

## Osmoprotetores em cana-de-açúcar sob efeito da disponibilidade hídrica no solo

### Effects of osmoprotectors on sugar cane plants growing under different water deficit levels

Rafaela Josemara Barbosa QUEIROZ<sup>\*1</sup>, Durvalina Maria Mathias dos SANTOS<sup>\*2</sup>, Samira Domingues CARLIN<sup>1</sup>, Adão MARIN<sup>1</sup>, David Ariovaldo BANZATTO<sup>2</sup>, Jairo Osvaldo CAZETTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudantes do Curso de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal) da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp/FCAV).

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp/FCAV), Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, Km 5, CEP 14884-900, Jaboticabal - SP.

Autores para correspondência: rafaela@fcav.unesp.br; dumaria@fcav.unesp.br

#### Resumo

Este trabalho teve como objetivos quantificar os teores dos osmoprotetores, trealose e prolina livre, em cultivares de cana-de-açúcar (cv. IAC91-2195 e cv. IAC91-5155) submetidas a diferentes níveis de disponibilidade hídrica no solo e verificar se podem ser usados como marcadores bioquímico-fisiológicos para diferenciar estas cultivares quanto à tolerância à deficiência hídrica. O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada ( $29,7 \pm 43$  °C e  $75,0 \pm 10,1\%$  UR) durante 60 dias, no delineamento experimental em blocos ao acaso, com quatro repetições, em esquema fatorial 2x3x2 (cultivares x disponibilidade hídrica x períodos de crescimento). As gemas foram cultivadas sem qualquer restrição hídrica em um Latossolo Vermelho, textura média, até 40 dias após o plantio, quando foram transplantadas para vasos ( $12 \text{ dm}^3$ ) contendo o mesmo solo e submetidas a três níveis de disponibilidade hídrica do solo: 55% (sem estresse), 40% (estresse moderado) e 25% (estresse severo), mantidos pelo método das pesagens, durante 60 dias. A diminuição da DHS resultou em um incremento do teor da prolina livre e da trealose nas folhas da cv. IAC91-5155. Estes resultados confirmam a tolerância relativa à seca da cv. IAC91-5155. A trealose e a prolina livre podem ser usadas como marcadores bioquímico-fisiológicos de tolerância ao estresse hídrico para a cv. IAC91-2195 e a cv. IAC91-5155.

**Palavras-chave adicionais:** ajustamento osmótico; trealose; prolina; seca; *Saccharum* spp.

#### Abstract

The objectives of this work were to quantify trehalose and free proline levels in plants of sugar cane cultivars 'IAC91-2195' and 'IAC91-5155' after being submitted to different levels of water deficit as well as to verify whether those compounds can be used as physiological/biochemical markers of plant tolerance to drought. The experiment was carried out in a greenhouse under conditions of  $29.7 \pm 4.3$  °C and  $75.0 \pm 10.1\%$  of R.H. during 60 days. Sugar cane buds, under no water deficit, were grown in a Red Latosol to obtain 40 day old plants which were then transplanted to  $12 \text{ dm}^3$  vases filled with the same soil in which three levels of water availability were used : 55% ( no stress), 40% ( moderate stress), and 25% (severe stress) of the soil water holding capacity. Reducing soil water availability increased the leaf contents of free proline and trehalose in the 'IAC91-5155' cultivar what is thought to confirm the drought tolerance of this cultivar. Both compounds can be used to assess drought tolerance of sugar cane cultivars 'IAC91-5155' and 'IAC91-2195'.

**Additional keywords:** osmotic adjustment; trehalose; proline; drought; *Saccharum* spp.

#### Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é um dos principais e mais antigos cultivos agrícolas do Brasil. O setor sucroalcooleiro gera para o País, em produto final, cerca de dez bilhões de dólares por ano, um milhão de empregos diretos, além de ser pioneiro ao associar suas atividades a projetos para redução de emissão de gases de efeito estufa (RODRIGUES, 2004). É uma das melhores opções de energia renovável, apre-

sentando grande importância no cenário agrícola brasileiro e mundial (MAULE et al., 2001).

Como qualquer outro cultivo agrícola, a cana-de-açúcar tem sua produção diretamente influenciada pelos estresses ambientais. O aumento do aquecimento global tem ocasionado a ampliação dos períodos de seca, influenciando de forma direta na disponibilidade de água do solo em canaviais, reduzindo, significativamente, os rendimentos destas áreas (MAULE et al.,

2001). A cana-de-açúcar é cultivada em diferentes classes de solo e sob influência de diversos fatores abióticos peculiares a cada região, resultando, com isso, distintos ecossistemas de produção.

A cana-de-açúcar vem ampliando suas fronteiras agrícolas por meio do uso de cultivares mais adaptadas aos nichos de produção, desenvolvida por centros de pesquisas e estações experimentais (LANDELL et al., 2004). No entanto, as seleções dessas cultivares geralmente são realizadas através de técnicas do melhoramento genético clássico, baseadas em observações de campo.

A demanda por cultivares mais tolerantes a períodos mais severos de seca tem despertado na comunidade científica relevante interesse na investigação dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos utilizados pelas plantas em resposta ao estresse hídrico (BARTELS & SUNKAR, 2005). A habilidade de algumas espécies em ajustar osmoticamente suas células sob condições de estresse hídrico é uma resposta bioquímico-fisiológica que indica a capacidade destas plantas em tolerar períodos curtos de seca, proporcionando à planta a continuar a expansão celular, favorecendo o crescimento vegetal (BARTELS & SUNKAR, 2005). Estes compostos atuam como osmoprotetores e, em alguns casos, como estabilizadores celulares, entre os quais se destacam a trealose e a prolina livre (NEPOMUCENO et al., 2001).

A trealose é um dissacarídeo não redutor ( $\alpha$ -D-glicose-[1,1]- $\alpha$ -D-glicose), quimicamente estável que, sob condições de estresse hídrico, interage com os grupos polares das cadeias fosfolipídicas existentes na membrana, substituindo a água que foi removida, mantendo estruturas hidrofílicas da membrana plasmática e, conseqüentemente, a estabilidade celular (PATIST & ZOERB, 2005; ALMEIDA et al., 2007).

Por sua vez, a prolina livre é um  $\alpha$  - iminoácido, pois seu grupo amino está ligado a dois átomos de carbono, formando um anel imina, o qual confere características de neutralidade à molécula. Sua principal característica como osmoprotetor deve-se à redução do potencial osmótico da célula, mantendo equilíbrio hídrico entre o vacúolo e o citoplasma (BRAY et al., 2001). Também lhe é atribuída a função de depósito de energia e reserva de carbono e nitrogênio, utilizado no restabelecimento da planta após o estresse (KAVI KISHOR et al., 2005).

O aumento dos teores de trealose e prolina livre em tecidos foliares e/ou radiculares é reportado como um mecanismo de osmoproteção de plantas à seca (GARG et al., 2002a; EI-BASHITI et al., 2005; HONGBO et al., 2006; BIDOIA et al., 2006). Devido à carência de pesquisas relacionada à osmoproteção em cana-de-açúcar sob estresse hídrico, este trabalho teve como objetivos quantificar os teores dos

osmoprotetores, trealose e prolina livre, em cultivares de cana-de-açúcar (cv. IAC91-2195 e cv. IAC91-5155) submetidas a diferentes níveis de disponibilidade hídrica no solo e verificar se podem ser usados como marcadores bioquímico-fisiológicos para diferenciar estas cultivares quanto à tolerância à deficiência hídrica.

## Material e métodos

Para avaliar o acúmulo de osmoprotetores, utilizaram-se duas cultivares de cana-de-açúcar, IAC91-2195 (C<sub>1</sub>) e IAC91-5155 (C<sub>2</sub>), sob efeito da disponibilidade hídrica no solo. Foi desenvolvido um experimento em casa de vegetação com temperatura de  $29,7 \pm 4,3$  °C e umidade relativa do ar de  $75,0 \pm 10,1$  % do Departamento de Produção Vegetal da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Unesp/FCAV), município de Jaboticabal - SP., durante 60 dias, no período de 04 de outubro de 2005 a 02 de dezembro de 2005.

Os toletes de cana-de-açúcar, contendo uma gema, com idade de nove meses, provenientes de canavial de 3<sup>o</sup> corte da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento - APTA Regional Centro-Oeste, Jaú - SP, foram coletados em 24 de agosto de 2005. Após 24 horas da realização da coleta, foram plantados em mesmo solo coletado para o experimento. As plantas foram cultivadas em terra peneirada (peneira n<sup>o</sup>16), oriunda de solo do Câmpus da Unesp/FCAV, classificado como Latossolo Vermelho-Escuro distrófico (ANDRIOLI & CENTTURION, 1999). O solo foi coletado na profundidade de 0 a 20 cm e submetido à análise química e granulométrica: pH CaCl<sub>2</sub> = 4,9; M.O = 13 mg dm<sup>-3</sup>; P res. = 5 mg dm<sup>-3</sup>; K = 2,6; Ca = 20 e Mg = 10; H+Al = 31; Al = 1; SB = 32,6; T = 63,6 (mmol cm<sup>-3</sup>); V% = 51; Areia = 65%; Silte = 5% e Argila = 30%; classe textural média (RAIJ et al., 1983) e densidade real de partícula de 2,73 g cm<sup>-3</sup> (EMBRAPA, 1997).

As mudas foram mantidas durante 40 dias sem restrição hídrica até serem transferidas para vasos de 12 dm<sup>3</sup>. Após o transplante, foram cultivadas em três níveis de disponibilidade hídrica do solo (DHS), 55% (DHS<sub>1</sub> = sem estresse), 40% (DHS<sub>2</sub> = estresse moderado) e 25% (DHS<sub>3</sub> = estresse severo) de poros preenchidos com água, durante 60 dias, sendo este período subdividido em dois, que foram os períodos iniciais de crescimento, constituindo-se das idades de 70 dias (P<sub>1</sub>) e 100 dias (P<sub>2</sub>), incluídas no primeiro estágio da cana-planta (180 dias) (ROSENFELD e LEME, 1984).

Os valores para DHS e os cálculos para densidade de partícula do solo ( $1,44 \pm 0,38$  g cm<sup>-3</sup>) e porosidade total do solo foram obtidos de acordo com KLAR et al. (1966) e EMBRAPA (1997), respectivamente. A porosidade

total do solo em volume de 12 dm<sup>3</sup> foi de 47,25% (volume de 5,7 dm<sup>3</sup> que corresponde a 100 % dos poros preenchidos). Os níveis de DHS consistiram em preencher com água 55%, 40% e 25% dos poros totais, representando um volume de 3,1 dm<sup>3</sup>; 2,2 dm<sup>3</sup> e 1,4 dm<sup>3</sup>; respectivamente.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com quatro repetições, em esquema fatorial 2x3x2: duas cultivares, uma sensível (C<sub>1</sub>) e outra tolerante à seca (C<sub>2</sub>); três níveis de estresse hídrico (sem estresse = DHS<sub>1</sub>, moderado = DHS<sub>2</sub> e severo = DHS<sub>3</sub>) e dois períodos de estresse, 30 (P<sub>1</sub>) e 60 (P<sub>2</sub>) dias. Cada parcela experimental foi constituída de um vaso com uma planta em fase vegetativa (perfilhamento).

O controle da DHS foi realizado pelo método das pesagens a partir do monitoramento diário da massa dos vasos (KLAR et al., 1966), realizando-se, nessas ocasiões, a complementação da água, de modo a manter a umidade concernente a cada tratamento. Assim, em cada rega, a correção da umidade do solo foi feita por meio da diferença entre a massa atual do sistema (plantas+vaso+solo) e a massa prefixada para cada tratamento. Assumiu-se que a água apresenta a relação peso/volume de 1/1.

Após 30 e 60 dias do início dos tratamentos, foi coletada a folha +1, primeira folha com "dewlap" ou aurícula visível (DILLEWIJN, 1952), de cada parcela experimental. Durante a coleta, as folhas foram armazenadas em nitrogênio líquido até transferência para ultra freezer a -80 °C.

A trealose foi quantificada segundo método enzimático descrito por NEVES et al. (1994) com modificações. Foi determinado o teor de trealose acumulado em 1 g de tecido foliar fresco. A reação de hidrólise foi incubada em banho-maria durante 1 h a 60 °C. Cada mol de glicose representou 0,5 mol de trealose.

As quantificações de prolina livre foram realizadas em 0,5 g de massa fresca da lâmina foliar, segundo BATES et al. (1973). O teor de prolina foi calculado pela fórmula:  $[(\mu\text{g prolina livre/mL} \times \text{mL tolueno})/115,5 \mu\text{g}/\mu\text{mole}] / [(g amostra)/5] = \mu\text{moles de prolina livre/g massa fresca}$ .

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e aos desdobramentos dos graus de liberdade para a comparação entre médias (teste de Tukey) dos fatores qualitativos, cultivar (C) e período (P). O estudo da regressão polinomial foi utilizado para o desdobramento dos graus de liberdade do fator quantitativo disponibilidade hídrica no solo, DHS (BANZATTO & KRONKA, 2006).

## Resultados e discussão

Através dos resultados apresentados na Tabela 1, observou-se que, para cultivar (C) e

disponibilidade hídrica do solo (DHS), houve efeito significativo (P<0,01) apenas no acúmulo de prolina. Para períodos (P), houve efeito significativo no acúmulo da trealose e da prolina livre (P <0,05 e P<0,01, respectivamente). A cv. IAC91-5155 (C<sub>2</sub>) acumulou maiores teores de prolina livre (0,3460 μmoles g<sup>-1</sup> MF) quando comparado ao da cv. IAC91-2195 (C<sub>1</sub>) (0,3345 μmoles g<sup>-1</sup> MF), conforme Tabela 1. O acúmulo de trealose (P<0,05) foi maior aos 60 dias (1,1894 mg g<sup>-1</sup> MF) que aos 30 dias (0,9310 mg g<sup>-1</sup>), porém, para a quantidade de prolina livre, verificou-se que o acúmulo foi superior aos 30 dias (0,3464 μmoles g<sup>-1</sup> MF) quando comparado ao outro período (0,3341 μmoles g<sup>-1</sup> MF). No estudo das interações dos fatores, observou-se efeito significativo (P<0,05) de C em DHS para os teores de trealose (Cx<sub>DHS</sub>), fato não evidenciado para o acúmulo de prolina livre (P>0,05). Entretanto, a interação dos três fatores, CxDHSxE, foi significativa para os teores de prolina livre (P<0,05).

A cultivar IAC91-2195 (C<sub>1</sub>) não apresentou componente polinomial significativo (P>0,05), porém a cv. IAC91-5155 (C<sub>2</sub>) demonstrou uma regressão linear significativa (P<0,05), sendo o componente de segundo grau desprezível (P>0,05), conforme Tabela 2. A função linear, expressa pela equação  $y = 1,88053 - 0,01761x$  (R<sup>2</sup> = 0,97), revelou uma correlação negativa (r = -0,98), evidenciando que o acúmulo da trealose foi reduzido com aumento dos níveis de água no solo (Figura 1). A maior quantidade detectada (1,4172 mg g<sup>-1</sup>) foi de 25% de DHS (P<0,05).

O efeito da DHS no incremento do teor da trealose nas folhas da cultivar C<sub>2</sub> (Tabela 2) e o maior acúmulo do dissacarídeo, aos 60 dias (Tabela 1), devem estar relacionados ao fato de que plantas submetidas a diferentes níveis e períodos de deficiência hídrica no solo aumentam a quantidade de trealose nos tecidos vegetais, quanto menor for a umidade do solo e maior o tempo de duração do estresse (EI-BASHITI et al., 2005). Desse modo, o grau de tolerância à seca de diferentes cultivares pode ser aferido através da quantidade de trealose acumulada em tecidos, em períodos curtos de estresse (GARG et al., 2002b; EI-BASHITI et al., 2005). As diferenças quanto ao acúmulo de trealose entre as cultivares assemelham-se aos estudos realizados em outras gramíneas, sendo os maiores teores detectados em genótipos tolerantes (GARG et al., 2002a; GARG et al., 2002b; EI-BASHITI et al., 2005). Estes resultados são inferiores aos encontrados no presente trabalho, no entanto deve-se levar em consideração que o acúmulo de trealose é distinto entre cultivares, espécies, órgão/tecido e estágio vegetativo avaliado.

**Tabela 1** - Análise de variância e teste de Tukey do acúmulo da trealose e da prolina livre na folha +1 de cana-de-açúcar (cv. IAC91-2195 e cv. IAC91-5155) sob efeito da disponibilidade hídrica no solo: 55% (sem estresse), 40% (estresse moderado) e 25% (estresse severo), durante 60 dias. Jaboticabal (SP), 2005.

Table 1 - Analysis of variance of data referring to trehalose and free proline levels in the leaf +1 of sugar cane cultivars 'IAC91-2195' and 'IAC91-5155' as results of water deficits of 55% (no stress), 40% (moderate stress), and 25% (severe stress) imposed during 60 days to the plants.

Causas da Variação	G.L.	Quadrados Médios	
		Osmoprotetores	
		Trealose (mg g <sup>-1</sup> massa fresca)	Prolina livre (μmoles g <sup>-1</sup> massa fresca)
Cultivares (C)	1	1,3432 <sup>ns</sup>	0,001586 <sup>**</sup>
Disponibilidade Hídrica no Solo (DHS)	2	0,0019 <sup>ns</sup>	0,000600 <sup>**</sup>
Períodos (P)	1	1,8095 <sup>*</sup>	0,0001814 <sup>**</sup>
Interação CxDHS	2	1,8095 <sup>*</sup>	0,000295 <sup>ns</sup>
Interação CxP	1	0,7537 <sup>ns</sup>	0,00033. 10 <sup>-3</sup> <sup>ns</sup>
Interação DHSxP	2	0,3769 <sup>ns</sup>	0,00022. 10 <sup>-3</sup> <sup>ns</sup>
Interação CxDHSxP	2	0,2796 <sup>ns</sup>	0,000417 <sup>*</sup>
Tratamentos	11	0,8244	0,00555
Blocos	3	0,6681 <sup>ns</sup>	0,00632 <sup>*</sup>
Resíduo	33	0,3456	0,000105
C.V. (%)		19,2280	3,0074
Médias e teste de Tukey <sup>1</sup>			
cv. IAC91-2195		0,9414 A	0,3345 B
cv. IAC91-5155		1,1780 A	0,3460 A
55% de Disponibilidade Hídrica do Solo		1,9834 A	0,3347 B
40% de Disponibilidade Hídrica do Solo		2,0816 A	0,3393 AB
25% de Disponibilidade Hídrica do Solo		2,2933 A	0,3468 A
30 dias		0,9310 B	0,3464 A
60 dias		1,1894 A	0,3341 B

<sup>ns</sup>não significativo (P > 0,05); <sup>\*</sup>significativo (P < 0,05); <sup>\*\*</sup>significativo (P < 0,01); <sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P > 0,05).

O incremento dos teores da trealose na cv. IAC91-5155 (Figura 1) deve-se a um aumento de carboidratos não estruturais (BARTELS e SUNKAR, 2005). Assim, considera-se que o incremento da trealose no tecido foliar da cv. IAC91-5155, em função da baixa umidade do solo, pode estar relacionado com modificações no metabolismo dos carboidratos. Esses polímeros, em grande parte compartimentalizados, reduzem o seu teor em função da demanda desses carboidratos na preservação da membrana plasmática, que estaria desestabilizada pela deficiência hídrica (ALMEIDA et al., 2007). Contudo, verifica-se que o acúmulo de trealose em plantas superiores vasculares, sob condições adversas, é diminuto, propondo que, na maioria das espécies, a sacarose seria mais atuante na preservação dessas estruturas do que a trealose (WINGLER, 2002). De fato, em vegetais superiores, as concentrações da sacarose são maiores em relação às da trealose devido à ação celular desta última ser realizada em baixas concentrações para prevenção de efeitos danosos do seu acúmulo na regulação do

metabolismo do carbono (WINGLER, 2002). Entretanto, muitos estudos demonstram que outros dissacarídeos, como a sacarose e a maltose, induzem, somente em parte, a estabilização celular quando comparadas com a trealose, e que a ação desse carboidrato na estabilização de membranas, em condição de deficiência hídrica, chega a ser três vezes mais eficiente que a sacarose, devido à alta afinidade da molécula às ligações do tipo ponte de hidrogênio (PATIST e ZOERB, 2005). Como o metabolismo da trealose foi somente descoberto há pouco tempo em plantas superiores, existem ainda poucas informações sobre sua função na fisiologia e no desenvolvimento dos vegetais (EIBASHITI et al., 2005).

Por sua vez, para o acúmulo de prolina livre nessas cultivares, o estudo do desdobramento dos graus de liberdade da interação CxDHSxE, em regressão polinomial (Tabela 2), demonstrou que o efeito de DHS foi significativo apenas na combinação C<sub>2</sub>E<sub>1</sub> (P<0,01), apresentando um componente linear altamente significativo (P<0,01), sendo o componente de segundo

grau desprezível ( $P > 0,05$ ), (Tabela 2). A regressão mais indicada foi dada pela função linear  $y = 0,39243 - 9,83333 \cdot 10^{-4}x$  ( $R^2 = 0,88$ ). Dessa forma, pôde-se observar que o acúmulo desse aminoácido na cv. IAC91-5155, aos 30 dias, e

níveis de água no solo (Figura 2) foram inversamente proporcionais ( $r = -0,94$ ), sendo a maior quantidade acumulada ( $0,3710 \mu\text{moles g}^{-1}$ ) em 25% de DHS ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 2** - Regressão polinomial nos desdobramentos das interações: CxDHS para acúmulo da trealose ( $\text{mg g}^{-1}$  massa fresca) e CxDHSxE no estudo do efeito de DHS na combinação CxE para acúmulo de prolina livre ( $\mu\text{moles g}^{-1}$  massa fresca), em folha +1 de duas cultivares de cana-de-açúcar, IAC91-2195 ( $C_1$ ) e IAC91-5155 ( $C_2$ ), sob efeito da disponibilidade hídrica no solo, durante 30 ( $E_1$ ) e 60 dias ( $E_2$ ). Jaboticabal (SP), 2005.

Table 2 - Polynomial regression for the C X DHS interaction on trehalose ( $\text{mg g}^{-1}$  of fresh weight) accumulation in the plants and the C X E interaction on free proline accumulation ( $\mu\text{moles g}^{-1}$  of fresh weight) in leaves +1 of two sugar cane cultivars under the effect of water availability during 30 ( $E_1$ ) and 60 ( $E_2$ ) days.

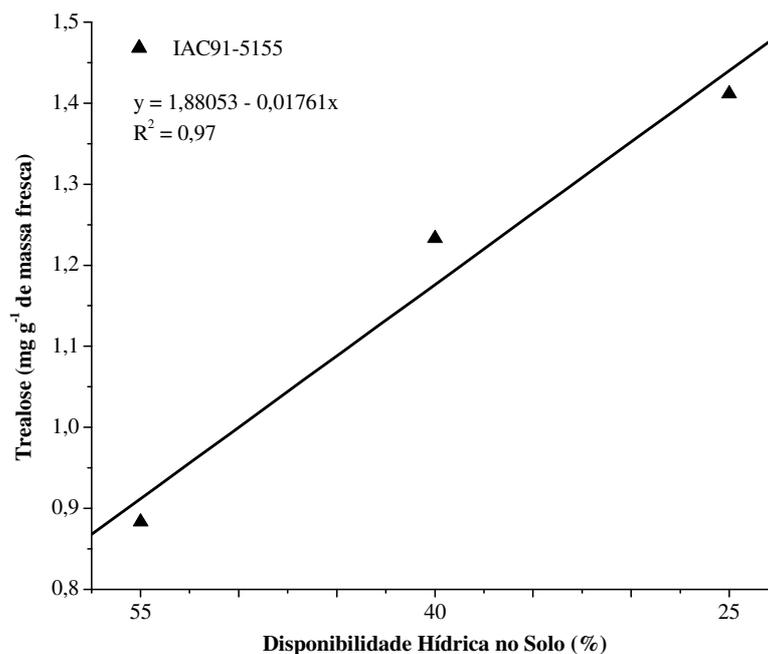
Desdobramento da interação Cultivar x Disponibilidade hídrica do solo (CxDHS)					
Causas da Variação	G.L.	Quadrados Médios			
		Trealose ( $\text{mg g}^{-1}$ massa fresca)			
		IAC91-2195	IAC91-5155		
R.L. para Disponibilidade Hídrica do Solo	1	0,8298 <sup>ns</sup>	2,2791 *		
R.Q. para Disponibilidade Hídrica do Solo	1	0,8792 <sup>ns</sup>	0,0733 <sup>ns</sup>		
Resíduo	33	0,3456	0,3456		
Desdobramento da Interação Cultivar x Disponibilidade Hídrica do Solo x Época (CxDHSxE)					
Causas da Variação	G.L.	Quadrados Médios			
		Prolina livre ( $\mu\text{moles g}^{-1}$ de massa fresca)			
		$C_1E_1$	$C_1E_2$	$C_2E_1$	$C_2E_2$
R.L. para Disponibilidade Hídrica do Solo	1	$0,002 \cdot 10^{-6}$ ns	$0,139 \cdot 10^{-3}$ ns	$1,176 \cdot 10^{-3}$ **	$0,260 \cdot 10^{-3}$ ns
R.Q. para Disponibilidade Hídrica do Solo	1	$0,1321 \cdot 10^{-3}$ ns	$0,128 \cdot 10^{-3}$ ns	$0,217 \cdot 10^{-3}$ ns	$0,026 \cdot 10^{-3}$ ns
Resíduo	33	$0,105 \cdot 10^{-3}$	$0,105 \cdot 10^{-3}$	$0,105 \cdot 10^{-3}$	$0,105 \cdot 10^{-3}$

<sup>ns</sup>não significativo ( $P > 0,05$ ); \*significativo ( $P < 0,05$ ); \*\*significativo ( $P < 0,01$ ); R.L.: regressão linear; R.Q.: regressão quadrática.

Apesar de ter sido detectado o efeito da DHS no acúmulo de prolina livre apenas na cv. IAC91-5155, aos 30 dias (Tabela 2), pode-se presumir que o acúmulo desse aminoácido seria um indicativo de tolerância para essa cultivar nas condições de estresse hídrico semelhante às deste trabalho, uma vez que, em outras gramíneas (FUMIS e PEDRAS, 2002; HONGBO et al., 2006) e em outras cultivares de cana-de-açúcar (RÍNCONES, 1997; BIDOIA et al., 2006), também foi observada correlação inversa entre os teores de prolina livre e as variações dos níveis de estresse hídrico, sendo a maior quantidade evidenciada em plantas submetidas a condições de maior severidade do estresse. Os teores acumulados nos genótipos das espécies estudadas por aqueles pesquisadores são superiores aos encontrados no presente trabalho, entretanto

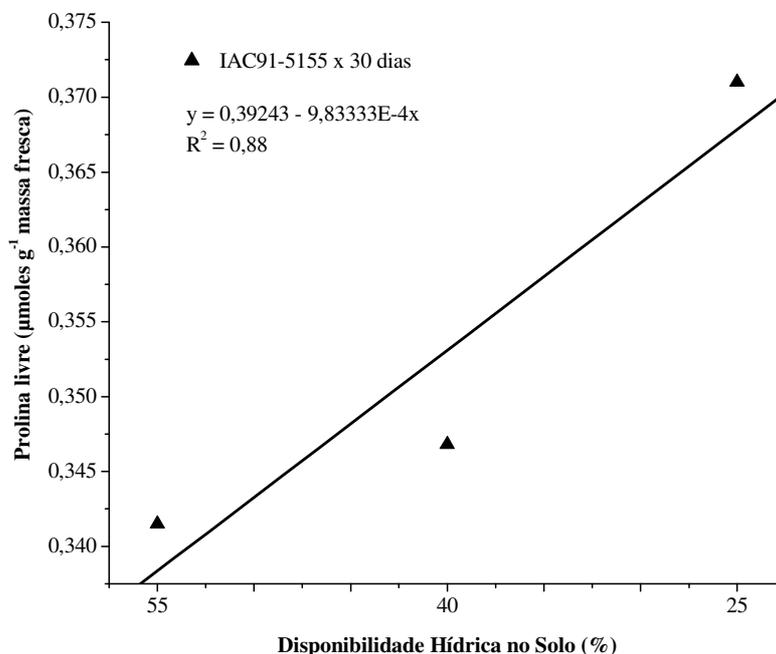
são condizentes com a faixa de acúmulo estipulada por BATES et al. (1973) para estudos do estresse hídrico em plantas, que é de 0,1 a  $36,0 \mu\text{moles g}^{-1}$  de prolina livre em tecido fresco foliar.

De acordo com os resultados apresentados (Figura 2), o aumento dos teores de prolina livre na cv. IAC91-5155 pode estar atrelado a um incremento da biossíntese desse aminoácido, relacionado com o potencial hídrico dos tecidos. Este seria um mecanismo de proteção contra a deficiência de água, uma vez que esse aminoácido promoveria a redução do potencial hídrico dos tecidos, retendo a água *in situ* e mantendo a integridade desses tecidos (BRAY et al., 2001; KAVI KISHOR et al., 2005).



**Figura 1** - Acúmulo de trealose (mg g<sup>-1</sup> de massa fresca) na folha +1 da cv. IAC91-5155 sob efeito de três níveis de disponibilidade hídrica no solo: 55% (sem estresse), 40% (estresse moderado) e 25% (estresse severo), durante 60 dias. Jaboticabal (SP), 2005.

Figure 1 - Trehalose level (mg g<sup>-1</sup>) in the leaf +1 of sugar cane cultivar IAC91-5155 plants grown under three levels of water availability videlicet 55% (no stress), 40% (moderate stress), and 25% (severe stress) during 60 days.



**Figura 2** - Acúmulo de prolina livre (µmoles g<sup>-1</sup> de massa fresca), aos 30 dias, na folha+1 da cv. IAC91-5155 sob efeito de três níveis de disponibilidade hídrica do solo: 55% (sem estresse), 40% (estresse moderado) e 25% (estresse severo), durante 30 dias. Jaboticabal (SP), 2005.

Figure 2 - Free proline levels at the 30<sup>th</sup> day in the leaf +1 of sugar cane plants of the 'IAC-5155' cultivar under the effect of three levels of water availability videlicet 55% (no stress), 40% (moderate stress), and 25% (severe stress).

Outro resultado observado no estudo do desdobramento de DHS em CxE (Tabela 2), foi o incremento nos teores de prolina livre evidenciado apenas na cultivar mais tolerante, aos 30 dias (DHSxC<sub>2</sub>E<sub>1</sub>). Fato também comprovado no estudo do fator isolado época (E), no qual houve um decréscimo da quantidade acumulada desse osmólito em função do tempo (Tabela 1). Geralmente, parte das pesquisas realizadas em plantas sob condições de deficiência hídrica evidencia que o acúmulo desse aminoácido aumenta gradativamente, conforme o tempo de imposição ao estresse (FUMIS e PEDRAS, 2002; YAMADA et al., 2005), embora também sejam verificadas tendências de estabilização e/ou decréscimo dos teores desse osmólito nos tecidos foliares de artemísia (*Tanacetum parthenium* L.) e de algumas cultivares de trigo (FUMIS e PEDRAS, 2002; CARVALHO et al., 2003). A constância desses valores encontrados no decorrer das coletas em algumas cultivares poder estar atribuída à aclimação do genótipo ao estresse, caracterizando certa tolerância (FUMIS e PEDRAS, 2002), fato que explicaria o efeito de DHS em C<sub>2</sub>E<sub>2</sub> não ter sido significativo. Ainda, além das vantagens que a prolina livre tem na manutenção da turgescência celular, este aminoácido seria uma fonte prontamente acessível de energia para ser utilizada no crescimento e no desenvolvimento de tecidos (KAVI KISHOR et al., 2005), pois a oxidação de uma molécula de prolina livre produz 30 ATP. Posto isso, o aminoácido seria translocado através do tecido floemático até o sistema radicular para a manutenção do turgor dessas células, bem como atuaria como fonte de energia nos processos de crescimento e desenvolvimento de tecidos radiculares. Esta hipótese é pertinente ao estudo realizado com milho, no qual foi verificado um incremento de prolina livre no tecido floemático em plântulas sob estresse hídrico, sendo também este valor expressivo no meristema apical radicular comparado com outras regiões do sistema radicular e parte aérea (RAYMOND e SMIRNOFF, 2002). Nesse contexto, é importante ressaltar como a prolina livre influenciaria em outras vias relacionadas à produção de energia e metabolismo do carbono durante o estresse hídrico (KAVI KISHOR et al., 2005).

O aumento dos teores da trealose e da prolina livre nas folhas da cv. IAC91-5155 ratifica com estudos que reportam a importância do ajustamento osmótico na distinção de cultivares tolerantes à seca (GARG et al., 2002a; EL-BASHITI et al., 2005; HONGBO et al., 2006). Estes autores afirmam que este mecanismo está relacionado ao acúmulo de solutos nos tecidos vegetais em resposta à seca, o qual mantém o turgor celular e facilita processos fisiológicos e bioquímicos nessa condição. Em função disso,

plantas mais tolerantes à seca geralmente apresentariam maiores teores de trealose e prolina livre nos tecidos vegetais (NEPOMUCENO et al., 2001). No entanto, a afirmação de que estes osmólitos aumentam em função do tempo em que as plantas estão sob estresse hídrico, deve ser cautelosa, uma vez que existe uma série de reações bioquímicas e alterações fisiológicas interagindo entre si.

## Conclusões

A cv. IAC91-5155 apresenta maior grau de tolerância ao estresse hídrico por acumular mais de um osmoprotetor sob deficiência hídrica no solo.

Os osmoprotetores, trealose e prolina livre, podem ser considerados como marcadores bioquímico-fisiológicos de tolerância ao estresse hídrico para as cultivares IAC91-2195 e IAC91-5155.

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge (FFCRP/USP) e à Profa. Dra. Giovanna Cristina Gianesi, pela assistência nas análises bioquímicas. Ao Prof. Dr. José Frederico Centurion (FCAV/Unesp), pelas sugestões. Ao pesquisador DSc. Marcelo de Almeida Silva da APTA/Polo Centro-Oeste, pela cessão do material botânico. Rafaela J. B. Queiroz recebeu bolsa de estudos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Referências

- ALMEIDA, A. M.; CARDOSO, L. A.; SANTOS, D. M.; TORNÉ, J. M.; FEVEREIRO, P. S. Trehalose and its applications in plant biotechnology. **In vitro cellular & developmental biology. Plant / Society for In Vitro Biology**, Oxon, v. 43, p.167–177, 2007.
- ANDRIOLI, I.; CENTURION, J. F. Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27., 1999, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999. p. 32.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 24, n. 1, p.23-58, 2005.

- BATES, L. S.; WALDREW, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, Dordrecht, v.39, p. 205-207, 1973.
- BIDOIA, M. A. P.; SANTOS, D. M. M. dos; MARIN, A.; LANDELL, M. G. A.; BANZATTO, D. A.; CAZETTA, J. O. Efeito da deficiência hídrica no acúmulo de prolina livre em cana-de-açúcar, em diferentes períodos de desenvolvimento. **Revista STAB**, Piracicaba, v. 24, n.5, p.6-9, 2006.
- BRAY; E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stress. IN: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds). **Biochemistry and molecular biology of plants**. 3rd. ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2001. p.1158-1203.
- CARVALHO, L. M. de; CASALI, V. W. D.; SOUZA, M. A. de; CECON, P. R. Disponibilidade de água no solo e crescimento de artemísia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.4, p.726-730, 2003.
- DILLEWIJN, C. van. **Botany of Sugarcane**. Waltham: Chronica Botanica, 1952. 371p.
- EL-BASHITI, T.; HAMAMCI, H.; OKTEM, H. A.; YUCEL, M. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. **Plant Science**, Limerik, v.169, p.47-54, 2005.
- EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: MAPA/Embrapa, 1997. p15-16.
- FUMIS, T. F.; PEDRAS, J. F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetido a déficits hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.4, p.449-453, 2002.
- GARG, A. K.; JU-KON, K.; OWENS, T. G.; RANWALA, A. P.; DO CHA, Y.; KOCHIAN, L. V.; WU, R. J. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.99, n.25, p.15898-15903, 2002a.
- GARG, A. K.; RANWALA, A.; OWENS, T.; MILLER, W. B.; WU, R. J. Endogenous trehalose detection from leaf tissue of rice, maize, wheat, sorghum, sugarcane, pearl millet, arabidopsis and tobacco by HPLC Plant. In: 2006b, San Diego. Paper, p.12-16.
- HONGBO, S.; ZONGSUO, L.; MINGAN, S. Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.47, n.2, 1, p.132-139, 2006.
- KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; SREENATH RAO; REDDY, K.J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, Bangalore, v.88, n.3, p.424-438, 2005.
- KLAR, A. E.; VILLA NOVA, N. A.; MARCOS, Z. Z.; CERVELLINI, A. Determinação da umidade do solo pelo método das pesagens. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 23. p.15-30, 1966.
- LANDELL, M. G. de A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; SILVA, M. de A.; VASCONCELOS, A. C. M. de; BIDOIA, M. A. P.; XAVIER, M. A. et al. **Variedades de cana-de-açúcar para o Centro-Sul do Brasil: 14ª liberação do programa cana IAC (1959-2004)**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2004. 33p., (Série Tecnologia APTA, Boletim Técnico IAC, 195)
- MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA JUNIOR, G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58; n. 2, p.295-301, 2001.
- NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biociência**, Brasília, n.23, p.12-18, 2001.
- NEVES, M. J.; TERENCE, H. F.; LEONE, F. A.; JORGE, J. A. Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalose from the thermophilic fungus *Hudicola grisea* var. *trermoidea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v.10, p.17-19, 1994.
- PATIST, A.; ZOERB, H. Preservation mechanisms of trehalose in food and biosystems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.40, p.107-113, 2005.

RAIJ, B. van; QUAGGIO, J. A. **Métodos de análise de solo para fins de fertilidade**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1983. 31p.

RAYMOND, M. J.; SMIRNOFF, N. Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. **Annals of Botany**, Oxford, v.89, p.813-823, 2002.

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

RODRIGUES, R. Século XXI, o novo tempo da agroenergia renovável. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v.23, n.1, p.257-263, 2004.

ROSENFELD, U.; LEME, R. J. A. Produtividade da cana-de-açúcar irrigada por aspersão- estudo de épocas de irrigação. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 3., 1984, São Paulo. **Anais...** São Paulo: STAB, 1984. p. 77-84.

WINGLER, A. The function of trehalose biosynthesis in plants. **Phytochemistry**, New York, v.60, p.437-440, 2002.

YAMADA, M.; MORISHITA, H.; URANO, K.; SHIOZAKI, N.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K.; YOSHIBA, Y. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.56, p.1975-1981, 2005.

Recebido em 03-07-2006

Aceito para publicação em 22-07-2008