no fechamento estomático, uma vez que não foi detectada para esta mesma condição de estresse grande alteração no conteúdo de MDA.

Para o estresse duplo é possível verificar uma elevação na concentração do H₂O₂ de aproximadamente 50% quando comparados o tratamento com ausência de salinidade com o nível de 100 mM de NaCl.

No estresse múltiplo a concentração de peróxido decresceu nos níveis mais elevados de salinidade (Figura 5). Este decréscimo pode estar relacionado ao comportamento semelhante da enzima superóxido dismutase, que para os níveis de 75 e 100 mM de NaCl tiveram uma baixa na sua atividade consequentemente gerando menos H₂O₂. Ou ainda, esta diminuição pode ser consequência da elevação da atividade da CAT observada para estes mesmos níveis removendo o excesso de peróxido formado.

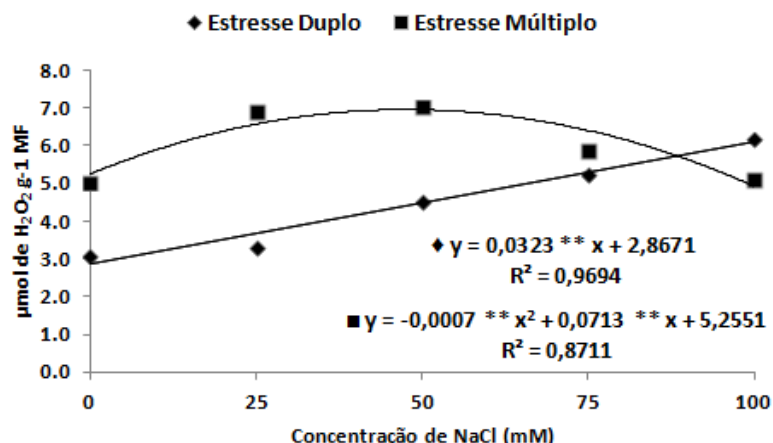


Figura 5 – Teor de Peróxido de hidrogênio na variedade de cana de açúcar RB 92 579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (37 °C durante o dia e 27°C durante a noite).

O H₂O₂ pode atuar como uma molécula sinalizadora gerada continuamente no metabolismo normal da planta ou mediante os estresses bióticos e abióticos, iniciando uma resposta de sinalização incluindo ativação de genes que codificam enzimas antioxidantes (NEILL et al., 2002).

O peróxido de hidrogênio, H₂O₂ é uma molécula moderadamente reativa, e de relativa vida longa, podendo difundir-se a partir de seu local de produção. A toxicidade do H₂O₂ é reforçada pela presença de catalisadores metálicos (Fe²⁺) pela reação de Fenton (VRANOVÁ & BREUSEGEM, 2002) formando o radical hidroxila OH[•].

Este radical reagindo com ácidos graxos, pode ser considerado como o fator primário para o processo de peroxidação lipídica, sendo indicada pelo aumento no conteúdo de MDA (DEWIR et al., 2006).

Os teores de MDA foram superiores para o estresse múltiplo. Com exceção do nível 50 mM de NaCl, todos os outros níveis diferiram significativamente entre si para as duas simulações de estresse.

Para o estresse duplo foi constatada uma correlação negativa ($r = -0,96$ **) entre o teor reativo de água e MDA, sugerindo que o incremento na peroxidação lipídica observados nos maiores níveis de salinidade, esteja relacionada com o conteúdo de água nas folhas. À medida que diminui o TRA, elevam-se os valores do acúmulo de MDA.

No estresse múltiplo a correlação entre estas duas variáveis, TRA e MDA, foi positiva ($r = 0,96$), indicando mais uma vez que a peroxidação lipídica observada neste estudo esta ligada aos teores de água. Nesta condição de estresse foi observado um

menor conteúdo de MDA para o nível com 50 mM de NaCl, tendo este mesmo tratamento o maior valor de TRA.

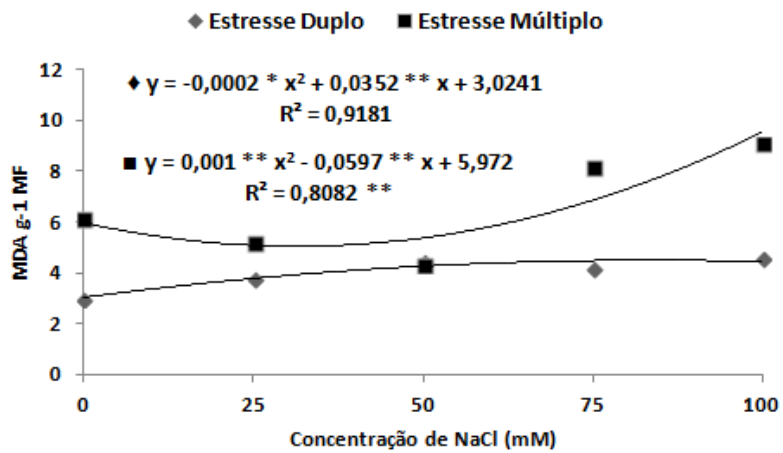


Figura 6 – Teor de MDA na variedade de cana de açúcar RB 92 579 em função de cinco níveis de salinidade e duas condições de regas. As plantas foram mantidas sob estresse térmico (37 °C durante o dia e 27°C durante a noite).

Conclusão

- O estresse duplo ocasionou uma redução das variáveis MF e TRA, a associação da elevada temperatura com a salinidade contribuiu para ativação do sistema antioxidante da variedade RB 92579; O H_2O_2 atuou como um sinalizador do estresse foi observado um incremento na atividade das enzimas superóxido dismutase e ascorbato peroxidase. Nesta mesma condição a CAT não sofreu alteração.
- No estresse múltiplo a salinidade proporcionou um condicionamento osmótico para as plantas, até o nível com 50 mM de NaCl as plantas mantiveram altos valores para MF e TRA quando da imposição do déficit hídrico. As enzimas APX e CAT tiveram um incremento para os crescentes níveis de salinidade enquanto a SOD decresceu.
- Os valores de H_2O_2 decresceram nas plantas sob estresse múltiplo. A exposição prévia a um nível de até 50 mM de NaCl, favoreceu a resposta da planta ao déficit hídrico como observado pela manutenção do TRA e da MF e por uma menor peroxidação lipídica.

Literatura citada

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

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 & Environment*, v. 24, p. 1337-344, 2001.

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. *Plant Physiology*. v. 104, p. 280-292, 1998.

BOR, M., ÖZDEMİR, F., TURKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science*, v.164, p.77-84, 2003.

CAIRO, P.A.R. Curso básico de relações hídricas de plantas. UESB, Vitória da conquista, p. 32, 1995.

CATANEO, A.C. CHAMMA K. L., FERREIRA L. C., DÉSTRO G. F. Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max* L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. *Revista Brasileira de Herbicidas*, v.4, p.23-31, 2005.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2012 – Brasília : Conab 2012.

DEMIRAL, T.; TURKAN, I. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense system and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, v.53, p.247-257, 2005.

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*, Oxford, v. 58, p. 93-99, 2006.

EL-SHABRAWI, H.; KUMAR, B.; KAUL, T.; REDDY, M. K.; SILNGLA-PAREEK, S. L.; SOPORY, S. K. Redox homeostasis, antioxidant defense, and methylglyoxal detoxification as markers for salt tolerance in Pokkali rice. *Protoplasma*, v. 245, p. 85-96, 2010.

FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v.55, p.307-319, 2004.

FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, v.49, p.835-842, 2010.

FOYER, C. H., NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* v. 28, p.1056-1071, 2005.

GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiol* v. 59, p. 309-314, 1977.

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.

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

HEATH, R.L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 125, p. 189-198, 1968.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, p. 347, 1950.

KOCA, H.; OZDEMIR, F.; TURKAN, I. Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*. *Biologia Plantarum*, v.50, p.745-748, 2006.

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

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

MARTÍNEZ, J.P., LUTTS, S., SCHANCK, A., BAJJI, M., KINET, J.M. Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L. *Journal of Plant Physiology*, v.161, p.1041 -1051, 2004.

MILLER, G., SUZUKI, H., 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.

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

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

MØLLER, I. M. JÉNSEN, P. E. HANSSON, A. Oxidative Modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v.58, p.459-81, 2007.

MUNNS, R., HUSAIN, S., RIVELLI, A. R., JAMES, A., CONDON A.G. MEGAN P. EVANS S., P. SCHACHTMAN, P., RAY A. Hare Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant and Soil*, v. 247, p. 93-105, 2002.

MUNNS, R., TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, v.59, p.651-681, 2008.

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

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

NGUYEN, G. N. HAILSTONES, D. L. WILKES, M. SUTTON, B. G. Drought-induced oxidative conditions in rice anthers leading to a programmed cell death and pollen abortion. *Journal of Agronomy & Crop Science*, v.195, p.157-164, 2009.

NOCTOR, G. FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, v.49, p.249-279, 1998.

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

SEAGRI. Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária da Bahia. <<http://www.seagri.ba.gov.br/programas.asp?qact=viewprogram&prgid=49>>. Bahia 2007. 18 de abril de 2012.

SHAO, H.B. LIANG, Z.S. SHAO, M.A. WANG, B.C. Changes of antioxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficits among 10 wheat genotypes a seedling. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Amsterdam, v. 42, p. 107-113, 2005.

SHIGEOKA, S., ISHIKAWA, T., TAMOI, M., MIYAGAWA, Y., TAKEDA, T., YABUTA, Y., YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 53, p.1305-1319, May 2002.

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

YU, Q., OSBORNE, L. RENGEL, Z. Micronutrient deficiency changes activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco plants. *Journal of Plant Nutrition*, v.21, p.1427-1437, 1998.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; CAMP, W.V. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *The EMBO Journal*, v.16, n.16, p.4806–4816, 1997.