



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**ESTRESSE POR ALUMÍNIO EM CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR:
CRESCIMENTO RADICULAR E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

LUCAS SMITH PIMENTA

Araras

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**ESTRESSE POR ALUMÍNIO EM CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR:
CRESCIMENTO RADICULAR E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

LUCAS SMITH PIMENTA

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras
2017

Smith Pimenta, Lucas

Estresse por alumínio em cultivares de cana-de-açúcar: crescimento radicular e atividade de enzimas antioxidantes / Lucas Smith Pimenta. -- 2017.
64 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador: Monalisa Sampaio Carneiro

Banca examinadora: Victor Alexandre Vitorello; Raffaella Rossetto

Bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Tolerância ao alumínio. 3. Enzimas antioxidantes.
I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

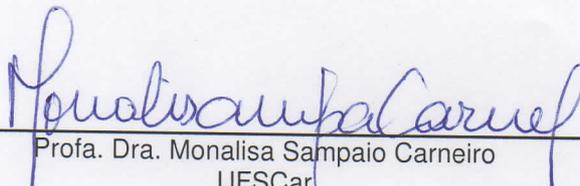


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Lucas Smith Pimenta, realizada em 01/09/2017:



Profa. Dra. Monalisa Sampaio Carneiro
UFSCar



Prof. Dr. Victor Alexandre Vitorello
CENA/USP



Profa. Dra. Raffaella Rossetto
APTA

ORAÇÃO POR ENTENDIMENTO

Senhor Jesus!

Auxilia-nos a compreender mais, a fim de que possamos servir melhor, já que somente assim as bênçãos que nos concedes podem fluir, através de nós, em nosso apoio e em favor de todos aqueles que nos compartilham a existência.

Induza-nos à prática do entendimento que nos fará observar os valores que, porventura, conquistamos, não na condição de propriedade nossa e sim por manancial de recursos que nos compete mobilizar no amparo de quantos ainda não obtiveram as vantagens que nos felicitam a vida.

E ajuda-nos, oh! Divino Mestre, a converter as oportunidades de tempo e trabalho com que nos honraste em serviço aos semelhantes, especialmente na doação de nós mesmos, naquilo que sejamos ou naquilo que possamos dispor, de maneira a sermos hoje melhores do que ontem, permanecendo em Ti, tanto quanto permaneces em nós, agora e sempre.

Assim seja.

Emmanuel

*À minha amada mãe, Jacqueline (in memoriam),
Por seu amor, dedicação e por me ensinar que,
Mesmo diante da mais terrível adversidade,
Devemos manter a serenidade e o sorriso.
Você sempre seguirá no meu coração.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde e força nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Edu e Jacqueline (*in memoriam*), pelo dom da vida, por nunca me faltar nada, pelo apoio incondicional, pelo amor e confiança.

Aos meus irmãos Karen e Alexandre, e cunhados Eduardo e Letícia, pelo companheirismo e por trazer ao mundo meus sobrinhos Raul, Francisco, Heitor e Joaquim, aos quais também sou grato por serem luzes em minha vida. Em especial à minha irmã e cunhado que me acolheram em seu lar com muito amor, sempre serei grato.

Ao meu amor, Heloisa, que tem sido minha companheira desde o início desta etapa, me dando forças quando precisei, além de muito amor, carinho e compreensão. Obrigado por estar ao meu lado e tornar o caminho muito mais feliz e completo.

À Prof^a Dr^a. Monalisa Sampaio Carneiro, por ter aceitado me orientar, pelos ensinamentos, paciência e amizade na forma de bons conselhos. Obrigado por ser firme quando necessário, sigo adiante me sentindo muito mais maduro e preparado.

Aos Prof. Dr. Eduardo Dal'Ava Mariano e Prof. Dr. Rodrigo Gazaffi, pelas contribuições constantes e relevantes ao trabalho. Obrigado pela parceria, paciência e ensinamentos.

À Dr^a Salete A. Gaziola (ESALQ-USP) pelos ensinamentos e auxílio fundamentais nas análises enzimáticas. Obrigado por me receber tão bem em seu laboratório.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, Thiago, Isabella, Fernanda, Bianca, Alinne e Elaine. Obrigado por compartilhar desta experiência comigo, dividir conhecimentos e tornar o dia-a-dia mais leve. Vocês me são muito queridos.

A toda a equipe do PMGCA pela boa convivência durante esses anos, em especial ao Sandro pelo auxílio na parte de campo. Desejo sucesso a todos.

Aos estagiários do GEBPlant que colaboraram durante os experimentos.

Ao PPGPVBA e à equipe de pós-graduação pela oportunidade e apoio.

A CAPES pela bolsa concedida e por seus esforços em continuar financiando a ciência e formando profissionais, mesmo diante de desafios políticos e financeiros.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE TABELAS..... | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | iii |
| RESUMO..... | v |
| ABSTRACT..... | vi |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2 OBJETIVOS..... | 04 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 04 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 04 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA..... | 05 |
| 3.1 Cana-de-açúcar (<i>Saccharum spp.</i>)..... | 05 |
| 3.2 Aspectos produtivos e econômicos da cana-de-açúcar..... | 05 |
| 3.3 Sistema radicular da cana-de-açúcar..... | 06 |
| 3.4 Solos ácidos e Al ³⁺ | 08 |
| 3.5 Sintomas da toxidez por Al ³⁺ | 11 |
| 3.5.1 Estresse oxidativo..... | 12 |
| 3.5.1.1 Estresse oxidativo causado por Al ³⁺ | 14 |
| 3.6 Mecanismos de tolerância ao Al ³⁺ em plantas..... | 15 |
| 3.6.1 Enzimas antioxidantes..... | 16 |
| 3.7 Cultivo em solução nutriente..... | 19 |
| 3.8 Medidas de avaliação de raízes em resposta a toxidez do Al ³⁺ | 20 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 22 |
| 4.1 Material vegetal..... | 25 |
| 4.2 Cultivos em hidroponia e soluções nutrientes..... | 25 |
| 4.2.1 Aclimação a hidroponia – Solução nutriente completa... | 27 |
| 4.2.2 Exposição ao Al ³⁺ - Solução nutriente simples..... | 28 |
| 4.3 Medição do comprimento radicular médio (CRM)..... | 28 |
| 4.4 Experimentos em hidroponia para avaliação da tolerância ao Al ³⁺ dos cultivares de cana-de-açúcar..... | 29 |
| 4.4.1 Experimento I: Determinação do tempo de exposição e dose de Al ³⁺ para avaliação da tolerância em cultivares de cana-de-açúcar..... | 29 |
| 4.4.2 Experimento II: Avaliação de nove cultivares de cana-de-açúcar quanto à tolerância ao Al ³⁺ | 30 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.4.3 | Experimento III: Comparação entre dois cultivares contrastantes para tolerância ao Al^{3+} | 31 |
| 4.4.4 | Experimento IV: Comparação entre nove cultivares de cana-de-açúcar e avaliação da atividade de enzimas antioxidantes para tolerância ao Al^{3+} | 32 |
| 4.4.4.1 | Extração de proteínas solúveis totais (PST)..... | 34 |
| 4.4.4.2 | Quantificação de proteínas solúveis totais (PST). | 34 |
| 4.4.4.3 | Atividade da superóxido dismutase (SOD)..... | 35 |
| 4.4.4.4 | Atividade da catalase (CAT)..... | 35 |
| 4.4.4.5 | Atividade da superóxido dismutase (SOD)..... | 35 |
| 4.5 | Análises estatísticas..... | 36 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 37 |
| 5.1 | Obtenção do material vegetal..... | 37 |
| 5.2 | Cultivo hidropônico e soluções nutriente..... | 39 |
| 5.3 | Experimentos em hidroponia para avaliação da tolerância ao Al^{3+} dos cultivares de cana-de-açúcar..... | 39 |
| 5.3.1 | Experimento I: Determinação do tempo de exposição e dose de Al^{3+} para avaliação da tolerância em cultivares de cana-de-açúcar..... | 39 |
| 5.3.2 | Experimento II: Avaliação de nove cultivares de cana-de-açúcar quanto à tolerância ao Al^{3+} | 42 |
| 5.3.3 | Experimento III: Comparação entre dois cultivares contrastantes para tolerância ao Al^{3+} | 44 |
| 5.3.4 | Experimento IV: Comparação entre nove cultivares de cana-de-açúcar e avaliação da atividade de enzimas antioxidantes para tolerância ao Al^{3+} | 45 |
| 5.3.4.1 | Experimento: Condição controle (0 μM $\{Al^{3+}\}$)..... | 47 |
| 5.3.4.2 | Experimento: Condição desafio (143 μM $\{Al^{3+}\}$)..... | 48 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 53 |
| 7 | LITERATURA CITADA..... | 54 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | | Página |
|-----------|--|--------|
| Tabela 1. | Estudos sobre a atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD) em resposta ao Al, espécies estudadas e resultado observado..... | 19 |
| Tabela 2. | Exemplos de medidas radiculares utilizadas para avaliar e comparar a tolerância ao Al ³⁺ entre genótipos ou espécies..... | 21 |
| Tabela 3. | Cultivares de cana-de-açúcar utilizados durante os experimentos em cultivo hidropônico, seus genitores e exigência em ambientes de produção..... | 23 |
| Tabela 4. | Composição da solução nutriente completa, em macro e micronutrientes, utilizada para aclimatação das plantas de cana-de-açúcar durante os experimentos em hidroponia (MARIANO et al., 2015 (modificado); HOAGLAND; ARNON, 1950)..... | 28 |
| Tabela 5. | Taxa de Alongamento Radicular (TAR) (cm.dia ⁻¹) dos cultivares de cana-de-açúcar RB835486 e SP80-3280, em seis concentrações de Al, avaliados durante três, sete e quatorze dias (D3, D7 e D14, respectivamente) de exposição..... | 39 |
| Tabela 6. | Taxa de Alongamento Radicular (TAR) (cm.dia ⁻¹) de nove cultivares de cana-de-açúcar cultivados durante três dias em solução nutriente simples, em condição controle (0 µM de {Al ³⁺ }) ou exposição (143 µM de {Al ³⁺ })..... | 42 |
| Tabela 7. | Taxa de Alongamento Radicular (TAR) (cm.dia ⁻¹) dos cultivares RB855536 e RB92579 no experimento em solução nutriente simples..... | 44 |
| Tabela 8. | Crescimento radicular relativo (CRR) de nove cultivares de cana-de-açúcar cultivadas em sistema hidropônico nos experimentos de condição controle (0 µM {Al ³⁺ }) e desafio (143 µM {Al ³⁺ })..... | 45 |
| Tabela 9. | Atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX em nmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína), catalase (CAT em µmol H ₂ O ₂ min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína) e superóxido dismutase (SOD em U SOD mg ⁻¹ proteína) em nove cultivares de cana-de-açúcar cultivadas em sistema hidropônico nos experimentos de condição controle (0 µM {Al ³⁺ }) e desafio (143 µM {Al ³⁺ })..... | 46 |

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 10. | Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre CRR e atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD) de nove cultivares de cana-de-açúcar nos experimentos em condição controle (0 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$ e condição desafio (143 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$)..... | 47 |
|------------|--|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | Página |
|------------|--|--------|
| Figura 1. | Sistema radicular de uma planta de cana-de-açúcar jovem (SMITH et al., 2005; BLACKBURN, 1984)..... | 7 |
| Figura 2. | Especiação química do alumínio, em mM, de acordo com o pH da solução. (Fonte: SPRY; WIENER, 1991)..... | 9 |
| Figura 3. | Produtividade diária média de clones de cana-de-açúcar para cada corte em solos com diferentes classificações (Landell et al., 2003)..... | 10 |
| Figura 4. | Efeito da toxidez do Al ³⁺ sobre ápices radiculares (esq.) (Delhaize; Ryan, 1995) e zona de alongação radicular (dir.) (Kopittke; Wang, 2017)..... | 12 |
| Figura 5. | Esquema simplificado da geração e remoção enzimática de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas..... | 16 |
| Figura 6. | Esquema geral da produção e remoção enzimática de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas (Shivashankara et al., 2016)..... | 17 |
| Figura 7. | Visão geral dos experimentos hidropônicos para avaliação de tolerância ao Al ³⁺ de cultivares de cana-de-açúcar..... | 24 |
| Figura 8. | Preparo e acidificação das soluções nutriente (completa ou simples), utilizadas durante os experimentos..... | 26 |
| Figura 9. | Sistema hidropônico instalado em casa de vegetação para os experimentos de avaliação da tolerância ao Al ³⁺ em cana-de-açúcar..... | 27 |
| Figura 10. | Medição das raízes para obtenção do comprimento radicular médio (CRM = \sum Comprimento raízes/n° raízes medidas) das plantas de cana-de-açúcar, utilizando uma régua (cm)..... | 29 |
| Figura 11. | Sistema hidropônico instalado em casa de vegetação durante o Experimento I..... | 30 |
| Figura 12. | Planta de cana-de-açúcar após o toilette (esq.) e marcação, com linha colorida, de três raízes do perfilho selecionadas (dir.)..... | 32 |
| Figura 13. | Ápices radiculares de cana-de-açúcar coletados após cultivo em solução nutriente simples..... | 34 |
| Figura 14. | Sistema radicular de plantas de cana-de-açúcar cultivadas durante sete dias em hidroponia com solução nutriente completa. Estrutura do minitolete: P = perfilho; RP = raiz do perfilho; MT = minitolete e RT = raiz do minitolete. A – RB855536; B – RB855536 submetida ao toilette; C – RB92579; D – RB92579 submetida ao toilette..... | 38 |
| Figura 15. | Tendência das médias de Taxa de Alongamento Radicular (TAR) (cm.dia ⁻¹) dos cultivares de cana-de-açúcar RB835486 e SP80-3280, em concentrações crescentes de Al em solução nutriente simples e em três períodos de exposição (D3, D7 e | 40 |

| | | |
|------------|--|----|
| | D14)..... | |
| Figura 16. | Taxa de Alongamento Radicular (TAR) (cm.dia ⁻¹) dos nove cultivares de cana-de-açúcar cultivados durante três dias em solução nutriente simples, em condição controle (0 µM de {Al ³⁺ }) ou exposição (143 µM de {Al ³⁺ }). Letras distintas indicam diferença estatística significativa, segundo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$)..... | 43 |
| Figura 17. | Taxa de Alongamento Radicular (cm.dia ⁻¹) dos cultivares RB855536 e RB92579 no experimento em solução nutriente simples. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre os cultivares, segundo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$)..... | 44 |

ESTRESSE POR ALUMÍNIO EM CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR: CRESCIMENTO RADICULAR E ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Autor: LUCAS SMITH PIMENTA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é a cultura agrícola mais importante da economia de mais de cem países tropicais e subtropicais, sendo responsável por 70% do açúcar e 40% do etanol produzidos no mundo. A toxidez por alumínio (Al^{3+}) em solos ácidos é o segundo maior estresse abiótico, depois da seca, afetando a produtividade das culturas. O Al^{3+} limita diretamente a produtividade da cana-de-açúcar através da inibição do desenvolvimento radicular, promovendo ainda o desequilíbrio entre a produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs). O uso da calagem para correção da acidez do solo é uma solução dispendiosa e temporária, sendo a adoção de cultivares tolerantes ao Al^{3+} uma prática mais sustentável em longo prazo. Diversas espécies de gramíneas possuem cultivares tolerantes ao Al^{3+} , os quais vêm sendo estudados e utilizados com sucesso na obtenção de genótipos mais produtivos. O presente estudo teve por objetivo avaliar a tolerância ao Al^{3+} em um grupo de cultivares de cana-de-açúcar, através do crescimento radicular e atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD). Foi conduzida uma série de experimentos em hidroponia, com a finalidade de definir a atividade de Al^{3+} e os tempos mínimos de aclimação e exposição, necessários para verificar o comportamento dos cultivares. O sistema proposto, com sete dias de aclimação e três dias de exposição a $143 \mu\text{M Al}^{3+}$, foi adequado para estudar os cultivares. Nos últimos experimentos conduzidos, foram avaliados nove cultivares na ausência ($0 \mu\text{M Al}^{3+}$) ou presença do Al^{3+} ($143 \mu\text{M Al}^{3+}$), os quais foram separados em dois grupos, baseado no crescimento radicular relativo (CRR). No experimento controle ($0 \mu\text{M Al}^{3+}$) o CRR não apresentou correlação significativa com a atividade de nenhuma das enzimas antioxidantes estudadas. Em contrapartida, no experimento desafio ($143 \mu\text{M Al}^{3+}$), foram obtidas correlações significativas ($p \leq 0,05$) entre o CRR e a atividade das enzimas CAT e SOD. Os resultados indicam um possível papel destas enzimas na manutenção do estado oxidativo e do crescimento radicular em plantas de cana-de-açúcar expostas ao Al^{3+} .

Palavras-chave: alumínio tóxico, EROs, alumínio, enzimas antioxidantes

ALUMINIUM STRESS IN SUGARCANE CULTIVARS: ROOT GROWTH AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES

Author: LUCAS SMITH PIMENTA

Adviser: Prof. Dr. MONALISA SAMPAIO CARNEIRO

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum spp.*) is the most important crop for the economy of more than a hundred tropical and subtropical countries, accounting for 70% of the sugar and 40% of the ethanol production worldwide. Aluminium toxicity (Al^{3+}) on acidic soils is the second major abiotic stress, after drought, affecting crop's productivity. Al^{3+} directly limits sugarcane productivity through the inhibition of root development, promoting yet the unbalance between the production and elimination of reactive oxygen species (ROS). The use of liming for correcting soil acidity is an expensive and temporary solution, being the adoption of cultivars tolerant to Al^{3+} a more sustainable practice in the long term. Several grass species have Al^{3+} tolerant cultivars, which have been studied and successfully used to obtain more productive genotypes. The present study aimed to evaluate the tolerance to Al^{3+} in a group of sugarcane cultivars, through root growth and antioxidant enzymes activities (APX, CAT and SOD). A series of hydroponics experiments were conducted to define Al^{3+} activity and the minimum acclimation and exposure periods required to verify the behavior of the cultivars. The proposed system, with seven days of acclimatization and three days of exposure to $143 \mu\text{M Al}^{3+}$, was adequate to study the cultivars. In the last experiments conducted, nine cultivars were evaluated in the absence ($0 \mu\text{M Al}^{3+}$) or presence of $143 \mu\text{M Al}^{3+}$, which were separated into two groups, based on the relative root growth (RRG). In the control experiment ($0 \mu\text{M Al}^{3+}$) RRG showed no significant correlation with the activity of any of the antioxidant enzymes studied. In contrast, in the Al treatment experiment ($143 \mu\text{M Al}^{3+}$), significant correlations ($p \leq 0.05$) were obtained between RRG and the enzymes CAT and SOD. The results indicate a possible role of these enzymes in the maintenance of the oxidative status and root growth in sugarcane plants exposed to Al^{3+} .

Key-words: toxic aluminium, ROS, aluminium, antioxidant enzymes.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura com forte presença em países tropicais, tendo grande relevância para diversas economias emergentes de países em desenvolvimento, podendo ter sua produção destinada à produção de combustíveis renováveis ou alimentos. Um dos maiores obstáculos para a produtividade são os solos ácidos ($\text{pH} \leq 5,0$), onde o alumínio apresenta maior solubilidade de sua forma tóxica Al^{3+} (Kochian et al., 2015).

Estima-se que 40% dos solos cultiváveis do mundo sejam ácidos, podendo apresentar então o Al tóxico (VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995). Apenas no Brasil, mais de 500 milhões de hectares de terra são ácidos, representando dois terços de seu território total, configurando a maior área de solos ácidos dentro de um mesmo país (VITORELLO et al., 2005). A solução mais utilizada para corrigir a acidez do solo e reduzir os prejuízos ocasionados pelo Al^{3+} é a aplicação de calcário, uma estratégia que utiliza um recurso mineral não renovável e que apresenta baixa eficiência, pois atinge apenas a camada mais superficial do solo. Além disso, esta operação apresenta dificuldades para ser repetida ao longo do tempo em uma cultura semi perene como a cana-de-açúcar (LANDELL et al., 2003). Desta forma, uma solução mais eficiente para o cultivo sustentável em longo prazo, aumentando o tempo necessário entre as reformas do canavial, seria a oferta de cultivares capazes de tolerar a presença do Al^{3+} , entregando produtividades elevadas mesmo em

solos desfavoráveis. De certa maneira, os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar acabam selecionando indiretamente os indivíduos que apresentam maior tolerância ao Al^{3+} , pois os híbridos são testados em diversas regiões de solos ácidos, sendo selecionados com base em diversas características, dentre elas a produtividade, a qual pode ser influenciada pelo nível de tolerância ao Al^{3+} da planta.

O Al^{3+} causa severos danos nutricionais à planta, prejudicando a divisão e alongamento celular nos ápices radiculares, região responsável pelo crescimento das raízes (KOPITTKKE; BLAMEY, 2016; LOSKUTOV et al., 2016; KOCHIAN et al., 2005). Cultivares tolerantes ao Al^{3+} são capazes de desenvolver melhor seu sistema radicular em solos ácidos, explorando melhor as reservas nutricionais do solo e se tornando mais resilientes a períodos de seca (LANDELL et al., 2003). Os prejuízos causados pelo Al^{3+} podem ocorrer através de diversos mecanismos, como a competição com íons importantes como o Ca^{2+} e Mg^{2+} , ligação a membranas celulares causando perda de fluidez, interação com proteínas, inativação enzimas e até causar danos ao DNA, podendo alterar a expressão de genes (AZEVEDO et al., 2011; KOCHIAN et al., 2005).

Em diversas espécies de gramíneas, como sorgo, milho, arroz e trigo, a tolerância ao Al^{3+} é uma característica que vem sendo estudada (KOPITTKKE et al., 2016; MA et al., 2014; WU et al., 2014; FAMOSO et al., 2010), e este conhecimento tem contribuído para o aumento da adaptabilidade e produtividade nestas culturas. A maneira mais comum de se avaliar genótipos quanto à tolerância ao Al^{3+} é através do cultivo em sistema hidropônico, utilizando soluções nutrientes (KOPITTKKE; BLAMEY, 2016; LOSKUTOV et al., 2016; CANIATO et al., 2007; WATT, 2003). Este método apresenta vantagens operacionais sobre o cultivo em solos, permitindo a avaliação de um grande número de genótipos com menor custo e tempo (KOPITTKKE; BLAMEY, 2016; LOSKUTOV et al., 2016; CANIATO et al., 2007). Diferente do solo, que apresenta grande heterogeneidade de composição, o cultivo hidropônico permite total controle sobre o pH e atividade de Al^{3+} no meio (KOPITTKKE; BLAMEY, 2016; CANIATO et al., 2007; WATT, 2003). Além disso, as raízes ficam acessíveis em sistemas hidropônicos, facilitando avaliações de tolerância ao Al^{3+} , visto que o crescimento radicular é o principal parâmetro avaliado em

estudos deste tipo (LOSKUTOV et al., 2016; KOCHIAN et al., 2005). A atividade de Al^{3+} e o tempo de exposição são parâmetros importantes a serem definidos quando se estuda esta característica, visto que existe grande variabilidade nos níveis críticos de Al^{3+} entre espécies e entre cultivares (FAMOSO et al., 2010; CANIATO et al., 2007; HETHERINGTON et al., 1986, 1988).

Em cana-de-açúcar, a tolerância ao Al^{3+} ainda é uma característica pouco estudada, sendo que a maior parte dos estudos tem foco em características da parte aérea da planta, como acúmulo de biomassa, conteúdo de açúcares ou capacidade fotossintética. Alguns estudos sobre o assunto foram feitos com cultivo em solos, entretanto este método sofre interferências de diversos fatores do ambiente, podendo apresentar resultados enviesados (KOPITTKE; BLAMEY, 2016; LOSKUTOV et al., 2016). Além disso, pouca atenção foi dada ao estudo do metabolismo antioxidante da cana-de-açúcar na presença do Al^{3+} , o que poderia trazer maior compreensão sobre o estresse oxidativo causado por este metal (AZEVEDO et al., 2011), oferecendo contribuições para o melhoramento genético da cultura e aumento de sua produtividade.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar cultivares de cana-de-açúcar quanto a sua tolerância ao Al^{3+} em cultivo hidropônico, através da análise do crescimento radicular e atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD).

2.2. Objetivos Específicos

a) Determinar a atividade de Al^{3+} e período de exposição mínimo, na presença ou ausência do Al^{3+} , que permitam avaliar os cultivares de cana-de-açúcar.

b) Avaliar o efeito da exposição ao Al^{3+} sobre o crescimento radicular e metabolismo oxidativo dos cultivares de cana-de-açúcar, a partir da atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente à família das *Poaceae* (gramíneas), tribo *Andropogoneae* e gênero *Saccharum*. As cultivares modernas de cana-de-açúcar são híbridos complexos, autoploiploides e aneuploides, originados majoritariamente de cruzamentos interespecíficos entre progenitores de *Saccharum officinarum* L. ($2n = 80$), espécie com alto conteúdo de açúcares, e *S. spontaneum* L. ($2n = 40-128$), que possui maior vigor e resistência a pragas e estresses abióticos (HOANG et al., 2015; CARDOSO-SILVA et al., 2014; GRIVET; ARRUDA, 2002), possuindo ainda pequenas contribuições de outras espécies do gênero *Saccharum*, principalmente de *S. robustum* ($2n = 60-160$) (CARDOSO-SILVA et al., 2014; de SETTA et al., 2014; ZHANG et al., 2013).

3.2 Aspectos produtivos e econômicos da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é um dos produtos agrícolas mais importantes, tendo relação direta com os mercados de alimento e bioenergia. Além de ser a fonte de 70% do açúcar e 40% do bioetanol produzidos no mundo (MAPA, 2015; ZHANG et al., 2013; AZEVEDO et al., 2011), a cana-de-açúcar é matéria prima para produtos renováveis como bioetanol (1^a e 2^a geração), bioplásticos e cogeração de energia, tendo grande importância para as economias

emergentes de países tropicais e subtropicais (HOANG et al., 2015; KOCHIAN et al., 2015). A cana-de-açúcar é a cultura mais importante para cerca de cem países, com uma área de produção de 26,9 milhões de hectares, produção total de 1,9 bilhões de toneladas e produtividade de 70,9 toneladas de cana fresca por hectare (OECD/FAO, 2016). Na safra brasileira de 2014/15 a área plantada com cana-de-açúcar, foi de 9 milhões de hectares (CONAB, 2015), apresentando um aumento de 2,1% em relação a safra anterior, e o estado de São Paulo como maior produtor nacional, foi o principal responsável por este aumento (IBGE, 2015).

A produção da cana-de-açúcar vem aumentando ao longo dos anos, tendo dobrado no período de 2000 a 2013, no entanto, 88% deste aumento decorreram da expansão de áreas cultivadas e, apenas 12% devido a ganhos em produtividade (MARIN et al., 2016). Atualmente, os principais desafios a serem vencidos, são: a necessidade de adaptação a diferentes tipos de solos, regimes hídricos e nutricionais restritivos, além de estresses bióticos e abióticos (VALDES, 2011). A cana-de-açúcar representa uma das melhores alternativas para a produção de combustíveis renováveis em países tropicais, e a tendência é que haja um aumento significativo na demanda por estes produtos na próxima década, algo que pode ser atendido com uma expansão de 13% na área cultivada ou, até mesmo uma redução de 18% em um cenário de baixa demanda. Para que esta demanda seja atendida, sem a necessidade de expansão de áreas, estima-se que um aumento de até 45% na produtividade seja necessário, tornando evidente a necessidade de investimento em pesquisa científica sobre esta questão (MARIN, 2016).

3.3 Sistema radicular da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma cultura semiperene, podendo ser colhida em média durante cinco ciclos, até ser necessária a reforma do canavial. Os colmos da cana-de-açúcar possuem gemas e primórdios radiculares em cada entrenó e, ao final de cada ciclo produtivo, alguns colmos são deitados a campo, recebendo a denominação de toletes, o que permite que estas gemas e primórdios radiculares se desenvolvam e originem novas plantas (SMITH et al., 2005; VAN DILLEWIJN, 1952). Este processo de propagação vegetativa gera

plantas com um sistema radicular fasciculado bastante complexo, sendo composto inicialmente por raízes do tolete, as quais são substituídas gradativamente por raízes do perfilho, que são mais grossas e vinculadas diretamente à base da nova planta (SMITH et al., 2005) (Figura 1). Cerca de três meses após o início do novo ciclo, as raízes do tolete correspondem a menos de 2% da massa seca das raízes e, assim, as raízes do perfilho passam a serem as principais responsáveis pela exploração do solo e nutrição da planta (SMITH et al., 2005; VAN DILLEWIJN, 1952). SMITH et al. (2005) citam uma possível relação entre os aumentos de produtividade da cana-de-açúcar com uma melhoria indireta na arquitetura do sistema radicular dos híbridos através de programas de melhoramento genético, um fato pouco estudado, porém muito importante para a obtenção de cultivares mais produtivas em solos com condições desfavoráveis.

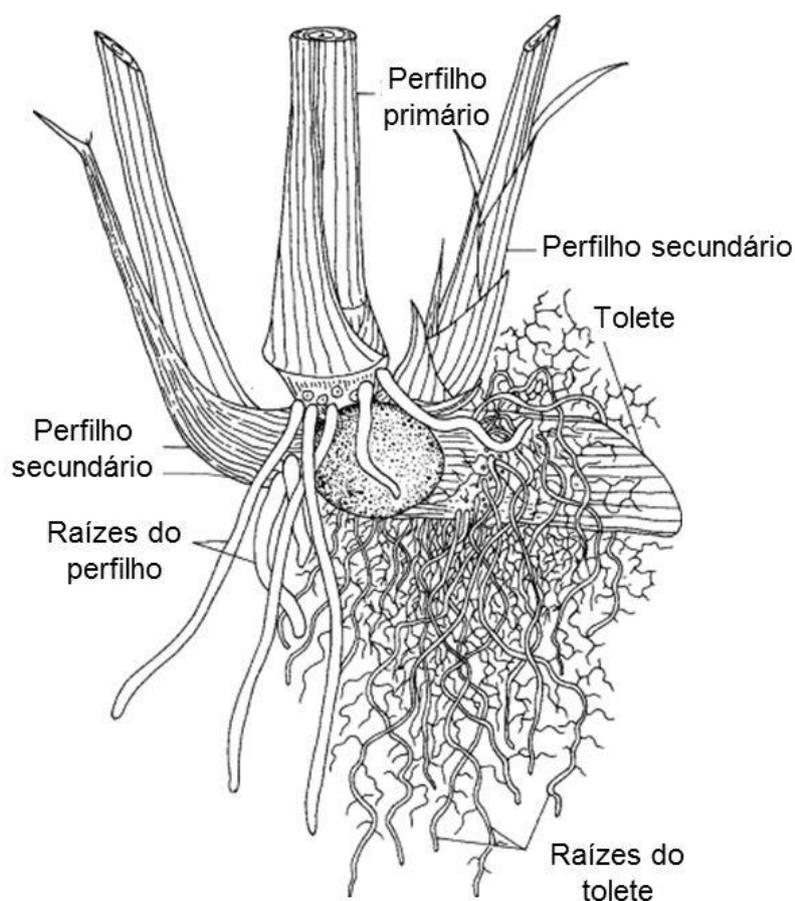


Figura 1. Sistema radicular de uma planta de cana-de-açúcar jovem. (SMITH et al., 2005; BLACKBURN, 1984).

A cana de açúcar possui um sistema radicular de morfologia mais complexa em relação a outras culturas utilizadas em estudos sobre tolerância ao alumínio, onde geralmente há uma raiz principal, medida sem maiores dificuldades, e que reflete de forma confiável a influência do Al^{3+} sobre a planta. Além disso, apresenta elevada variação em sua arquitetura do sistema radicular, portanto não se deve esperar observar padrões fixos entre genótipos, tanto morfológicamente como em resposta a estresses (SMITH et al., 2005). Assim, as características do sistema radicular de cana-de-açúcar, em mudas produzidas a partir de toletes, são um desafio adicional para a avaliação de seu desenvolvimento.

3.4 Solos ácidos e Al^{3+}

Estima-se que entre 40-50% dos solos potencialmente cultiváveis no mundo são ácidos, sendo que 60% deste total estão localizados em países de regiões tropicais e subtropicais, nos quais a produção de alimentos e energia é um fator crucial na economia (KOCHIAN et al., 2015; VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995). Neste tipo de solo, ocorre redução nos teores de cálcio e magnésio, afetando negativamente o crescimento e produtividade das plantas e também reduzindo a disponibilidade de fósforo, devido à sua adsorção e precipitação por ferro e alumínio.

O alumínio (Al) é o metal mais abundante na crosta terrestre, representando 8% de seu peso, e o terceiro elemento mais comum depois do oxigênio e silício (SPOSITO, 2008). O Al não produz efeito sobre o crescimento radicular de plantas em solos com pH próximos da neutralidade, no entanto, em solos ácidos ($\text{pH} \leq 5,5$) o alumínio (Al) se solubiliza na sua forma tóxica Al^{3+} , que rapidamente inibe o desenvolvimento radicular (KOCHIAN et al., 2015; DELHAIZE et al., 2012). A toxidez por Al^{3+} em solos ácidos é a segunda maior limitação para a produção de alimentos e bioenergia, perdendo apenas para a seca (KOCHIAN et al., 2015; AZEVEDO et al., 2011; ZSOLDOS et al., 2001).

O alumínio pode estar presente no solo de forma livre ou complexado com minerais ou matéria orgânica. A disponibilidade das formas do Al varia conforme o pH do meio, sendo que a forma fitotóxica Al^{3+} tem sua atividade

aumentada em 1000 vezes para cada unidade a menos no pH (Figura 2) (KOPITTKKE; BLAMEY, 2016; SPRY; WIENER, 1991).

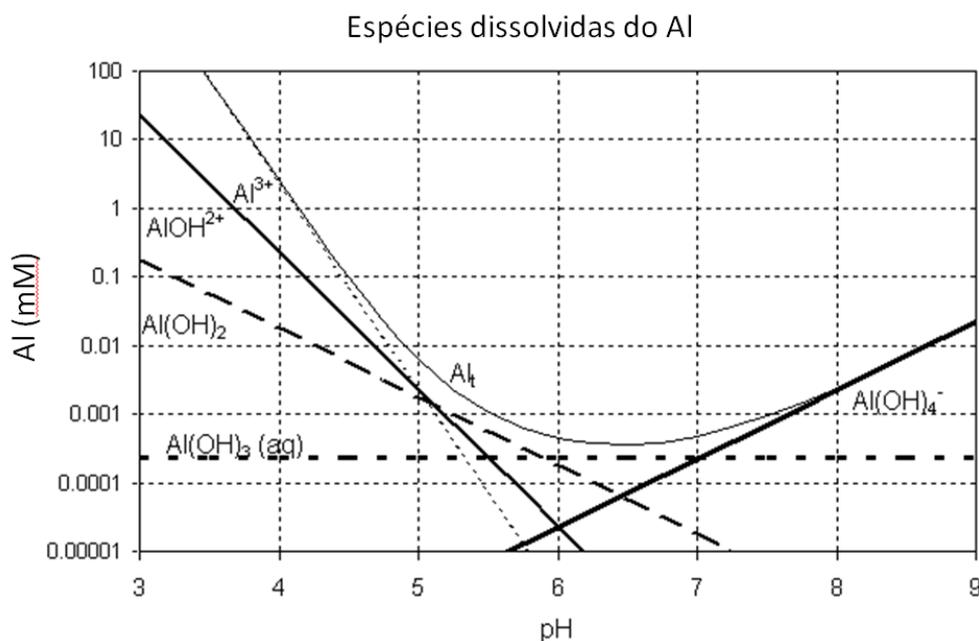


Figura 2. Especificação química do alumínio, em mM, de acordo com o pH da solução. (Fonte: SPRY; WIENER, 1991).

Atualmente, a solução mais utilizada para corrigir a acidez do solo e reduzir os prejuízos ocasionados pelo Al^{3+} é a aplicação de calcário, uma operação que utiliza um recurso mineral não renovável e que apresenta baixa eficiência, pois atinge apenas a camada mais superficial do solo (0-20 cm), não prevenindo a ação nociva do Al^{3+} presente em perfis mais profundos, os quais devem ser explorados pela planta, para que tenha maior disponibilidade nutricional e tolerância a períodos de seca (LANDELL et al., 2003). Outro problema é que esta técnica não pode ser repetida ao longo do tempo em uma cultura semi perene como a cana-de-açúcar, perdendo eficiência ao longo dos cortes (HARTWIG et al., 2007; LANDELL et al., 2003).

Com a crescente demanda por alimentos e energia renovável, a cana-de-açúcar vem aumentando sua área de cultivo (HOANG et al., 2015) e, inevitavelmente, sendo expandida sobre áreas marginais, onde a presença do Al^{3+} no solo é mais acentuada (AZEVEDO et al., 2011). A cana-de-açúcar é considerada uma espécie tropical robusta e de crescimento vigoroso (AZEVEDO et al., 2011), sendo mais tolerante a metais tóxicos, como o

alumínio, em relação a outras gramíneas (WATT, 2003; HETHERINGTON et al., 1986). Entretanto, apesar de ter um grau de tolerância ao Al aparentemente elevado, a extensão e severidade da acidificação do solo decorrente do cultivo da cana-de-açúcar, sugerem que até mesmo uma pequena suscetibilidade ao Al pode gerar perdas econômicas sensíveis nesta cultura (WATT, 2003). Em um trabalho publicado em 2003, Landell et al. demonstraram que, a partir do terceiro corte, houve redução na produtividade média dos clones de cana-de-açúcar estudados, em relação as classes de fertilidade do solo, seguindo a ordem: eutróficos > mesotróficos > distróficos > ácricos > álicos (Figura 3).

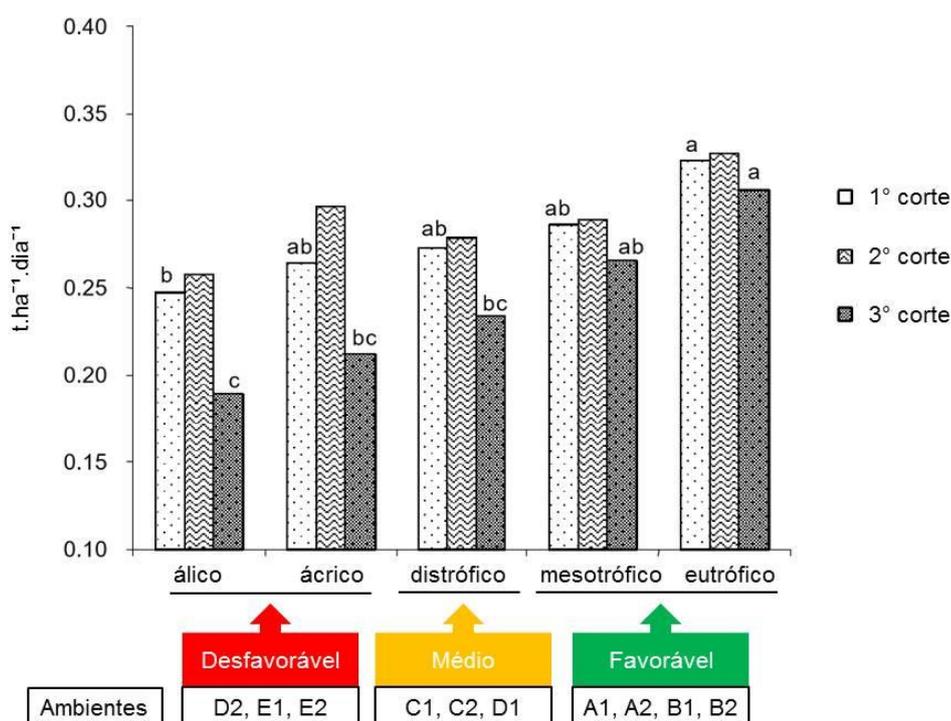


Figura 3. Produtividade diária média de clones de cana-de-açúcar para cada corte em solos com diferentes classificações (LANDELL et al., 2003).

Nos dois primeiros cortes, a produtividade geralmente se manteve elevada, pois o sistema radicular explora a camada mais superficial do solo, que é manejada e homogeneizada. Porém, a partir do terceiro corte, a nutrição da planta passa a depender de perfis mais profundos do solo, os quais mantêm suas características originais (LANDELL et al., 2003).

Dias et al. (1999), analisaram seis cultivares de cana-de-açúcar em seis localidades, fazendo uma correlação entre produtividade e características

climáticas, físicas e químicas do solo, separando a análise entre os horizontes A e B do solo. Seus resultados demonstraram que a produtividade encontra correlações muito maiores com os atributos químicos do solo no horizonte B, sendo que o teor de Al e Al + H⁺ apresentaram coeficientes de correlação de Pearson de -0,79 e -0,69, respectivamente.

Joaquim et al. (1994) relacionaram a produtividade da cana-de-açúcar com os solos, constatando que os mais produtivos foram os solos de textura argilosa (teor de argila maior que 35%) e eutróficos, seguidos dos solos distróficos, também de textura argilosa ou média (teor de argila entre 25-35%). Os solos de textura média ou mais arenosos e, principalmente, de característica álica, tiveram as produtividades mais baixas (BARBOSA, 2017).

Portanto, a solução mais eficiente para um cultivo sustentável da cana-de-açúcar em longo prazo seria a oferta de cultivares capazes de tolerar a presença do Al³⁺, entregando produtividades elevadas em solos ácidos (AZEVEDO et al., 2011; CAIRES et al., 2004; LANDELL et al., 2003).

3.5 Sintomas da toxidez por Al³⁺

O efeito mais rápido e evidente da toxidez por Al³⁺ é a inibição do crescimento radicular, gerando encurtamento e engrossamento de raízes (KOCHIAN et al., 2015; DELHAIZE; RYAN, 1995), fazendo com que a planta perca eficiência em absorver água e nutrientes (GUPTA et al., 2013) e gerando perdas consideráveis de produtividade (CANIATO et al., 2014). Isto ocorre devido ao sítio primário de ação do Al ser o ápice radicular, região onde ocorre a maior parte dos processos celulares responsáveis pelo crescimento das raízes, como a divisão e alongamento celular (Figura 4) (KOPITKE; WANG, 2017; KOCHIAN et al., 2015; HARTWIG et al., 2007; DELHAIZE; RYAN, 1995). Assim, a maioria das pesquisas sobre tolerância ao alumínio utiliza o crescimento radicular após exposição ao Al como parâmetro principal (KOPITKE et al., 2016; LOSKUTOV et al., 2016; CANIATO et al., 2007; WATT, 2003; MARTINS et al., 1999), podendo ser aliado a outras medidas bioquímicas ou moleculares (CANIATO et al., 2014; FAMOSO et al., 2011; KOCHIAN et al., 2005).

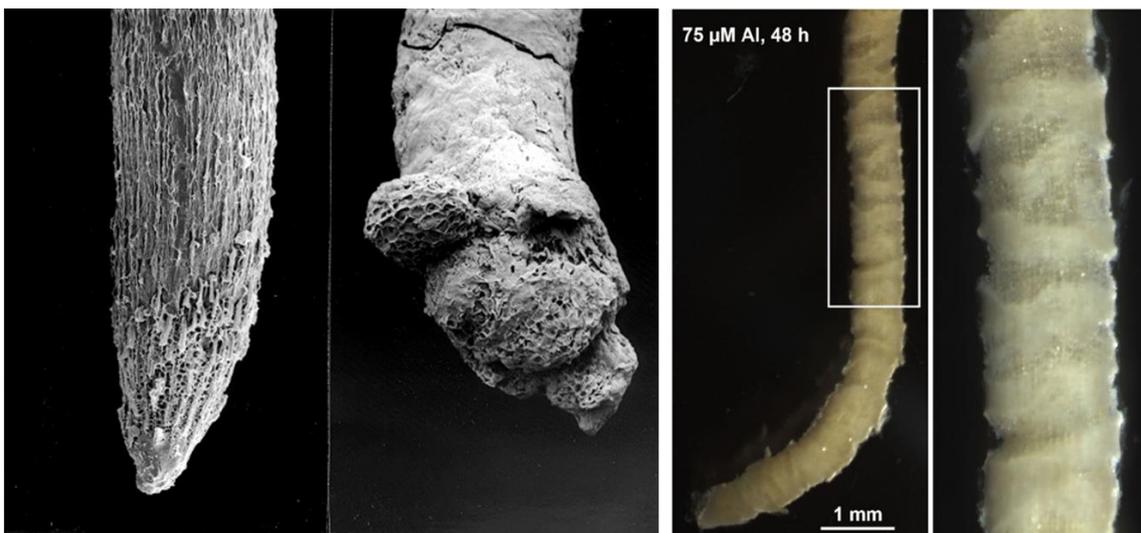


Figura 4. Efeito da toxidez do Al^{3+} sobre ápices radiculares (esq.) (DELHAIZE; RYAN, 1995) e zona de alongação radicular (dir.) (KOPITTKKE; WANG, 2017).

O Al^{3+} também pode causar deficiência de P, Ca e Mg, alteração na permeabilidade e fluidez da membrana plasmática, interferência em vias de sinalização, alteração da expressão de genes e mutações no DNA (KOCHIAN et al., 2015; PANDA et al., 2009; WATT, 2003). Outro problema grave gerado pelo Al^{3+} é o estresse oxidativo, causado através da peroxidação lipídica e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou da inativação de enzimas antioxidantes (AZEVEDO et al., 2011; EZAKI et al., 2000).

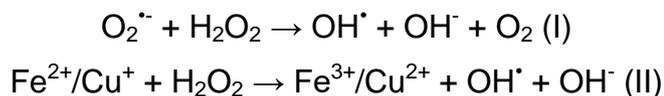
3.5.1 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) fazem parte de um grupo de substâncias com propriedades oxidativas, que têm a capacidade de obter elétrons de materiais adjacentes (XU et al., 2017). O termo 'estresse oxidativo' é definido como uma perturbação do equilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes, podendo ser originado a partir do aumento na produção EROs ou da diminuição na capacidade do organismo em remover estas moléculas prejudiciais (FOYER et al., 2017; SHARMA et al., 2017; KEHRER, 2000).

A produção de EROs é uma consequência natural de processos metabólicos como a fotossíntese e respiração celular (FOYER et al., 2017; NOCTOR et al., 2017; CERON-GARCIA et al., 2012), nos quais, durante a cadeia de transporte de elétrons, uma carga negativa pode ser redirecionada para o oxigênio molecular, dando origem ao radical superóxido.

O balanço preciso das EROs é importante para a regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, agindo como moléculas prejudiciais ou sinalizadoras, dependendo do equilíbrio entre produção e remoção destas moléculas (NOCTOR et al., 2017; ZHAO et al., 2016). Sob condições normais, sabe-se que até 2% do consumo mitocondrial de oxigênio pode dar origem a EROs, no entanto dependendo de fatores como danos físicos ou químicos a mitocôndria, disponibilidade de oxigênio e presença de xenobióticos, a produção de EROs pode aumentar muito, levando ao estresse oxidativo (KEHRER, 2000).

Os principais tipos de EROs são o oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (SHIVASHANKARA et al., 2016). Duas das EROs mais prejudiciais ao metabolismo da planta são o OH^{\cdot} e o HO_2^{\cdot} , que são altamente reativos e, por isso, não podem ser removidos pela planta, causando peroxidação lipídica e danos em proteínas, membranas e ao DNA (SHARMA et al., 2017; ZHAO et al., 2016; CERON-GARCIA et al., 2012). Ambos têm origem a partir do $\text{O}_2^{\cdot-}$, através da protonação em meios ácidos e das reações de Haber-Weiss (I) e de Fenton (II):



Assim, as plantas desenvolveram um complexo mecanismo de remoção de EROs, incluindo respostas enzimáticas (ex.: APX, CAT, GPX e SOD) e não enzimáticas (ex.: ascorbato, glutatona, carotenoides) (SHARMA et al., 2017), com a finalidade de remover as EROs ou prevenir a sua formação, defendendo macromoléculas importantes para a estrutura e funcionamento da célula, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (NOCTOR et al., 2017; CERON-GARCIA et al., 2012; BOWLER et al., 1992).

Sendo as plantas seres sésseis, estão sujeitas a diversos fatores ambientais adversos que dificultam sua sobrevivência, o que pode causar prejuízos à produtividade agrícola. Estresses abióticos como a seca, salinidade, temperaturas extremas ou metais pesados, causam a perda da

homeostase celular, resultando no estresse oxidativo (Sharma et al., 2017; SHA VALLI KHAN et al., 2014; CERON-GARCIA et al., 2012). Quando o agente estressor excede o limite homeostático do organismo, seja por intensidade ou duração da exposição, são ativados mecanismos de resposta aos níveis molecular, bioquímico, fisiológico e morfológico (ZHAO et al., 2016; SHA VALLI KHAN et al., 2014).

A capacidade da planta em detectar e reagir a uma condição abiótica estressante é um fator importante para sua sobrevivência, pois dispara cascatas de sinalização que irão ativar canais iônicos, quinases, acumulação de hormônios vegetais e produção de EROs (FOYER et al., 2017; NOCTOR et al., 2017; SHA VALLI KHAN et al., 2014). A manutenção homeostática das EROs possui um papel importante no desenvolvimento radicular sendo que, em quantidades bem definidas, agem como sinalizadoras em diversas situações, como alongação e diferenciação das células de raízes (ZHAO et al., 2016) e regulação da defesa contra patógenos (CERON-GARCIA et al., 2012). O acúmulo de EROs pode agir de, basicamente, duas maneiras: causando danos irreversíveis que levam à necrose e morte do tecido (SHA VALLI KHAN et al., 2014), ou afetando a expressão de um conjunto específico de genes que irão formar uma resposta de defesa do organismo àquele desafio (APEL; HIRT, 2004).

3.5.1.1 Estresse oxidativo causado por Al³⁺

Dentre os metais presentes nos solos, existem aqueles que são bioativos, os quais são divididos em dois grupos, de acordo suas propriedades físico-químicas: os metais redox (Cr, Cu, Mn e Fe) e os metais não-redox (Cd, Ni, Hg, Zn e Al) (BUCKER-NETO et al., 2017). O grupo dos metais redox pode gerar danos oxidativos de forma direta às plantas, através das reações de Haber-Weiss e Fenton, gerando EROs e interferindo na homeostase celular (JOZEFCAK et al., 2012). De forma indireta, os metais não-redox atuam como agentes de estresse oxidativo, através de mecanismos como depleção da glutathione, ligação a grupos sulfidrílicos de proteínas, inibindo enzimas antioxidantes ou induzindo a produção de enzimas geradoras de EROs como a NADPH oxidase (BIELEN et al., 2013).

Alguns metais agem como catalisadores na formação de EROs e induzem danos oxidativo em plantas. O Al não é um metal de transição e não pode catalisar reações de redução, no entanto ocasiona estresse oxidativo. Os íons de Al formam ligações eletrostáticas, preferencialmente com ligantes doadores de oxigênio, a pectina presente na parede celular e a superfície externa da membrana plasmática (SILVA, 2012).

O Al trivalente (Al^{3+}) é um dos principais estressores abióticos em solos ácidos (KOCHIAN et al., 2015), agindo diretamente sob o desenvolvimento radicular da planta e induzindo o estresse oxidativo, aumento da atividade de enzimas relacionadas à peroxidação lipídica e produção de EROs, oxidação de componentes celulares e morte celular (KOPITKE et al., 2016). Portanto, pode-se deduzir que a produção de EROs é um fator importante na toxidez do Al^{3+} (SHARMA et al., 2017), e não apenas uma consequência dos danos celulares causados por este íon (NUNES-NESI et al., 2014).

3.6 Mecanismos de tolerância ao Al^{3+} em plantas

Devido aos efeitos que causa nas plantas, o Al^{3+} impõe uma pressão de seleção muito forte e, com isso, diversas espécies vegetais desenvolveram mecanismos de tolerância para lidar com sua toxidez, dando origem a espécies e cultivares bem adaptados aos solos ácidos (DRUMMOND et al., 2001). Além disso, programas de melhoramento genético selecionam híbridos com base em diversas características, dentre elas a produtividade, que pode ser influenciada pelo nível de tolerância ao Al^{3+} (WATT, 2003). Assim, genes de tolerância ao Al, frequentemente encontrados em cultivares tolerantes, podem ter passado por uma fixação aleatória ou serem um produto secundário da seleção baseada em outras características agronômicas, visto que os híbridos são testados em diversas regiões de solos ácidos (WENZL et al., 2001; MCNEILLY, 1994).

A grande maioria dos estudos sobre tolerância ao Al^{3+} possui foco na exsudação de ácidos orgânicos, que é aceito como o um dos mecanismos mais importantes da tolerância ao Al^{3+} em plantas (KOCHIAN et al., 2015; MA et al., 2014), podendo ocorrer tanto interna quanto externamente às células, decorrendo da exsudação através dos ápices radiculares ou da complexação intracelular e sequestro nos vacúolos (KOCHIAN et al., 2015; MA et al., 2014).

Entretanto, outros estudos apontam que o aumento na produção de EROs devido a exposição ao Al^{3+} está associada a peroxidação lipídica de membranas (Figura 5) e consequente redução no crescimento radicular (KOCHIAN et al., 2015). Outros autores também demonstraram que a exposição ao Al^{3+} interfere na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo (WATT, 2003), como por exemplo, de enzimas antioxidantes (DRUMMOND et al., 2001).

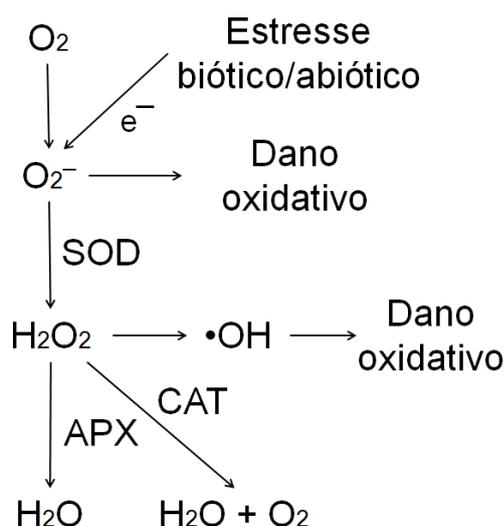


Figura 5. Esquema simplificado da geração e remoção enzimática de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas.

3.6.1 Enzimas antioxidantes

As enzimas antioxidantes atuam na remoção de EROs e sua atividade catalítica pode ser negativamente afetada por uma ou mais condições estressantes agindo sobre a planta simultaneamente, o que permite o acúmulo de EROs, tornando o estresse oxidativo um distúrbio irreversível (CERON-GARCIA et al., 2012). Existem três antioxidantes enzimáticos essenciais para a remoção de EROs, a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) (Figura 5). A primeira barreira enzimática contra EROs é a SOD, que catalisa a dismutação de duas moléculas de $\text{O}_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 . CAT e APX reduzem H_2O_2 em H_2O , sendo que a segunda utiliza o ascorbato como doador de elétrons. Desta forma, a formação do radical hidroxila através da reação entre $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 é prevenida pela ação destas três enzimas (Figura 6) (TANG et al., 2016; SHIVASHANKARA et al., 2016).

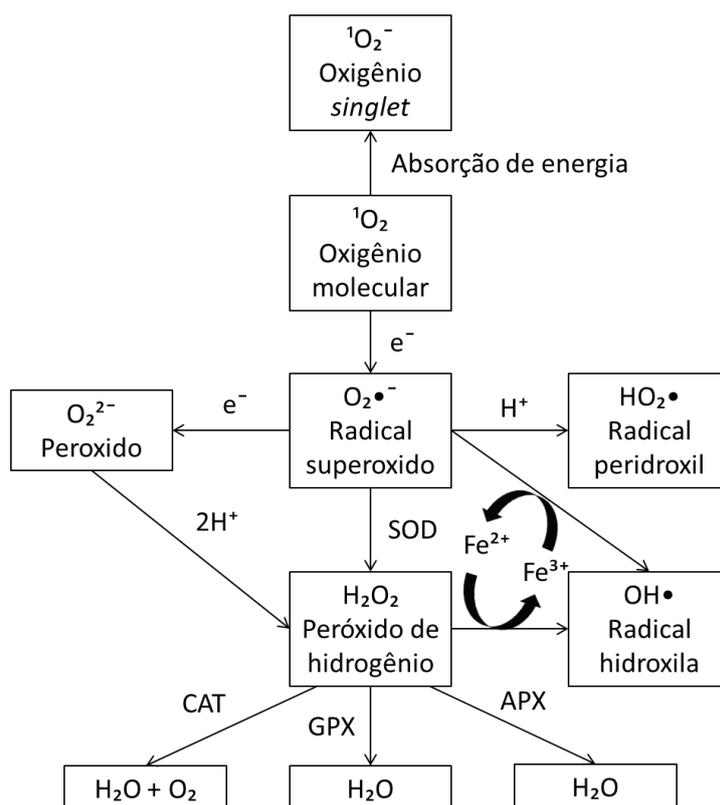


Figura 6. Esquema geral da produção e remoção enzimática de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas (SHIVASHANKARA et al., 2016).

A SOD é única em sua função, determinando a concentração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , os dois substratos para a reação de Haber-Weiss. Esta enzima ocorre em todos os organismos aeróbicos e está presente em todos os compartimentos subcelulares nos quais pode ocorrer o estresse oxidativo (BOWLER, 1992). Existem diferentes tipos de SOD, classificadas de acordo com o metal utilizado como cofator, como Fe-SOD, Mn-SOD e Cu/Zn-SOD, sendo que cada isoforma está mais presente em determinados compartimentos celulares. Fe-SOD ficam localizadas no cloroplasto, Mn-SOD estão localizadas nas mitocôndrias e peroxissomos, e Cu/Zn-SOD estão no cloroplasto, no citosol e no espaço extracelular (SHARMA et al., 2017; XU et al., 2017; ALSCHER et al., 2002). Uma forma experimental de diferenciar as isoformas de SOD é através de sua sensibilidade ao H_2O_2 ou KCN, sendo Cu/Zn-SOD sensível a ambos inibidores, Fe-SOD sensível ao H_2O_2 e Mn-SOD resistente a ambos (BOWLER, 1992). Apesar de desempenhar uma função essencial, a SOD apenas converte o $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , outra ERO que também é prejudicial e precisa ser removida (SHARMA et al., 2017). Para isso, as plantas possuem outras enzimas degradadoras de H_2O_2 , a CAT e a APX.

A CAT é uma enzima que não necessita de um agente redutor correspondente para desempenhar sua função, possuindo alta reatividade, porém baixa afinidade por H_2O_2 (ZHAO et al., 2016). CAT é a principal removedora de EROs em plantas sob estresse abiótico (NOCTOR et al., 2017; MITTLER, 2002), removendo H_2O_2 , principalmente, dos peroxissomos durante a fotorrespiração, sendo sua atividade reduzida sob condições que suprimem este processo (SHIVASHANKARA et al., 2016).

A APX utiliza ascorbato como agente redutor, participando assim do ciclo de ascorbato-glutationa. Assim como a SOD, a APX possui isoformas presentes em diferentes compartimentos da célula: uma peroxissomal, duas cloroplasmáticas e uma mitocondrial, cada uma com uma função antioxidante específica, sendo ativadas ou inibidas em resposta a diferentes sinalizações celulares, desencadeados por estresses bióticos ou abióticos (CERON-GARCIA et al., 2012). A isoforma da APX presente no citosol possui uma rápida resposta contra o H_2O_2 devido à sua localização, sendo a primeira a receber sinalizações decorrentes de estresse, prevenindo rapidamente contra danos mais graves a nível celular e tecidual (CERON-GARCIA et al., 2012).

A Tabela 1 mostra alguns exemplos de trabalhos que avaliaram a atividade antioxidante de diferentes culturas quando expostas ao AI.

Tabela 1. Publicações relacionadas à atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD) em resposta ao Al, espécies estudadas e resultado observado.

| Publicação | Espécie | Resposta antioxidante enzimática |
|-----------------------|--------------|--|
| HUANG et al., 2017 | Soja | Al aumentou a expressão de miRNAs relacionados a dois tipos de SOD e também diminuiu a expressão de miRNAs relacionados ao controle da produção de H ₂ O ₂ , levando ao estresse oxidativo |
| ZHAO et al., 2017 | Milho | Al aumentou a atividade de APX, CAT e SOD |
| ZHOU et al., 2017 | Sorgo | Al aumentou a expressão de proteínas envolvidas no sistema antioxidante na variedade tolerante em relação a sensível |
| LI et al., 2016 | Citrus | Al aumentou a atividade de APX e SOD e diminuiu de CAT em folhas |
| SHARMA et al., 2016 | Grão-de-bico | Al aumentou a atividade de CAT e SOD no cultivar tolerante. A atividade de APX não teve diferença entre o cultivar tolerante e o sensível. |
| BHOOMIKA et al., 2013 | Arroz | Al aumentou expressão de CAT e SOD na cultivar tolerante |
| QIN et al., 2010 | Cebola | Al aumentou a atividade de SOD e diminuiu CAT |
| RICHARDS et al., 1998 | Arabidopsis | Al aumentou a expressão de SOD |

3.7 Cultivo em solução nutriente

Dada a importância de identificar genótipos de cana-de-açúcar tolerantes ao Al³⁺, é necessário um método rápido e eficaz para a avaliação de um número elevado de plantas. Para isto, diferentes métodos têm sido aplicados, como cultivos a campo, em casa de vegetação utilizando o solo em condições controladas, ou em hidroponia com soluções nutrientes. O solo possui a vantagem de simular condições mais próximas da realidade, e os dados finais refletem a interação dos diferentes fatores existentes a campo. Entretanto, tais experimentos demandam um maior período de tempo, maior investimento, sofrem efeitos da baixa homogeneidade da composição do solo e, mesmo nos experimentos conduzidos com solos em condições controladas, o substrato sólido dificulta a visualização do sistema radicular, sítio primário da ação tóxica do Al³⁺ nas plantas (ECHART et al., 2001).

Por outro lado, experimentos em hidroponia possibilitam controle sobre o pH e a atividade do Al³⁺ em solução, podendo ser utilizada, durante o período

de exposição, uma solução nutriente simples contendo apenas Ca e Al, eliminando o viés da complexação do Al com P ou Fe (KOPITKKE; BLAMEY, 2016; CANIATO et al., 2014; KÖPP et al., 2012; WATT, 2003), por exemplo. O cultivo hidropônico permite acompanhar e mensurar o desenvolvimento das raízes ao longo do tempo, permitindo fácil acesso para o experimentador e reduzindo as injúrias decorrentes da manipulação do sistema radicular.

Em plantas, existe uma grande variação nos níveis de tolerância ao Al^{3+} , tanto entre espécies quanto de maneira intraespecífica. Trabalhos anteriores mostram que a atividade de Al^{3+} em solução nutriente necessária para inibir em 50% o crescimento radicular varia, sendo 75-200 μM para alguns cultivares tolerantes de arroz (*Oryza sativa*) e 20-50 μM para cultivares sensíveis, 15-20 μM para o milho (*Zea mays*), 5 μM para o trigo (*Triticum aestivum*) e 10 μM para o sorgo (*Sorghum bicolor*) (KOPITKKE et al., 2016; WU et al., 2014; FAMOSO et al., 2010). Da mesma forma, o germoplasma da cana-de-açúcar apresenta uma grande diversidade de níveis de tolerância ao Al^{3+} (LANDELL, 1989). Os danos ao sistema radicular, causados por Al^{3+} , também variam de acordo com o tempo de exposição, sendo que uma redução inicial nas taxas de alongamento radicular pode ser detectada em poucos minutos, chegando a até 90% dentro de 48h. Portanto, o tempo de exposição também é um importante parâmetro a ser avaliado em experimentos de toxidez por Al^{3+} (KOPITKKE et al., 2016).

3.8 Medidas de avaliação de raízes em resposta a toxidez do Al^{3+}

A toxidez do Al^{3+} pode ser avaliada através da comparação do comprimento ou peso das raízes ou parte aérea de plantas expostas com o de plantas em grupos controle, não expostas ao Al^{3+} (KÖPP et al., 2012). A forma de avaliação mais utilizada, entretanto, é a análise do crescimento radicular após exposição ao Al^{3+} em hidroponia, pois se trata de um experimento de condução mais simples e a medida reflete de forma confiável o nível de tolerância da planta, pois tem foco no principal sintoma causado por este metal. Existem diferentes medidas de crescimento radicular utilizadas para entender a interação das plantas com o Al^{3+} (Tabela 2).

Tabela 2. Exemplos de medidas radiculares utilizadas para avaliar e comparar a tolerância ao Al^{3+} entre genótipos ou espécies.

| Medida | Espécie | Trabalho |
|--|------------------------|---------------------------------------|
| ${}^1RR = *CRM$ abaixo do corante | Aveia | LOSKUTOV et al., 2016 |
| ${}^2CRR = *CRM_{\text{alumínio}}/*CRM_{\text{controle}}$ | Arroz e outros cereais | FAMOSO et al., 2011, 2010 |
| ${}^3IRCR = 1 - (*CRM_{\text{alumínio}}/*CRM_{\text{controle}})$ | Cana | WATT, 2003 |
| ${}^4CRL = (*CRM_{\text{final}} - *CRM_{\text{inicial}})$ | Milho | MARTINS et al., 1999 |
| ${}^5CRR = {}^4CRL/*CRM_{\text{inicial}}$ | Milho | MARTINS et al., 1999; MAGNAVACA, 1982 |
| ${}^6TAR = {}^4CRL/n^{\circ}$ dias | Cana-de-açúcar | OLIVEIRA, 2012 |

*CRM (Comprimento Radicular Médio) = \sum Comprimento raízes/n^o raízes medidas; 1RR = Recrescimento Radicular; 2CRR = Crescimento Radicular Relativo (em relação ao controle); 3IRCR = Inibição Relativa do Crescimento Radicular; 4CRL = Crescimento Radicular Líquido; 5CRR = Crescimento Radicular Relativo (em relação ao comprimento inicial); 6TAR = Taxa de Alongamento Radicular.

Para a maioria das espécies estudadas, como milho, trigo, soja ou sorgo, pode-se distinguir facilmente uma raiz seminal principal e acompanhá-la para medir os efeitos da toxidez do Al^{3+} sobre o desenvolvimento radicular da planta (MARIANO et al., 2015; CANIATO et al., 2007), algo dificilmente exequível para a cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar apresenta um sistema radicular fasciculado bastante complexo, que não permite definir uma raiz principal. Sendo assim, para medir os efeitos de toxidez do Al^{3+} , faz-se uma média do comprimento de três raízes metabolicamente ativas, que são aquelas emitidas a partir da base do perfilho (RPs), e que sustentam a nutrição e desenvolvimento da planta após um período de estabelecimento inicial (SMITH et al., 2005; VAN DILLEWEJN, 1952).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Com base no painel brasileiro de diversidade (GARCIA et al., 2013), foram selecionados onze cultivares de cana-de-açúcar para o presente estudo: IAC66-6, RB835486, RB855156, RB855453, RB855536, RB867515, RB92579, RB928064, RB935744, RB985476 e SP80-3280. O material vegetal foi fornecido pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (PMGCA), ligado à Rede Interinstitucional para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA). Os cultivares selecionados são recomendados para ambientes de produção diversos (Tabela 3), segundo classificação proposta por Landell et al. (2003), a qual leva em consideração, dentre outros fatores, a disponibilidade de alumínio do solo. O projeto foi executado no Laboratório de Biotecnologia de Plantas do Centro de Ciências Agrárias, localizado no *campus* de Araras/SP da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). A Figura 7 ilustra, de maneira geral, como foram feitos os experimentos.

Tabela 3. Cultivares de cana-de-açúcar utilizados durante os experimentos em cultivo hidropônico, seus genitores e exigência em ambientes de produção.

| Cultivar | Genitores | Exigência (Ambientes de produção) |
|------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| IAC66-6 ^{n/d} | (Co419 x Co356) | n/d |
| RB835486 ¹ | (L60-14 x ?) | Baixa/Média (B, C e D) |
| RB855156 ¹ | (RB72454 x TUC71-7) | Baixa/Média (B, C e D) |
| RB855453 ¹ | (TUC71-7 x ?) | Alta (A e B) |
| RB855536 ¹ | (SP70-1143 x RB72454) | Alta (A e B) |
| RB867515 ¹ | (RB72454 x ?) | Baixa (C, D e E) |
| RB92579 ² | (RB75126 x RB72199) | Baixa/Média (A, B e C) |
| RB928064 ¹ | (SP70-1143 x ?) | Média/Alta (A e B) |
| RB935744 ¹ | (RB835089 x RB765418) | Média (B, C e D) |
| RB985476 ³ | (H53-3989 x RB855206) | Média (A, B, C e D) |
| SP80-3280 ⁴ | (SP71-1088 x H57-5028) | Média/Alta (A, B e C) |

n/d = Não disponível. Referências: ¹VARIEDADES... (2008); ²LANÇAMENTO...(2005); ³LIBERAÇÃO... (2015); ⁴MARIN (2007).

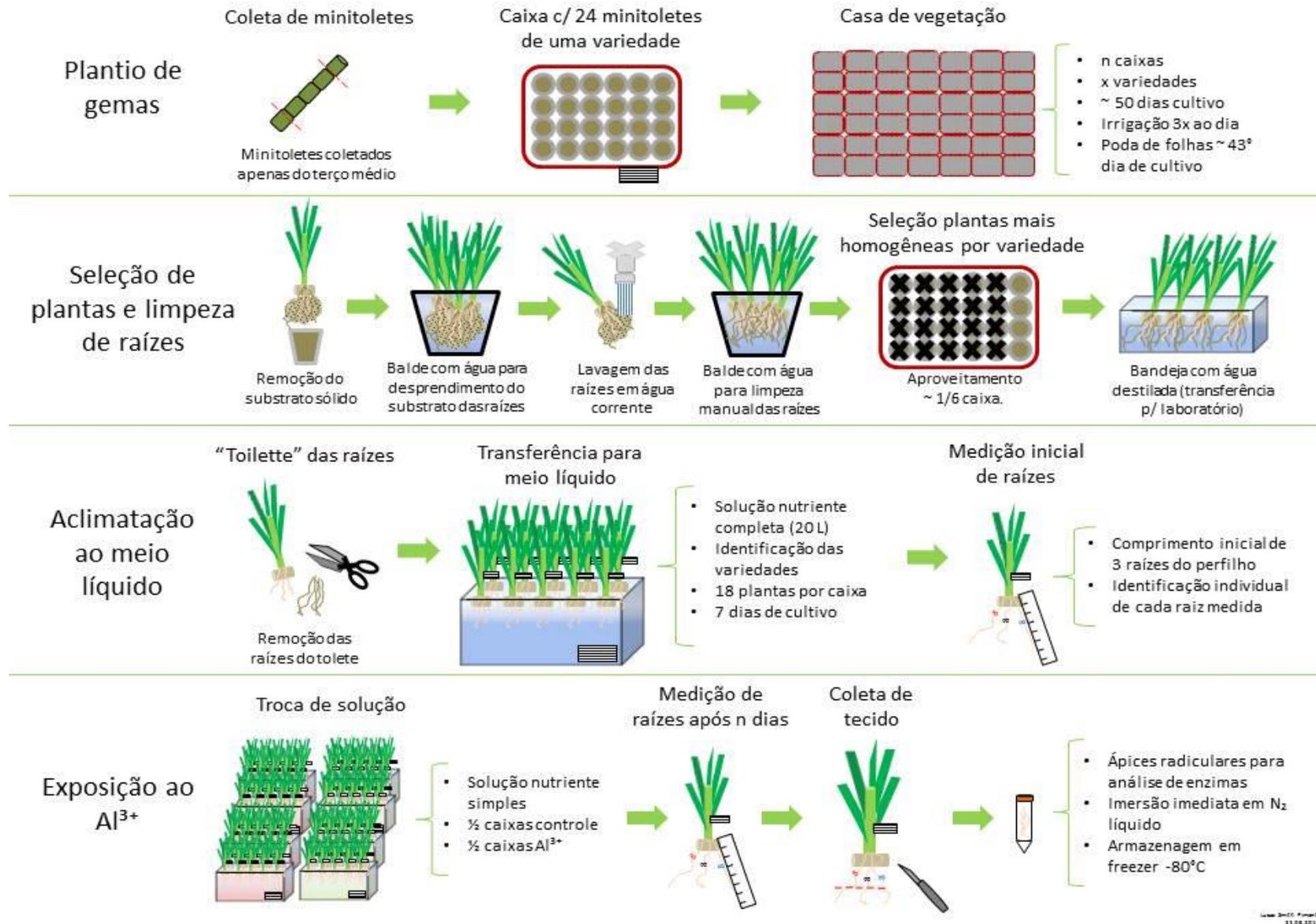


Figura 7. Visão geral dos experimentos em cultivo hidropônico para avaliação de tolerância ao Al^{3+} de cultivares de cana-de-açúcar.

4.1 Material vegetal

Segmentos do colmo com aproximadamente 4,5 cm, contendo um entrenó e uma gema axilar intacta, denominados *minitoletes*, foram coletados a partir do terço mediano do colmo de plantas de cana-de-açúcar cultivadas a campo (OLORIZ et al., 2012; WATT, 2003). Estes minitoletes foram colocados para germinar, individualmente, em copos plásticos de 180 mL de volume, preenchidos com substrato sólido Plantmax[®]. Bandejas contendo os copos com os minitoletes foram dispostas em casa de vegetação para brotação das gemas e crescimento das plantas (Figura 7). O sistema de controle de temperatura foi ajustado para mantê-la a 32°C e o sistema de irrigação automático programado para acioná-la três vezes ao dia, durante 30 minutos às 7h da manhã e por 15 minutos às 12h e 17h. O cultivo em substrato sólido ocorreu por, aproximadamente, 50 dias, quando foi verificado que todos cultivares haviam emitido raízes do perfilho (RPs).

4.2 Cultivo em hidroponia e soluções nutrientes

Aproximadamente 50 dias após o plantio, as plantas foram removidas do substrato sólido e tiveram suas raízes limpas com água. Em seguida, foi realizada uma seleção visual baseada na homogeneidade do sistema radicular e parte aérea entre plantas do mesmo cultivar. As plantas selecionadas desta forma foram identificadas e utilizadas nos experimentos em hidroponia (Figura 7). Os recipientes utilizados durante os experimentos em hidroponia foram caixas plásticas, padrão Marfinite[®] (22,5 x 35 x 50 cm), com volume de 26L, de cor preta e opaca, para evitar a incidência de luz sobre as raízes durante os experimentos. As plantas foram distribuídas em grupos homogêneos entre as caixas, sendo inseridas em suportes de isopor com espessura de 30 mm, dimensionados na mesma medida da abertura superior da caixa, permitindo total contato das raízes com a solução nutriente.

As soluções nutrientes foram preparadas diretamente nas caixas, adicionando os devidos volumes das soluções estoque e completando para 20L com água destilada e, em seguida, acidificando com solução HCl 10 M para atingir o pH de 4,0 ± 0,1 (Figura 8).

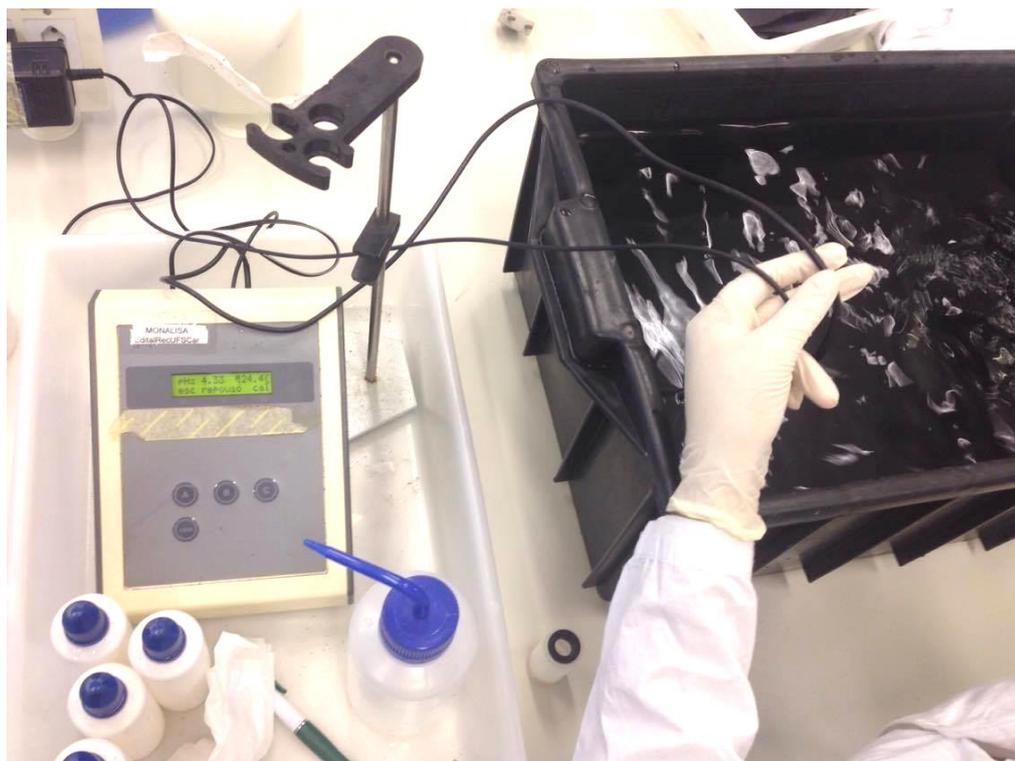


Figura 8. Preparo e acidificação das soluções nutriente (completa ou simples), utilizadas durante os experimentos de cultivo hidropônico dos cultivares de cana-de-açúcar (MARIANO et al., 2015 (modificado); HOAGLAND; ARNON, 1950)

As caixas foram dispostas em mesas de um ambiente da casa de vegetação, onde a temperatura foi regulada para 32°C (Figura 9). A solução nas caixas foi agitada/aerada continuamente através de mangueiras acopladas a uma bomba pneumática sem óleo, com acionamento controlado por temporizador, desligando o equipamento durante 15 minutos a cada 3 horas de funcionamento, a fim de evitar o aquecimento excessivo. O pH e temperatura das soluções nutriente foram monitorados três vezes ao dia com pHmetro digital (W3B, Bel Engineering®, Piracicaba-SP, Brasil) (Figura 8), sendo o pH controlado em $4,0 \pm 0,1$, conforme necessário, utilizando soluções de HCl 1,0 M ou NaOH 1,0 M (KÖPP et al., 2012). As soluções nutrientes foram trocadas após sete dias no Experimento I.



Figura 9. Sistema de cultivo hidropônico instalado em casa de vegetação em experimentos de avaliação da tolerância ao Al^{3+} em cana-de-açúcar.

4.2.1 Aclimação a hidroponia – Solução nutriente completa

Antes da transferência para o cultivo hidropônico, as plantas passaram pelo procedimento denominado *toilette*, tendo suas raízes do tolete removidas com o auxílio de uma tesoura. No período de aclimação a hidroponia foi utilizada solução nutriente completa durante sete dias. A solução nutriente completa foi composta por macronutrientes conforme proposto por Mariano et al. (2015) com modificações, e de micronutrientes conforme o coquetel clássico proposto por Hoagland e Arnon (1950) (Tabela 4).

Tabela 4. Composição da solução nutriente completa, em macro e micronutrientes, utilizada para aclimação das plantas de cana-de-açúcar durante os experimentos em hidroponia (MARIANO et al., 2015 (modificado); HOAGLAND; ARNON, 1950).

| Nutriente | Concentração (mg.L ⁻¹) | Reagente utilizado |
|-----------|------------------------------------|---|
| N | 140 | NH ₄ NO ₃ |
| P | 31 | NaH ₂ PO ₄ |
| K | 98 | KCl |
| Ca | 60 | CaCl ₂ |
| Mg | 15 | MgSO ₄ |
| S | 20 | MgSO ₄ |
| B | 0,5 | H ₃ BO ₃ |
| Cu | 0,02 | CuSO ₄ .5H ₂ O |
| Fe | 5,0 | Fe-EDTA |
| Mn | 0,5 | MnSO ₄ |
| Mo | 0,01 | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O |
| Zn | 0,05 | ZnSO ₄ .7H ₂ O |

4.2.2 Exposição ao Al³⁺ - Solução nutriente simples

Para o período de exposição ao Al³⁺ foi utilizada solução nutriente simples, composta apenas por cálcio (Ca²⁺) e alumínio (Al³⁺), evitando desta forma a complexação do Al³⁺ com outras moléculas e permitindo maior controle sobre a atividade desta forma iônica na solução (KÖPP et al., 2012; WATT, 2003). O Ca²⁺ foi disponibilizado a uma concentração constante de 1000 µM através de CaCl₂ (KOPITTKKE; BLAMEY, 2016; WATT, 2003), e o Al³⁺ foi fornecido através de AlCl₃.6H₂O em doses variadas, conforme o experimento realizado. O pH das soluções nutriente simples foi rigorosamente monitorado três vezes ao dia (Figura 9) e regulado para 4,0 ± 0,1 sempre que necessário, através da adição de soluções 1M de HCl ou NaOH, garantindo a prevalência da espécie livre Al(H₂O)₆³⁺ (Al³⁺) (KOPITTKKE; BLAMEY, 2016; ROSSIELLO; JACOB NETTO, 2006).

4.3 Medição do comprimento radicular médio (CRM)

O desenvolvimento radicular foi acompanhado ao longo dos períodos de exposição através da medição do comprimento radicular médio (CRM) das plantas (HEIDARABADI et al., 2011; MARON et al., 2008) (Figura 10). Para cada planta, três raízes do perfilho foram marcadas e medidas da base do perfilho até o ápice, utilizando uma régua comum (cm). O CRM serviu de base para calcular os parâmetros de desenvolvimento radicular, utilizados ao longo dos experimentos (Tabela 2).

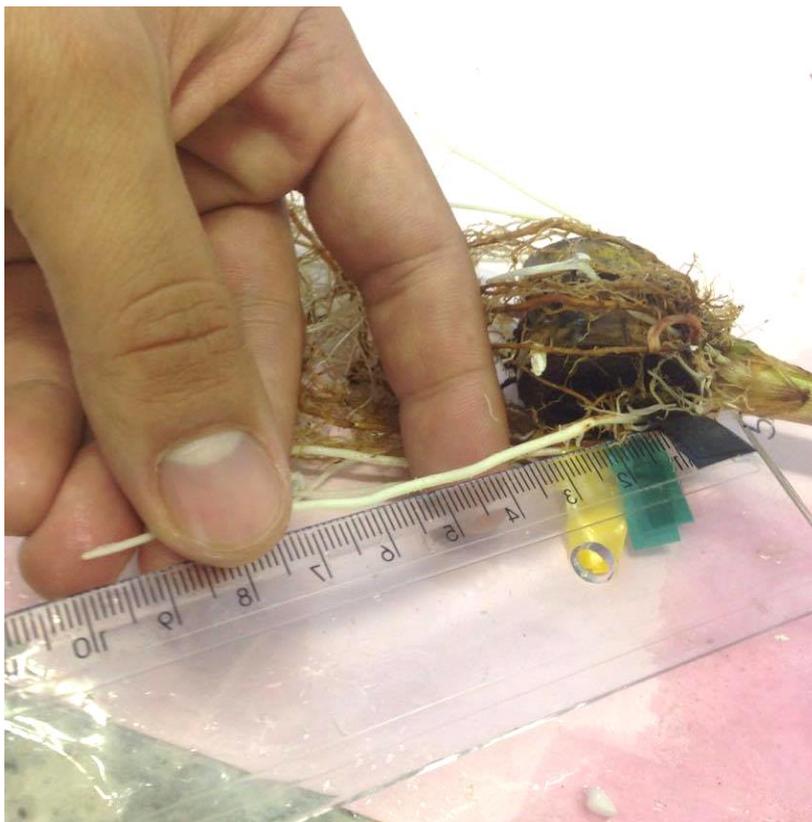


Figura 10. Medição das raízes para obtenção do comprimento radicular médio (CRM = $\frac{\sum \text{Comprimento raízes}}{n^\circ \text{ raízes medidas}}$) das plantas de cana-de-açúcar, utilizando uma régua (cm).

4.4 Experimentos em hidroponia para avaliação da tolerância ao Al^{3+} dos cultivares de cana-de-açúcar

4.4.1 Experimento I: Determinação do tempo de exposição e dose de Al^{3+} para avaliação da tolerância em cultivares de cana-de-açúcar

O objetivo deste experimento foi determinar os parâmetros atividade de Al^{3+} e tempo de exposição em hidroponia, utilizando solução nutriente simples, para avaliação dos cultivares de cana-de-açúcar quanto à tolerância ao Al^{3+} . Estes parâmetros foram utilizados em etapas posteriores do projeto, envolvendo um número maior de cultivares. O experimento consistiu de um fatorial $2 \times 6 \times 3$, seguindo delineamento de parcelas sub-subdivididas, com duas repetições. Foram avaliadas seis doses de Al (0, 150, 300, 700, 1500 e 3000 μM), correspondendo às atividades de (0, 77, 143, 293, 503 e 643 $\mu\text{M Al}^{3+}$), respectivamente, considerando-se a adição de 1000 μM de CaCl_2 . Os cálculos de atividade do Al^{3+} foram feitos através da equação de Debye e Hückel (1923), utilizando o software WinIAP (HEPPERLE, 2016).

Foram utilizados os cultivares RB835486 e SP80-3280, sendo selecionadas 12 plantas de cada cultivar, conforme o item 4.2, as quais foram submetidas ao período de aclimação descrito no item 4.2.1. Neste experimento, excepcionalmente, os recipientes utilizados para o período de exposição ao Al^{3+} foram 12 vasos pretos e opacos, com volume de 1,7L. Cada um dos 12 vasos recebeu 1,5L de solução nutriente simples com determinada dose de Al (parcela). Em cada vaso foi colocada uma planta (subparcela) de cada cultivar, as quais foram avaliadas em três períodos de tempo (sub-subparcela) (Figura 11).



Figura 11. Sistema de cultivo hidropônico de cultivares de cana-de-açúcar, instalado em casa de vegetação durante o Experimento I.

O CRM das plantas foi medido em quatro momentos (D0, D3, D7 e D14), relativo ao número de dias de exposição ao Al^{3+} . Assim, foram avaliados, o tempo mínimo de exposição e a dose de Al^{3+} necessários para diferenciar as cultivares em sensível ou tolerante ao Al, baseado nas médias de TAR (Tabela 2) dos cultivares.

4.4.2 Experimento II: Avaliação de nove cultivares de cana-de-açúcar quanto à tolerância ao Al^{3+}

O objetivo deste experimento foi determinar, dentre nove cultivares de cana-de-açúcar, dois significativamente contrastantes para a tolerância ao Al. Para fins de análise estatística considerou-se que cada combinação entre os fatores cultivar e

{Al³⁺} representou um tratamento, totalizando desta forma dezoito tratamentos, com seis repetições cada.

Neste experimento foram comparados nove cultivares de cana-de-açúcar: RB855536, RB855156, RB855453, RB867515, RB92579, RB928064, RB935744, RB985476 e IAC66-6. Com base nos critérios descritos no item 4.2, foram selecionadas 12 plantas de cada cultivar, as quais foram distribuídas em grupos homogêneos entre seis caixas. Cada caixa recebeu duas plantas de cada cultivar, totalizando 18 plantas por caixa. As plantas foram aclimatadas à hidroponia segundo descrito no item 4.2.1. Após o período de aclimação, as plantas foram submetidas ao tratamento determinado no Experimento I (item 4.4.1), em relação à atividade de Al³⁺ e tempo de exposição. O CRM foi medido ao início e final do período de exposição ao Al³⁺, conforme determinado no Experimento I (item 4.4.1), sendo utilizado para cálculo da TAR das plantas.

4.4.3 Experimento III: Comparação entre dois cultivares contrastantes para tolerância ao Al³⁺

O objetivo deste experimento foi comparar dois cultivares de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância ao Al³⁺, através da TAR. O experimento seguiu delineamento de parcelas subdivididas, com quatro repetições, sendo cada caixa correspondente a uma parcela e cada planta a uma subparcela.

Neste experimento foram comparados os dois cultivares determinados no Experimento II (item 4.4.2), sendo selecionadas 32 plantas de cada cultivar, conforme o item 4.2. A partir deste experimento, passaram a serem adotados dois procedimentos para aumentar a assertividade da medição de raízes, visando reduzir os coeficientes de variação (CV). O primeiro foi o processo denominado *toilette* de raízes, no qual foram removidas as raízes do minitolete com auxílio de uma tesoura, mantendo apenas as raízes do perfilho (Figura 12-A), e o segundo foi marcar as raízes a serem medidas com uma linha colorida, gentilmente amarrada à base da raiz para não ocasionar lesões (Figura 12-B), de forma a medir sempre as mesmas raízes ao início e final do período de exposição ao Al.

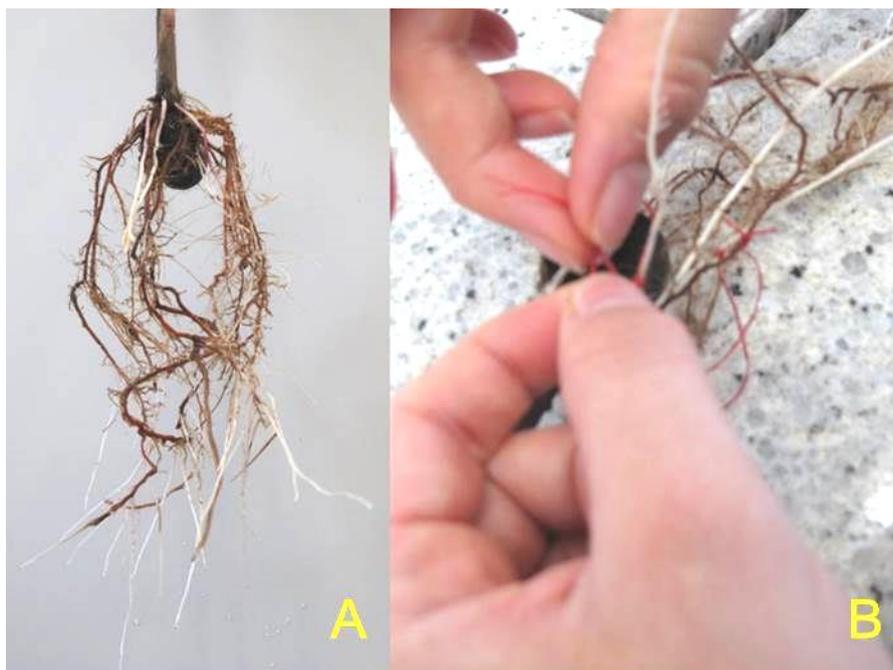


Figura 12. A) Planta de cana-de-açúcar após o toilette, e B) marcação, com linha colorida, de três raízes do perfilho selecionadas.

As plantas foram distribuídas em grupos homogêneos entre as caixas. Cada caixa recebeu quatro plantas de cada cultivar, totalizando oito plantas por caixa. As plantas foram submetidas à aclimação conforme descrito no item 4.2.1 e, a seguir, ao tratamento determinado no Experimento I (item 4.4.1). O CRM das plantas foi medido ao início e final do período de exposição, conforme determinado no Experimento I (item 4.4.1). Ao final do experimento os ápices radiculares de cada planta foram coletados individualmente em tubos criogênicos, sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posterior análise de atividade de enzimas antioxidantes.

4.4.4 Experimento IV: Comparação entre nove cultivares de cana-de-açúcar e avaliação da atividade de enzimas antioxidantes para tolerância ao Al^{3+}

Nestes experimentos foram utilizados nove cultivares de cana-de-açúcar: RB835486, RB855156, RB855453, RB855536, RB867515, RB92579, RB928064, RB985476 e SP80-3280. Os experimentos seguiram delineamento de blocos casualizados, com cinco repetições, sendo cada caixa correspondente a um bloco e cada planta a uma parcela.

Para o cultivo hidropônico foram selecionadas 20 plantas de cada cultivar, conforme descrito no item 4.2, sendo submetidas aos procedimentos adotados no Experimento III (item 4.4.3). A marcação das raízes com linhas coloridas foi

substituída por fitas adesivas com cores diferentes, reduzindo o risco de danificar as raízes.

As plantas foram distribuídas, em grupos homogêneos, entre dez caixas. Cada caixa recebeu duas plantas de cada um dos nove cultivares, totalizando 18 plantas por caixa. As plantas foram aclimatadas à hidroponia segundo descrito no item 4.2.1. Ao término do período de aclimação, as dez caixas foram divididas igualmente entre dois experimentos: experimento em condição $143 \mu\text{M } \{\text{Al}^{3+}\}$ e experimento em condição $0 \mu\text{M } \{\text{Al}^{3+}\}$. Em ambos os experimentos, a solução nutriente completa foi substituída por um volume igual de solução nutriente simples, sendo que no experimento em condição $143 \mu\text{M } \{\text{Al}^{3+}\}$ foi adicionada uma dose de Al conforme determinado no Experimento I (item 4.4.1).

O CRM das plantas foi medido ao início e final do período de exposição, conforme determinado no Experimento I (item 4.4.1). A TAR foi substituída pelo CRR (Tabela 2) como parâmetro para o desenvolvimento radicular, de forma a amenizar o efeito das diferenças de comprimento inicial das raízes sobre o CV dos experimentos. Ao final do experimento os ápices radiculares (Figura 13) de cada planta foram coletados individualmente em tubos criogênicos, sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para posterior análise de atividade de enzimas antioxidantes.

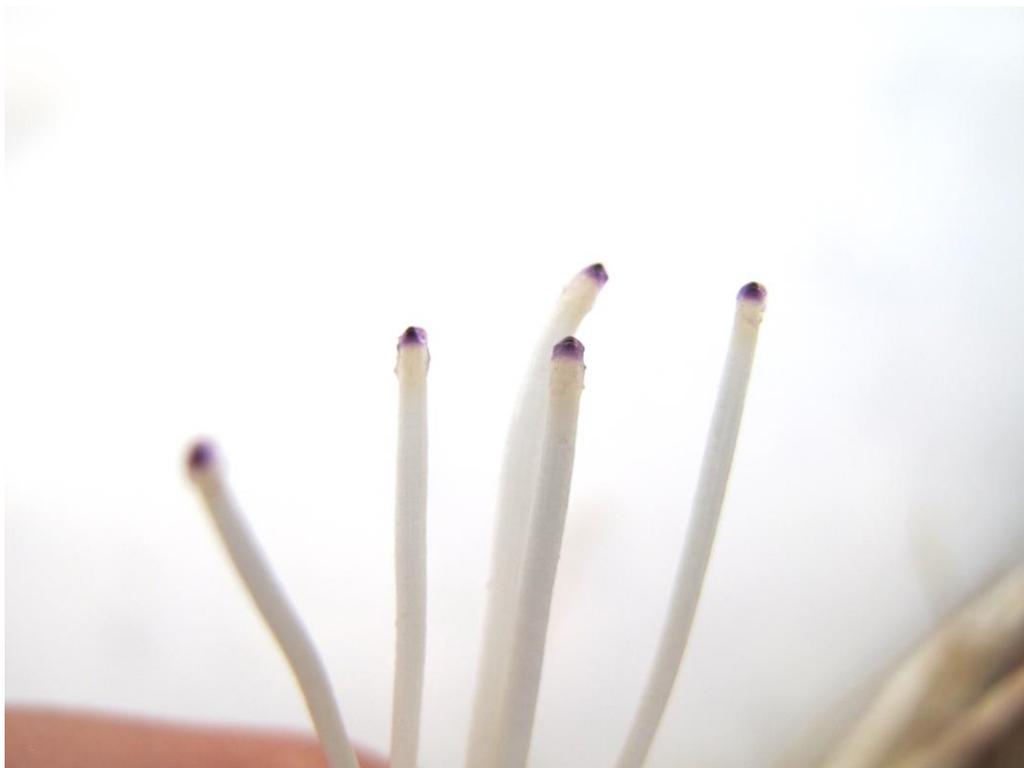


Figura 13. Ápices radiculares de cana-de-açúcar coletados após cultivo hidropônico em solução nutritive simples na presença do Al^{3+} .

4.4.4.1 Extração de proteínas solúveis totais (PST)

A extração das proteínas solúveis totais (PST) foi feita de acordo com Azevedo et al. (1998). O material vegetal foi pesado (~1,0 g) e colocado em um cadinho gelado, sendo macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida adicionou-se 4% ($g\ g^{-1}$ tecido) de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e tampão de extração, na proporção de 2:1 ($mL\ g^{-1}$ tecido), composto por EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético) 1 mM, DTT (ditiotretitol) 3 mM e tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5). O homogeneizado foi centrifugado a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi coletado e dividido em quatro alíquotas de 200 μl cada, sendo congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior quantificação de PST e atividade de enzimas antioxidantes.

4.4.4.2 Quantificação de proteínas solúveis totais (PST)

A quantificação de proteínas solúveis totais (PST) foi feita de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. A amostra foi diluída três vezes em tampão fosfato de potássio (pH 7,5), sendo adicionado 1

mL de corante (Biorad®) em 20 µl de amostra, para a leitura de absorbância, feita em espectrofotômetro a 595 nm.

4.4.4.3 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) foi determinada como descrito por Moldes et al. (2008). A reação foi preparada com a adição de 25 µl de amostra a uma cubeta de quartzo, em seguida adiciona-se 875 µl de um mix (mantido em banho-maria a 30°C) composto por 675 µl de tampão fosfato de potássio 80 mM, 100 µl de ascorbato 5 mM e 100 µl de EDTA 1 mM, e a reação foi iniciada com a adição de 100 µl de H₂O₂ 1mM, totalizando 1 mL de reação.

A leitura, feita em espectrofotômetro a 290 nm, foi iniciada imediatamente após a adição do H₂O₂ ao meio de reação, o qual foi monitorado durante 1 minuto, em intervalos de 10s. Os valores de atividade são expressos em nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

4.4.4.4 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada segundo Kraus et al. (1995), com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998). O ensaio foi realizado a 25°C, utilizando cubetas de quartzo. A reação é iniciada pela adição de 25 µl de amostra a 1 mL de um mix, composto por 10 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 µl de H₂O₂ (reagente concentrado a 30%). O branco é feito da mesma forma, substituindo-se o extrato proteico da amostra por 25 µl de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5).

A atividade foi determinada em espectrofotômetro, monitorando a degradação do H₂O₂ a 240 nm durante 1 minuto, em intervalos de 10 segundos entre cada leitura. Os resultados são expressos em µmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína.

4.4.4.5 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada segundo Giannopolitis e Ries (1977) e Cembrowska-Lech et al. (2015). A reação foi conduzida em tubos de ensaio, colocados em uma câmara de reação (caixa), sob iluminação de lâmpada fluorescente, a 25°C. Foram adicionados 15 µl de amostra a um meio de reação composto por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, NBT (*nitro blue tetrazolium*) 63 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 1,3 µM, totalizando 1,5 mL de reação.

Neste ensaio foram utilizados dois brancos, seguindo a mesma reação, excluindo-se o extrato proteico. O branco do escuro permaneceu fora da caixa, tampado com papel alumínio, para que não recebesse luz, e o branco do claro foi colocado na caixa junto das amostras.

Os tubos foram colocados no interior da caixa, isolados de qualquer luz exterior. Em seguida, a luz no interior da caixa foi acesa e mantida por 5 minutos, tempo no qual é formado o composto *blue* formazana, através da fotorredução do NBT. Após o tempo de exposição à luz, a medida foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados são expressos em U SOD.mg⁻¹ proteína, sendo que 1 unidade de SOD equivale à concentração de enzima necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT para formazana.

4.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas no software R (R Development Core Team, 2011), considerando o delineamento e número de repetições citados para cada experimento. Os parâmetros de desenvolvimento radicular (TAR ou CRR) e de atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando apropriado, foi realizado o teste de médias Scott-Knott ($p \leq 0,05$). No Experimento IV (item 4.4.4), foram calculadas as correlações de Pearson entre os dados de crescimento radicular relativo (CRR) e de atividade de cada enzima antioxidante (APX, CAT e SOD).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do material vegetal

A variação fenotípica do sistema radicular entre variedades de uma mesma espécie é um fenômeno relatado por diversos autores (KOPITTKE et al., 2016; MA et al., 2014; WU et al., 2014; FAMOSO et al., 2010), inclusive para a cana-de-açúcar (SMITH et al., 2005; LANDELL, 1989). Em cana-de-açúcar, as mudas são obtidas via propagação vegetativa, assim, a reserva nutricional inicial de cada minitolete pode ser influenciada por fatores como genótipo, idade da planta e porção do colmo utilizada no plantio (MUHAMMAD et al., 2016; MARTINS et al., 1999). Estes fatores influenciam no vigor inicial das plantas e nas diferenças fenotípicas observadas entre e dentro de variedades (SMITH et al., 2005; MARTINS et al., 1999). Nos experimentos conduzidos durante este trabalho estes fatores foram controlados, tendo sido colhidas plantas com a mesma idade a campo, das quais foram utilizados apenas segmentos do terço mediano dos colmos na produção dos minitoletes, que por sua vez tiveram um tamanho padronizado em 4,5 cm. As variedades de cana-de-açúcar utilizadas nos experimentos apresentaram diferenças nítidas entre o número de raízes dos perfilhos e o comprimento das mesmas (Figura 14), no entanto, considerando as precauções tomadas durante os experimentos, estas diferenças podem ser atribuídas com segurança ao fator genótipo.

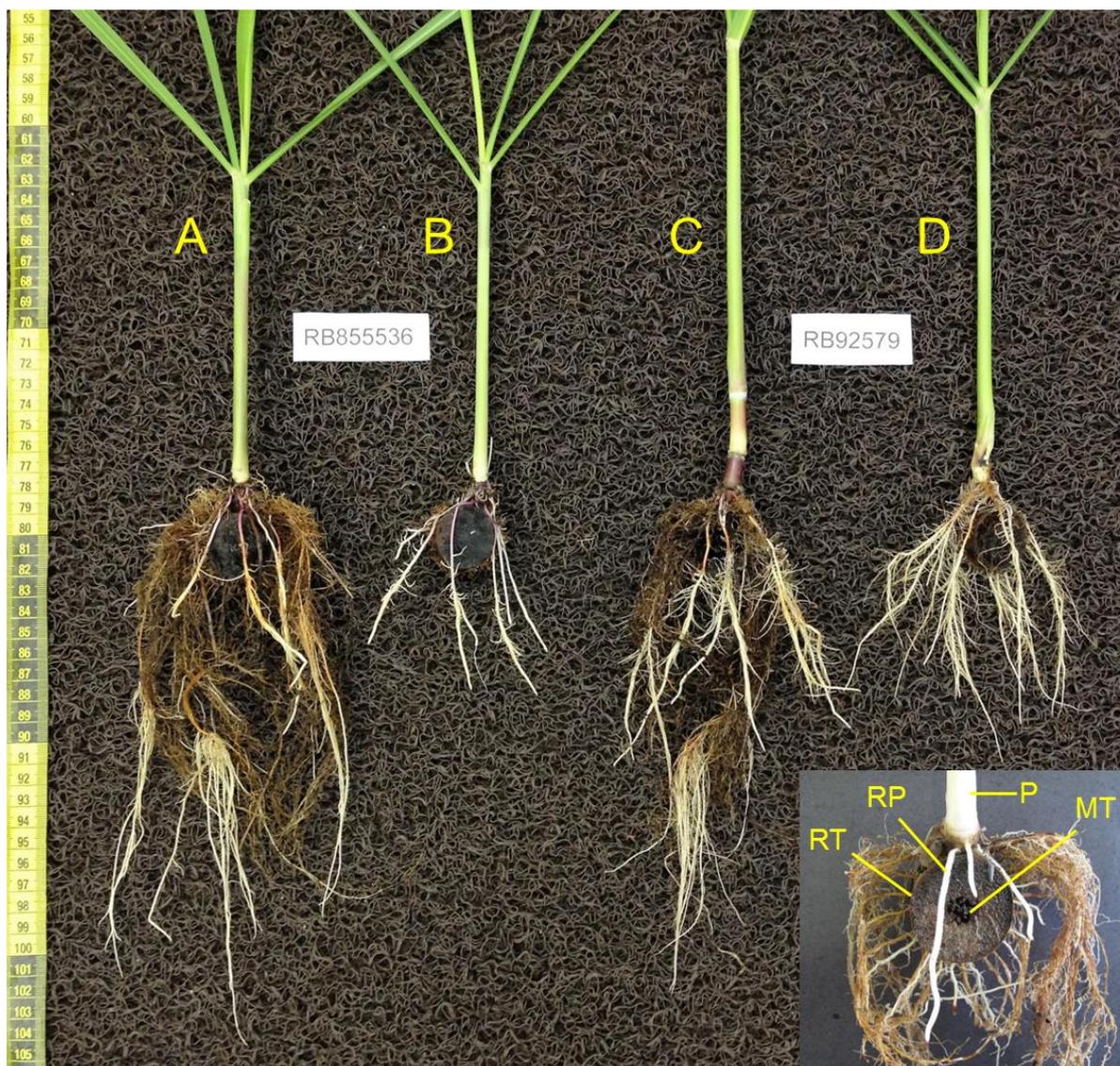


Figura 14. Sistema radicular de plantas de cana-de-açúcar cultivadas durante sete dias em hidroponia com solução nutriente completa. Estrutura do minitolete: P = perfilho; RP = raiz do perfilho; MT = minitolete e RT = raiz do minitolete. A – RB855536; B – RB855536 submetida ao toilette; C – RB92579; D – RB92579 submetida ao toilette.

Uma parte da variação dos experimentos (CV) pode ser atribuída a grande diferença do comprimento das raízes do perfilho em decorrência dos cultivares de cana-de-açúcar (Figura 14), podendo ser resultante de um componente genético. Também foi observada uma variação do comprimento de raízes de plantas do mesmo cultivar, mesmo sendo realizada a seleção de plantas com maior uniformidade. Uma possível explicação pode ser a reserva de nutrientes do minitoletes que pode influenciar diretamente do desenvolvimento do perfilho (MUHAMMAD et al., 2016; MARTINS et al., 1999).

5.2 Cultivo hidropônico e soluções nutriente

O sistema hidropônico e a solução nutriente completa (Tabela 4), propostos neste trabalho, permitiram a obtenção de plantas saudáveis e aclimatadas à hidroponia para a realização dos experimentos. A composição das soluções nutriente simples e a duração dos experimentos permitiram o fornecimento adequado de cálcio para a manutenção do desenvolvimento radicular normal, evitando que os resultados observados fossem decorrentes da privação deste elemento.

5.3 Experimentos em hidroponia para avaliação da tolerância ao Al^{3+} dos cultivares de cana-de-açúcar

5.3.1 Experimento I: Determinação do tempo de exposição e dose de Al^{3+} para avaliação da tolerância em cultivares de cana-de-açúcar

Os resultados do Experimento I, que foi utilizado para a determinação dos parâmetros experimentais do cultivo hidropônico foram sumarizados na Tabela 5. Foi realizado o teste *nested* Scott-Knott ($p \leq 0,05$) para as médias de TAR dos cultivares RB835486 e SP80-3280, expostos a concentrações crescentes de Al, em diferentes períodos de exposição. Também foram verificados valores negativos de TAR sugerindo que ocorreu a quebra de raízes durante o experimento, gerando um valor de CRM_{final} menor que o $CRM_{inicial}$.

Tabela 5. Taxa de Alongamento Radicular (TAR) ($cm \cdot dia^{-1}$) dos cultivares de cana-de-açúcar RB835486 e SP80-3280, em seis concentrações de Al, avaliados durante três, sete e quatorze dias (D3, D7 e D14, respectivamente) de exposição.

| Cultivar | D3 exposição ao Al^{3+} | | | | | |
|-----------|----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0 μM | 77 μM | 143 μM | 293 μM | 503 μM | 643 μM |
| RB835486 | 0,55 a | 0,64 a | 0,75 a | 0,65 a | 0,85 a | 0,25 a |
| SP80-3280 | 0,35 a | 0,23 a | 0,07 b | -0,10 b | -0,23 b | -0,02 a |
| Cultivar | D7 exposição ao Al^{3+} | | | | | |
| | 0 μM | 77 μM | 143 μM | 293 μM | 503 μM | 643 μM |
| RB835486 | 0,63 a | 0,72 a | 0,59 a | 0,93 a | 0,95 a | 0,29 a |
| SP80-3280 | 0,36 a | 0,12 b | 0,09 a | 0,01 b | -0,12 b | 0,06 a |
| Cultivar | D14 exposição ao Al^{3+} | | | | | |
| | 0 μM | 77 μM | 143 μM | 293 μM | 503 μM | 643 μM |
| RB835486 | 0,94 a | 1,00 a | 1,07 a | 1,07 a | 1,06 a | 0,23 a |
| SP80-3280 | 0,58 a | 0,21 b | 0,28 b | 0,03 b | -0,04 b | 0,04 a |

Letras distintas na coluna indicam diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os cultivares expostos no mesmo período de exposição ao Al^{3+} .

Não houve diferença significativa entre as médias da TAR para os cultivares avaliados quando submetidos apenas à solução nutriente simples. Foram observadas alterações no desenvolvimento do sistema radicular em decorrência das interações entre os fatores presença do Al e dias de exposição. Essa mudança dos valores de TAR entre os cultivares indicou a ação fitotóxica do Al^{3+} e permitiu a classificação dos cultivares como tolerantes ou sensíveis. Baseado no teste de médias realizado (Tabela 5) pode-se afirmar que, para diferenciar o comportamento dos cultivares de cana-de-açúcar, foi necessária uma concentração mínima de $77 \mu\text{M}$ de Al^{3+} para períodos de exposição de sete ou quatorze dias (D7 e D14), ou $143 \mu\text{M}$ de Al^{3+} para o período de exposição de três dias (D3). Este fato é ilustrado pelas linhas de tendência da TAR dos cultivares (Figura 15) onde, para os tempos D3, D7 e D14, entre as concentrações $77-503 \mu\text{M}$ de Al^{3+} , foram observados comportamentos distintos dos cultivares. No cultivar SP80-3280 o crescimento radicular foi afetado pelo Al^{3+} a partir das menores concentrações e do menor tempo de exposição (D3). O cultivar RB835486 mantém o crescimento radicular normal nas concentrações iniciais de Al^{3+} , mas com aumento da concentração ($643 \mu\text{M} \text{Al}^{3+}$) sofre drástica redução no crescimento radicular.

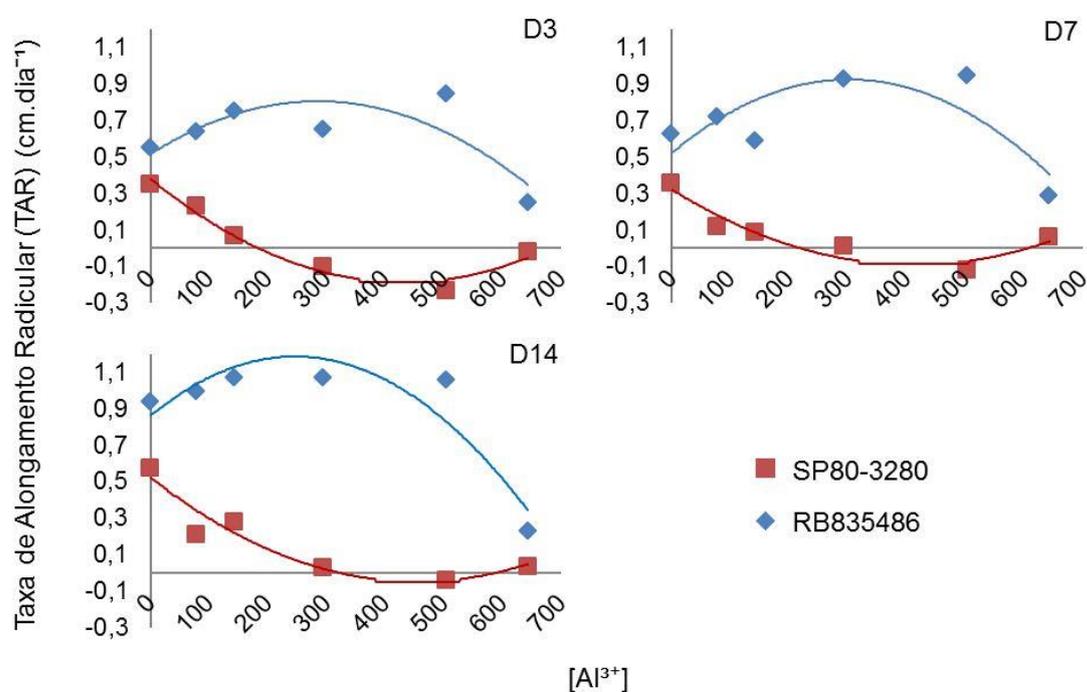


Figura 15. Tendência das médias de Taxa de Alongamento Radicular (TAR) ($\text{cm}\cdot\text{dia}^{-1}$) dos cultivares de cana-de-açúcar RB835486 e SP80-3280, em concentrações crescentes de Al em solução nutriente simples e em três períodos de exposição (D3, D7 e D14).

Os resultados obtidos em experimentos de tolerância ao Al são influenciados principalmente pela atividade de Al^{3+} , genótipo/variedade e tecido analisado (KOCHIAN et al., 2015; MA et al., 2014). As respostas fenotípicas ou bioquímicas de uma espécie à concentração de Al no meio nem sempre são lineares, podendo variar bastante entre genótipos (KOPITTKKE et al., 2016; MA et al., 2014; FAMOSO et al., 2010). Em alguns casos é possível observar um efeito estimulante para o crescimento radicular em baixas concentrações de Al (LANDELL et al., 2003; HETHERINGTON et al., 1986), como pôde ser observado no cultivar RB835486 durante o Experimento I (Figura 15). Hetherington et al. (1986) demonstraram em um dos trabalhos pioneiros sobre tolerância ao Al em cana-de-açúcar que, em um experimento utilizando solo ácido como substrato, não houve diferença visível entre os sistemas radiculares de variedades de cana-de-açúcar com diferentes níveis de tolerância ao Al, classificadas segundo outros índices fenotípicos. Porém, em um experimento hidropônico, os autores puderam observar danos radiculares entre 127-249 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$, sendo que 45 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$ estimulou o crescimento radicular em uma variedade considerada tolerante. Posteriormente, Hetherington et al. (1988) observaram redução do crescimento radicular entre 54-222 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$ para genótipos de cana-de-açúcar considerados sensíveis e tolerantes, respectivamente, sendo que 54 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$ estimulou o crescimento radicular em um dos genótipos tolerantes. Ainda sobre a concentração de Al, Watt (2003) utilizou 221 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$ para reduzir em 43% o crescimento radicular de um genótipo de cana-de-açúcar considerado tolerante ao Al.

A literatura demonstra, portanto, que existe variabilidade nos níveis de tolerância ao Al entre genótipos de cana-de-açúcar, sendo a concentração de Al utilizada nos experimentos um fator determinante para a classificação de um genótipo como sensível ou tolerante. A atividade de 143 μM de $\{\text{Al}^{3+}\}$ está dentro dos intervalos de concentração utilizados para avaliar a cana-de-açúcar, conforme descrito na literatura. Considerando a composição da solução nutriente simples, e a consequente possibilidade de se observar fenômenos indesejados decorrentes da restrição nutricional imposta por este meio, concluiu-se que os melhores parâmetros para os experimentos hidropônicos seriam três dias de exposição (D3) a 143 μM de $\{\text{Al}^{3+}\}$.

5.3.2. Experimento II: Avaliação de nove cultivares de cana-de-açúcar quanto à tolerância ao Al^{3+}

Conforme os resultados apresentados no item 5.1.1, no Experimento I foram estabelecidos os parâmetros necessários para diferenciar os cultivares de cana-de-açúcar em sensíveis ou tolerantes à presença do Al^{3+} em solução nutriente. Desta forma, os cultivares selecionados para a avaliação de tolerância/sensibilidade ao Al^{3+} no Experimento II passaram pelo processo de aclimação e, a seguir, foram divididos nos grupos controle ($0 \mu M$ de $\{Al^{3+}\}$) e exposição ($143 \mu M$ de $\{Al^{3+}\}$), sendo cultivados durante três dias. Os valores de CRM foram medidos ao início e final do período de cultivo em solução nutriente simples. A análise estatística dos dados de TAR dos cultivares foi indicada na Tabela 6.

Tabela 6. Taxa de Alongamento Radicular (TAR) ($cm.dia^{-1}$) de nove cultivares de cana-de-açúcar cultivados durante três dias em solução nutriente simples, em condição controle ($0 \mu M$ de $\{Al^{3+}\}$) ou exposição ($143 \mu M$ de $\{Al^{3+}\}$).

| Cultivar | $0 \mu M \{Al^{3+}\}$ | $143 \mu M \{Al^{3+}\}$ |
|----------|-----------------------|-------------------------|
| IAC66-6 | -0,07 b | -0,02 b |
| RB855156 | -0,23 b | 0,52 a |
| RB855453 | 0,09 b | 0,58 a |
| RB855536 | 1,52 a | 0,32 b |
| RB867515 | 0,82 a | 0,74 a |
| RB92579 | 0,65 a | 0,55 a |
| RB928064 | 0,92 a | 0,72 a |
| RB935744 | 0,86 a | 0,01 b |
| RB985476 | 0,77 a | 1,39 a |

Letras distintas indicam diferença estatística significativa, segundo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os resultados evidenciaram as diferenças de comportamento relacionadas ao Al^{3+} entre os cultivares (Tabela 6). Foram observados cultivares com comportamento tolerante (RB867515, RB92579, RB928064 e RB855453), outras sensíveis (RB855536 e RB935744) e, em uma delas (RB855453), houve um desempenho melhor no grupo exposto ao Al^{3+} em relação ao controle. Em dois genótipos (RB855156 e IAC66-6) não foi possível determinar uma resposta de tolerância/sensibilidade devido à quebra de raízes durante o experimento. A figura 16 ilustra o comportamento dos cultivares.

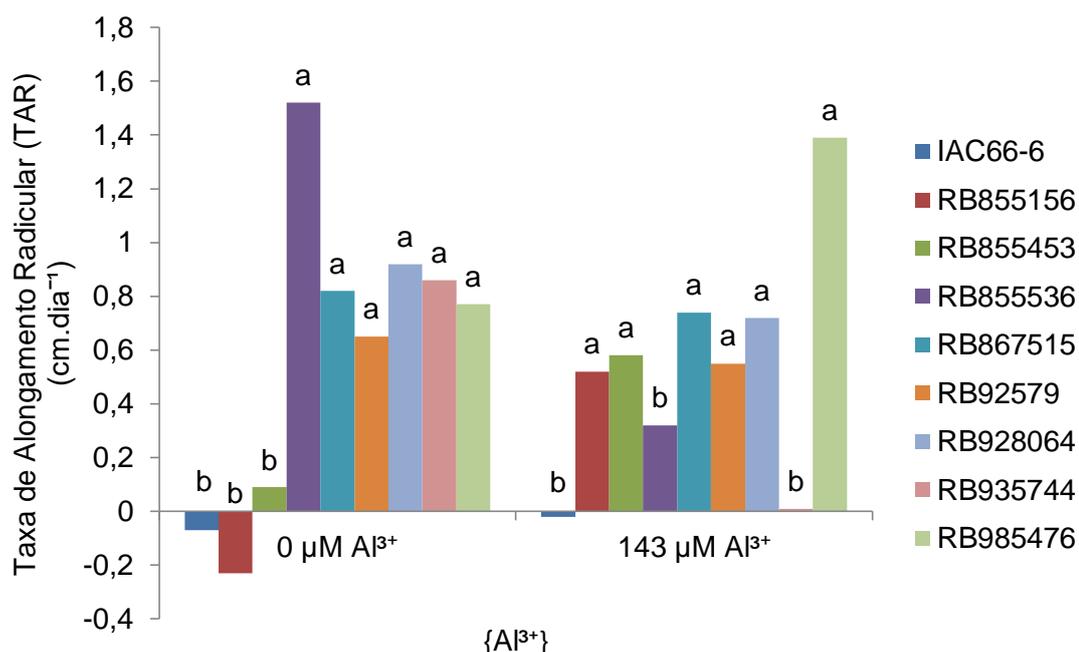


Figura 16. Taxa de Alongamento Radicular (TAR) ($\text{cm}\cdot\text{dia}^{-1}$) dos nove cultivares de cana-de-açúcar cultivados durante três dias em solução nutriente simples, em condição controle ($0 \mu\text{M}$ de $\{\text{Al}^{3+}\}$) ou exposição ($143 \mu\text{M}$ de $\{\text{Al}^{3+}\}$). Letras distintas indicam diferença estatística significativa, segundo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Nos Experimentos I e II as raízes medidas não foram marcadas de nenhuma forma, o que pode ter ocasionado erros experimentais durante as medições iniciais e finais. Além disso, devido à complexidade do sistema radicular da cana-de-açúcar e alta variação de comprimento entre as raízes de plantas de um mesmo cultivar, os tratamentos apresentaram elevado desvio em relação à média. A padronização das raízes no experimento de hidroponia para compreensão da resposta ao Al é fator preponderante para discriminação da tolerância/sensibilidade, principalmente porque há uma grande variação fenotípica no sistema radicular de cada cultivar e entre os indivíduos dentro de um mesmo cultivar.

Entretanto, a TAR de alguns dos cultivares apresentaram desvios menores e, dentre estes, foram selecionados dois com comportamentos contrastantes (RB855536 e RB92579) em relação à tolerância ao Al^{3+} para a realização de um experimento com maior controle sobre as possíveis fontes de erro associados à medição de raízes.

5.3.3. Experimento III: Comparação entre dois cultivares contrastantes para tolerância ao Al^{3+}

O Experimento I permitiu determinar a atividade de Al^{3+} e o tempo de exposição necessário para avaliar a tolerância dos cultivares de cana-de-açúcar. O experimento II permitiu definir dois cultivares com comportamentos contrastantes em relação à tolerância ao Al^{3+} . Os cultivares selecionados para o Experimento III foram o RB92579 e RB855536, sendo que o primeiro apresentou maior tolerância ao Al^{3+} em cultivo hidropônico com solução nutriente simples (Tabela 7 e Figura 17).

Tabela 7. Taxa de Alongamento Radicular (TAR) ($\text{cm}\cdot\text{dia}^{-1}$) dos cultivares RB855536 e RB92579 no experimento em solução nutriente simples.

| Cultivar | $\{\text{Al}^{3+}\}$ | |
|----------|----------------------|-------------------|
| | 0 μM | 143 μM |
| RB92579 | 1,91 a | 1,42 a |
| RB855536 | 1,97 a | 0,89 b |

Letras distintas na coluna indicam diferença estatística significativa, segundo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

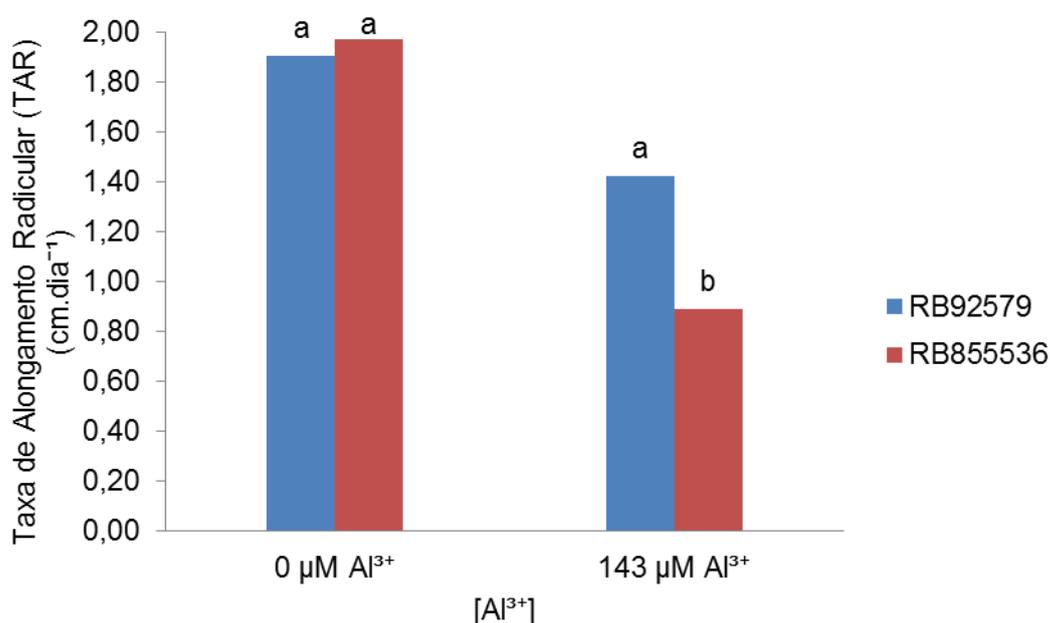


Figura 17. Taxa de Alongamento Radicular ($\text{cm}\cdot\text{dia}^{-1}$) dos cultivares RB855536 e RB92579 no experimento em solução nutriente simples. Letras distintas indicam diferença estatística significativa entre os cultivares, segundo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A marcação das raízes com linhas permitiu medir as mesmas raízes ao início e final do experimento, o que foi eficiente em diminuir os erros experimentais ($\text{CV} = 39\%$). Entretanto, o CV do experimento permaneceu elevado, provavelmente devido

à heterogeneidade do sistema radicular entre indivíduos da mesma cultivar. Desta forma, decidiu-se prosseguir com a experimentação, utilizando todo o aprendizado obtido nos experimentos anteriores e adotando medidas adicionais para redução do CV. Uma das medidas foi a adoção do CRR para medição das raízes, visto que este parâmetro normaliza a diferença entre indivíduos, ao dividir o crescimento líquido pelo comprimento inicial das raízes. Outro ponto foi a comparação apenas entre os cultivares sob o mesmo tratamento em solução nutriente simples, tornando a análise mais simples ao reduzir os fatores influenciando a variável resposta.

5.3.4 Experimento IV: Comparação entre nove cultivares de cana-de-açúcar e avaliação da atividade de enzimas antioxidantes para tolerância ao Al^{3+}

Os resultados do crescimento radicular relativo (CRR) e da atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD) dos experimentos de condição controle (0 μM $\{Al^{3+}\}$) e condição desafio (143 μM $\{Al^{3+}\}$) foram sumarizados nas Tabela 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8. Crescimento radicular relativo (CRR) de nove cultivares de cana-de-açúcar cultivadas em sistema hidropônico nos experimentos de condição controle (0 μM $\{Al^{3+}\}$) e desafio (143 μM $\{Al^{3+}\}$).

| Condição Controle | | Condição Desafio | |
|-------------------|--------------------|------------------|--------------------|
| Cultivar | CRR | Cultivar | CRR |
| RB835486 | 0,380 ^b | RB835486 | 0,336 ^b |
| RB855156 | 0,332 ^b | RB855156 | 0,346 ^b |
| RB855453 | 0,386 ^b | RB855453 | 0,398 ^b |
| RB855536 | 0,460 ^a | RB855536 | 0,408 ^b |
| RB867515 | 0,488 ^a | RB867515 | 0,502 ^a |
| RB92579 | 0,534 ^a | RB92579 | 0,488 ^a |
| RB928064 | 0,506 ^a | RB928064 | 0,588 ^a |
| RB985476 | 0,446 ^a | RB985476 | 0,406 ^b |
| SP80-3280 | 0,430 ^a | SP80-3280 | 0,386 ^b |
| CV (%) | 17,1 | CV (%) | 24,5 |

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística entre as médias, segundo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os coeficientes de variação dos experimentos foram de 17,1% e 24,5% nas condições controle e desafio, respectivamente, valores baixos levando em consideração a variabilidade e complexidade naturais do sistema radicular de cana-de-açúcar. Isto indica que as medidas adotadas durante estes experimentos foram eficientes, visto que, mesmo com um maior número de variedades, o CV foi reduzido em relação aos experimentos anteriores.

Tabela 9. Atividade das enzimas ascorbato peroxidase (APX em $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína), catalase (CAT em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) e superóxido dismutase (SOD em U SOD mg^{-1} proteína) em nove cultivares de cana-de-açúcar cultivadas em sistema hidropônico nos experimentos de condição controle ($0 \mu\text{M Al}^{3+}$) e desafio ($143 \mu\text{M Al}^{3+}$).

| Condição Controle | | | | Condição Desafio | | | |
|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Variedade | APX | CAT | SOD | Variedade | APX | CAT | SOD |
| RB835486 | 916,7 ^b | 59,3 ^b | 63,9 ^a | RB835486 | 1114,5 ^b | 79,9 ^a | 73,8 ^a |
| RB855156 | 1047,4 ^b | 74,6 ^a | 77,1 ^a | RB855156 | 1482,5 ^a | 88,2 ^a | 69,2 ^a |
| RB855453 | 1267,3 ^a | 66,6 ^b | 65,5 ^a | RB855453 | 1553,4 ^a | 82,8 ^a | 78,7 ^a |
| RB855536 | 991,4 ^b | 54,8 ^b | 59,8 ^a | RB855536 | 1132,4 ^b | 52,1 ^b | 59,1 ^b |
| RB867515 | 829,7 ^b | 60,5 ^b | 60,6 ^a | RB867515 | 1214,8 ^b | 78,9 ^a | 75,6 ^a |
| RB92579 | 1455,8 ^a | 61,4 ^b | 64,3 ^a | RB92579 | 1398,2 ^a | 70,9 ^b | 72,3 ^a |
| RB928064 | 1213,8 ^a | 48,2 ^b | 58,1 ^a | RB928064 | 1318,6 ^a | 68,3 ^b | 67,5 ^a |
| RB985476 | 793,5 ^b | 66,8 ^b | 58,9 ^a | RB985476 | 821,5 ^b | 77,4 ^a | 68,4 ^a |
| SP80-3280 | 1370,2 ^a | 87,9 ^a | 65,9 ^a | SP80-3280 | 1569,5 ^a | 92,5 ^a | 52,9 ^b |
| CV (%) | 19,2 | 20,1 | 15,5 | CV (%) | 21,9 | 19,7 | 15,2 |

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística entre as médias, segundo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Para as análises de correlação (Tabela 10), os cultivares de cana-de-açúcar foram agrupados conforme sua classificação na análise estatística de CRR nos experimentos em condição controle ($0 \mu\text{M Al}^{3+}$) e desafio ($143 \mu\text{M Al}^{3+}$) (Tabela 8), pois esta medida é o principal indicador para a tolerância ao Al^{3+} . Parâmetros de desenvolvimento radicular, como o CRR, são constantemente utilizados como base para avaliação de outros parâmetros metabólicos ou genéticos, visto que a diminuição no crescimento radicular é um dos primeiros sintomas gerados pela toxidez do Al^{3+} (LOSKUTOV et al., 2016; CANIATO et al., 2014; POSCHENRIEDER et al., 2008; WATT, 2003; FORNAZIER et al., 2002).

Tabela 10. Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre CRR e atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD) de nove cultivares de cana-de-açúcar nos experimentos em condição controle (0 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$) e condição desafio (143 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$).

| Controle (0 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$) | | | | Desafio (143 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$) | | | |
|--|--------|-------|------------|---|--------|-------|------------|
| Grupo CRR | Enzima | R | p -valor | Grupo CRR | Enzima | r | p -valor |
| Maior | APX | 0,07 | 0,70 | Maior | APX | -0,28 | 0,30 |
| | CAT | -0,12 | 0,53 | | CAT | 0,53 | 0,04* |
| | SOD | 0,21 | 0,27 | | SOD | 0,39 | 0,15 |
| Menor | APX | 0,40 | 0,14 | Menor | APX | -0,26 | 0,17 |
| | CAT | -0,36 | 0,18 | | CAT | -0,62 | 0,00** |
| | SOD | -0,49 | 0,06 | | SOD | -0,40 | 0,03* |

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

¹Experimento controle – Grupos de CRR: Maior (RB855536, RB867515, RB92579, RB928064, RB985476 e SP80-3280) e Menor (RB835486, RB855156 e RB855453).

²Experimento desafio – Grupos de CRR: Maior (RB867515, RB92579 e RB928064) e Menor (RB835486, RB855156, RB855453, RB855536, RB985476 e SP80-3280).

5.3.4.1 Experimento: Condição controle (0 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$)

Crescimento radicular relativo (CRR)

Considerando o experimento de condição controle (0 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$), os dados de CRR apresentaram alta variabilidade entre as cultivares de cana-de-açúcar estudadas (Tabela 8), com uma diferença de 60,8% entre o maior e menor valor de crescimento (RB92579 e RB855156, respectivamente). A análise estatística separou as nove variedades de cana-de-açúcar em dois grupos significativamente distintos ($p \leq 0,05$) quanto ao CRR. Neste experimento, no grupo de cultivares com maiores CRR (RB855536, RB867515, RB92579, RB928064, RB985476 e SP80-3280) foi observado um crescimento 30,3% maior quando comparado com o grupo de cultivares de menor CRR (RB835486, RB855156 e RB855453).

Atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD)

No experimento de condição controle (0 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$), as atividades enzimáticas de APX e CAT apresentaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) quando comparou-se as nove cultivares de cana (Tabela 9). Em relação à APX, foi observado que o grupo composto pelas cultivares com maior atividade de APX (RB855453, RB92579, RB928064 e SP80-3280) apresentou uma média 44,9% superior quando comparado com o grupo de cultivares de menor atividade (RB835486, RB855156, RB855536, RB867515 e RB985476). Neste experimento foi

verificada uma diferença de 83,5% entre as cultivares de maior (RB92579) e menor (RB985476) atividade de APX. Em relação à CAT, apenas as cultivares RB855156 e SP80-3280 apresentaram atividade estaticamente superior às demais na condição controle. A diferença média foi de 36,2% entre os grupos de maior (RB855156 e SP80-3280) e menor (RB835486, RB855453, RB855536, RB867515, RB92579, RB928064 e RB985476) atividade de CAT. A diferença entre as cultivares com maior e menor atividade de CAT (SP80-3280 e RB928064, respectivamente) foi de 82,4%. Neste experimento as cultivares de cana-de-açúcar não apresentaram diferença estatística significativa para a atividade da enzima SOD.

Correlação entre CRR e atividade de enzimas antioxidantes

No experimento em condição 0 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$, não houveram correlações significativas ($p \leq 0,05$) entre a atividade de enzimas antioxidantes e os dados de CRR dos grupos, em ambos os experimentos (Tabela 10). Este resultado era esperado, de certa forma, visto que não há um agente estressante influenciando a atividade das enzimas antioxidantes. Assim, os resultados deste experimento refletem apenas o comportamento natural dos cultivares de cana-de-açúcar quando cultivados em solução nutriente simples.

5.3.4.2 Experimento: Condição desafio (143 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$)

Crescimento radicular relativo (CRR)

Considerando o experimento de condição desafio (143 μM $\{\text{Al}^{3+}\}$), houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre o CRR das nove cultivares (Tabela 8). Houve uma mudança do comportamento varietal do RB855536, RB985476 e SP80-3280 que passaram a compor o grupo de menor CRR quando submetidos ao alumínio. A presença do Al^{3+} gerou uma diferença de 38,4% do CRR entre os grupos de cultivares com maior (RB867515, RB92579 e RB928064) e menor CRR (RB835486, RB855156, RB855453, RB855536, RB985476 e SP80-3280). Houve uma diferença de 75,0% entre os cultivares com maior (RB928064) e menor CRR (RB835486). Uma possível razão da maior amplitude na resposta de CRR, observada no experimento de condição desafio, pode ser explicada pelo fato do Al^{3+} ter afetado o crescimento radicular de formas diferentes entre os cultivares, como no caso dos dois últimos cultivares citados.

Landell et al. (2003) verificaram que RB72454, um cultivar desenvolvido e altamente cultivado no nordeste brasileiro, não apresentou correlação significativa entre produtividade e teor de Al no solo até o terceiro corte, enquanto outros clones analisados apresentaram uma correlação negativa significativa. Isto indica que os cultivares de cana-de-açúcar mais adaptados a ambientes restritivos com solos ácidos, possivelmente possuam mecanismos mais eficientes de tolerância ao Al. De maneira semelhante, no experimento de condição desafio ($143 \mu\text{M } \{\text{Al}^{3+}\}$), os melhores desempenhos de CRR foram dos cultivares com maior presença em ambientes restritivos (Tabela 3). RB867515 é o cultivar mais plantado no Brasil, com ampla adaptabilidade a ambientes diversos e restritivos, RB92579 é conhecido como o cultivar que mais impactou a produtividade da cana-de-açúcar na região nordeste do Brasil (LIBERAÇÃO..., 2015), sendo ambos adaptados a solos restritivos (CARVALHO et al., 2016). Curiosamente, o cultivar mais tolerante ao Al foi RB928064, indicado para ambientes de produção favoráveis (LIBERAÇÃO..., 2015). Oliveira (2012) encontrou resultados semelhantes ao comparar o desenvolvimento radicular de nove cultivares de cana-de-açúcar cultivadas em hidroponia na presença do Al, caracterizando o cultivar RB928064 como o mais tolerante, apresentando o maior crescimento até a concentração de $2000 \mu\text{M Al}$. Outro ponto interessante do trabalho de Oliveira (2012) é que, na concentração de $380 \mu\text{M Al}$, a qual estaria próxima da atividade de $143 \mu\text{M } \{\text{Al}^{3+}\}$ ao se considerar a composição do meio por ela utilizado, o cultivar RB928064 apresentou uma espessa camada de mucilagem recobrando o ápice radicular, o que indica uma resposta de proteção da planta contra a exposição ao Al (CAI et al., 2011; POSCHENRIEDER et al., 2008). Em contrapartida, na mesma concentração de Al, o cultivar RB855453, também caracterizado como sensível no presente trabalho, apresentou pouca mucilagem e danos visíveis ao ápice radicular.

Um comportamento interessante pôde ser observado nos cultivares RB855536, RB985476 e SP80-3280, que no experimento em condição controle foram classificados no grupo de maior CRR e, no experimento em condição desafio com $143 \mu\text{M } \{\text{Al}^{3+}\}$, passaram para o grupo de menor CRR (Tabela 8). O cultivar RB855536 concentra até 65% do volume de seu sistema radicular na camada superficial do solo (0-20 cm) (BUSO et al., 2009; VASCONCELOS; GARCIA, 2005), o que fornece outro indício de sensibilidade neste genótipo, visto que o Al é uma barreira química para o aprofundamento das raízes. O cultivar SP80-3280 tem uma

exigência de ambientes favoráveis (MARIN, 2007). O cultivar RB985476 foi recentemente lançado, sendo necessários mais dados sobre sua produtividade em ambientes diversos.

Atividade de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD)

No experimento de condição desafio ($143 \mu\text{M } \{\text{Al}^{3+}\}$), as atividades enzimáticas de APX, CAT e SOD apresentaram diferença estatística significativa na comparação das nove cultivares de cana (Tabela 9). Neste experimento, as cultivares RB855156, RB855453, RB92579, RB928064 e SP80-3280 apresentaram alta atividade de APX, quando comparadas às demais. A variedade RB855156 passou a compor o grupo estatisticamente superior, apresentando um valor expressivo de atividade de APX ($1482,5 \text{ nmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$). A diferença média entre os grupos de maior (RB855156, RB855453, RB92579, RB928064 e SP80-3280) e menor (RB835486, RB855536, RB867515 e RB985476) atividade de APX foi reduzida para 36,8%. A diferença entre a maior (SP80-3280) e menor (RB985476) atividade de APX foi de 91,1%. Na presença do Al^{3+} as cultivares RB835486, RB855453, RB867515 e RB985476 passaram a compor o grupo com atividade de CAT estatisticamente superior. No experimento de condição $143 \mu\text{M } \{\text{Al}^{3+}\}$ apenas as cultivares RB855536 e SP80-3280 apresentaram atividade de SOD inferior em relação às outras. A média do grupo com maior atividade de SOD (RB835486, RB855156, RB855453, RB867515, RB92579, RB928064 e RB985476) foi 29,0% superior ao grupo de menor atividade (RB855536 e SP80-3280). A diferença entre as cultivares de maior (RB855453) e menor (SP80-3280) atividade de SOD foi de 48,9%.

Correlação entre CRR e atividade de enzimas antioxidantes

Os mecanismos de tolerância ao Al^{3+} mais estudados em plantas são a complexação com ácidos orgânicos, que pode ocorrer de maneira interna ou externa, através da exsudação pelos ápices radiculares (KOCHIAN et al., 2015; MA et al., 2014), ou então a elevação do pH na rizosfera, que diminuiria a disponibilidade do Al^{3+} , reduzindo seus efeitos nocivos. Entretanto, em um experimento em hidroponia estes mecanismos provavelmente teriam menor contribuição, pois o meio líquido dificultaria o acúmulo de ácidos orgânicos e o estabelecimento uma zona com pH mais básico próximo aos ápices radiculares. Portanto, as respostas observadas durante os experimentos realizados neste

trabalho, estão mais provavelmente ligadas a fenômenos ocorrendo de maneira interna aos tecidos radiculares, como o metabolismo antioxidante, por exemplo. Um dos possíveis mecanismos de resposta ao estresse oxidativo causado por Al^{3+} é a ativação de vias metabólicas que regulam a produção de enzimas antioxidantes, como APX, CAT e SOD (AZEVEDO et al., 2011).

De maneira oposta ao experimento em condição controle ($0 \mu\text{M} \{\text{Al}^{3+}\}$), no experimento em condição desafio ($143 \mu\text{M} \{\text{Al}^{3+}\}$), ambos os grupos apresentaram correlações significativas ($p \leq 0,05$) entre CRR e a atividade de CAT e, no grupo de CRR inferior, também com a atividade de SOD (Tabela 10). No grupo das variedades de CRR superior, a correlação com CAT ($r = 0,53$) indica que a maior produção desta enzima teve efeitos positivos sobre o desenvolvimento radicular, possivelmente exercendo um papel importante na remoção do H_2O_2 (WILLADINO et al., 2011) gerado pela presença tóxica do Al^{3+} . De maneira oposta, no grupo de variedades de CRR inferior, as correlações negativas entre CRR e CAT ($r = -0,62$) e CRR e SOD ($r = -0,40$) podem indicar que, nas variedades de cana-de-açúcar caracterizadas como sensíveis ao Al^{3+} , o equilíbrio entre as atividades de enzimas antioxidantes não foi regulado de maneira apropriada para a remoção EROs. Nestes genótipos a maior atividade das enzimas CAT e SOD esteve relacionada a menores valores de CRR. Além disso, a relação entre CRR e SOD neste grupo de variedades pode indicar que o aumento da atividade desta enzima, aliada à remoção ineficiente de H_2O_2 , contribuíram para o acúmulo deste radical, agravando o estado de estresse oxidativo nestas plantas e prejudicando o desenvolvimento radicular (ANJUM et al., 2016; ALSCHER *et al.*, 2002). Um ponto importante, neste sentido, é que o controle do estresse oxidativo depende do balanço apropriado entre as atividades das enzimas antioxidantes (ANJUM et al., 2016; MAIA et al., 2012).

Em um levantamento sobre as sequências expressas em resposta ao estresse oxidativo em cana-de-açúcar, Kurama et al. (2002) detectaram homólogos de isoformas de SOD e CAT. Netto (2001), em um levantamento na base de dados SUCEST (*Sugarcane Expressed Sequence Tags*), encontrou homólogos de diversas isoformas de APX, CAT e SOD. Em outro estudo, Watt (2003) demonstrou que, em cana-de-açúcar, a grande maioria dos transcritos regulados positivamente em resposta ao estresse por Al^{3+} são uma resposta comum também ao estresse oxidativo, o que possivelmente revela um indício sobre a importância do controle das EROs em plantas expostas ao Al^{3+} . Rodrigues et al. (2009) verificaram a expressão

diferencial de genes em duas variedades de cana-de-açúcar contrastantes para a tolerância a seca, constatando, na variedade tolerante, a presença de um gene homólogo a peroxidase (AZEVEDO et al., 2011; CHAGAS et al., 2008).

Segundo Azevedo et al. (2011), existem poucos estudos sobre a atividade de enzimas antioxidantes em cana-de-açúcar em resposta a metais tóxicos, o que poderia levar a uma maior compreensão de como este fenômeno afeta o desenvolvimento da planta. Assim, o presente estudo forneceu possíveis indicações sobre o papel das enzimas antioxidantes sobre o desenvolvimento radicular de cultivares de cana-de-açúcar expostos ao Al^{3+} .

6 CONCLUSÕES

O sistema hidropônico proposto possibilitou o cultivo apropriado e também a avaliação da tolerância ao alumínio tóxico em genótipos de cana-de-açúcar, através da utilização de $143 \mu\text{M Al}^{3+}$ em solução nutriente simples.

Os cultivares RB867515, RB92579 e RB928064 apresentaram maior tolerância ao Al^{3+} em relação aos outros, segundo o índice CRR, quando expostas a $143 \mu\text{M Al}^{3+}$.

As atividades de enzimas antioxidantes (APX, CAT e SOD), em cultivares de cana-de-açúcar, sofreram alterações na presença/ausência do Al^{3+} .

Nos cultivares classificados como sensíveis ao Al, segundo o índice CRR, houveram correlações significativas e inversamente proporcionais entre o CRR e a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD. Nos cultivares classificados como tolerantes houve correlação significativa e diretamente proporcional entre CRR e CAT.

7 LITERATURA CITADA

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.

ANJUM, N.A.; SHARMA, P.; GILL, S.S.; HASANUZZAMAN, M.; KHAN, E.A.; KACHHAP, K.; MOHAMED, A.A.; THANGAVEL, P.; DEVI, G.D.; VASUDHEVAN, P.; SOFO, A.; KHAN, N.A.; MISRA, A.N.; LUKATKIN, A.S.; SINGH, H.P.; PEREIRA, E.; TUTEJA, N. Catalase and ascorbate peroxidase – representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. **Environmental Science and Pollution Research International**, v.23, p.19002-19029, 2016.

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

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

AZEVEDO, R.A.; CARVALHO, R.F.; CIA, M.C.; GRATÃO, P.L. Sugarcane under pressure: An overview of biochemical and physiological studies of abiotic stress. **Tropical Plant Biology**, v.4, p.42-51, 2011.

BARBOSA, A.M. Ambiente de produção na eficiência da conversão de energia solar em cultivares de cana-de-açúcar. 2017. 180 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu. 2017.

BHOOMIKA, K.; PYNGROPE, S.; DUBEY, R.S. Differential responses of antioxidant enzymes to aluminum toxicity in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars with marked

presence and elevated activity of Fe SOD and enhanced activities of Mn SOD and catalase in aluminum tolerant cultivar. **Plant Growth Regulators**, v.71, p. 235-252, 2013.

BIELLEN, A.; REMANS, T.; VANGRONSVELD, J. CUYPERS, A. The influence of metal stress on the availability and redox state of ascorbate, and possible interference with its cellular functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, p.6382-6413, 2013.

BLACKBURN, F. Sugar-cane. Longman, New York, ISBN: 0-582-46028-X, 414 pp, 1984.

BÜCKER-NETO, L.; PAIVA, A.L.S.; MACHADO, R.D.; ARENHART, R.A.; MARGIS-PINHEIRO, M. Interactions between plant hormones and heavy metals responses. **Genetics and Molecular Biology**, v.40, p.373-386, 2017.

BUSO, P.H.M.; KOEHLER, H.S.; DAROS, E.; ZAMBON, J.L.C.; IDO, O.T.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; WEBER, H.; OLIVEIRA, R.A.; NETO, H.Z. Sugarcane root system of RB855536 variety planted in one bud and three bud setts. **Scientia Agraria**, v.10, p.343-349, 2009.

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

CAI, M.; ZHANG, S. XING, C.; WANG, F.; WANG, N.; ZHU, L. Developmental characteristics and aluminum resistance of root border cells in rice seedlings. **Plant Science**, v.180, p.702-708, 2011.

CAIRES, E.F.; KUSMAN, M.T.; BARTH, G.; GARBUIO, F.J.; PADILHA, J.M. Alterações químicas do solo e resposta do milho à calagem e aplicação de gesso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.125-136, 2004.

CANIATO, F.F.; HAMBLIN, M.T.; GUIMARÃES, C.T.; ZHANG, Z.; SCHAFFERT, R.E.; KOCHIAN, L.V.; MAGALHÃES, J.V. Association mapping provides insights into the origin and the fine structure of the sorghum aluminum tolerance locus, *Alt_{SB}*. **PLoS ONE**, v.9(1), 2014.

CANIATO, F.F.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R.E.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V.; BORÉM, A.; KLEIN, P.E.; MAGALHAES, J.V. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 114, p.863-876, 2007.

CARDOSO-SILVA, C.B.; COSTA, E.A.; MANCINI, M.C.; BALSALOBRE, T.W.A.; CANESIN, L.E.C.; PINTO, L.R.; CARNEIRO, M.S.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P.; VICENTINI, R. *De novo* assembly and transcriptome analysis of contrasting sugarcane varieties. **PLoS ONE**, v.9(2), p.1-10, 2014.

CEMBRAWKA-LECH, D.; KOPROWSKI, M.; KEPCZYNKI, J. Germination induction of dormant *Avena fatua* caryopses by KAR1 and GA3 involving the control of reactive oxygen species (H₂O₂ and O₂^{•-}) and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase and catalase) both in the embryo and the aleurone layers. **Journal of Plant Physiology**, v.176, p.169-179, 2015.

CERON-GARCIA, A.; VARGAS-ARISPURO, I.; AIUSPURO-HERNANDEZ, E.; MARTINEZ-TELLEZ, M.A. Oligoglucan elicitor effects during plant oxidative stress. In: BUBULYA, P. **Cell Metabolism – Cell homeostasis and stress response**. Intech, p.1-12, 2012.

CHAGAS, R.M.; SILVEIRA, J.A.G.; RIBEIRO, R.V.; VITORELLO, V.A.; CARRER, H. Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.90, p.181-188, 2008.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_45_51_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_14-15.pdf> Acesso em 11 de agosto de 2015.

de SETTA, N.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; METCALFE, C.J.; CRUZ, G.M.Q.; DEL BEM, L.E.; VICENTINI, R.; NOGUEIRA, F.T.S.; CAMPOS, R.A.; NUNES, S.L.; TURRINI, P.C.G.; VIEIRA, A.P.; CRUZ, E.A.O.; CORRÊA, T.C.S.; HOTTA, C.T.; VARANI, A.S.; VAUTRIN, S.; TRINDADE, A.S.; VILELA, M.M.; LEMBKE, C.G.; SATO, P.M.; ANDRADE, R.F.; NISHIYAMA JR, M.Y.; CARDOSO-SILVA, C.B.; SCORTECCI, K.C.; GARCIA, A.A.F.; CARNEIRO, M.S.; KIM, C.; PATERSON, A.H.; BERGÈS, H.; D'HONT, A.; SOUZA, A.P.; SOUZA, G.M.; VINCENTZ, M.; KITAJIMA, J.P.; VAN SLUYS, M-A. Building the sugarcane genome for biotechnology and identifying evolutionary trends. **BMC Genomics**, v.15:540, 17p, 2014.

DELHAIZE, E.; MA, J.F.; RYAN, P.R. Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. **Trends in Plant Science**, v.17, p.341-348, 2012.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.107, p.315-321, 1995.

DEBYE, P.; HÜCKEL, E. The interionic attraction theory of deviations from ideal behavior in solution. **Physikalische Zeitschrift**, v.24, 1923.

DIAS, F.L.F.; MAZZA, J.A.; MATSUOKA, S.; PERECIN, D.; MAULE, R.F. Produtividade da cana-de-açúcar em relação a clima e solos da região noroeste do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.627-634, 1999.

DRUMMOND, R.D.; GUIMARÃES, C.T.; FELIX, J.; NINAMANGO-CÁRDENAS, F.E.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E.; MENOSSI, M. Prospecting sugarcane genes involved in aluminum tolerance. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.221-230, 2001.

ECHART, C.L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, p.531-541, 2001.

EZAKI, B.; GARDNER, R.C.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**, v.122, p.657-665, 2000.

FAMOSO, A.N.; CLARK, R.T.; SHAFF, J.E.; CRAFT, E.; McCOUCH, S.R.; KOCHIAN, L.V. Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform

used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. **Plant Physiology**, v.153, p.1678-1691, 2010.

FAMOSO, A.N.; ZHAO, K.; CLARK, R.T.; TUNG, C-W.; WRIGHT, M.H.; BUSTAMANTE, C.; KOCHIAN, L.V.; McCOUCH, S.R. Genetic architecture of aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through genome-wide association analysis and QTL mapping. **PLOS Genetics**, v.7, 16 p, 2011.

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

FOYER, C.H.; RUBAN, A.V.; NOCTOR, G. Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signaling rather than damage. **Biochemical Journal**, v.474, p.877-883, 2017.

GARCIA, A.A.F.; MOLLINARI, M.; MARCONI, T.G.; SERANG, O.R.; SILVA, R.R.; VIEIRA, M.L.; VICENTINI, R.; COSTA, E.A.; MANCINI, M.C.; GARCIA, M.O.S.; PASTINA, M.M.; GAZAFFI, R.; MARTINS, E.R.F.; DAHMER, N.; SFORÇA, D.A.; SILVA, C.B.C.; BUNDOCK, P.; HENRY, R.J.; SOUZA, G.M.; van SLUYS, M-A.; LANDELL, M.G.A.; CARNEIRO, M.S.; VINCENTZ, M.A.G.; PINTO, L.R.; VENCOVSKY, R.; SOUZA, A.P. SNP genotyping allows an in-depth characterization of the genome of sugarcane and other complex autopolyploids. **Scientific Reports**, v.3, article 3399, 2013.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v.59, p.309-314, 1977.

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

GUPTA, N.; GAURAV, S. S.; KUMAR, A. Molecular Basis of Aluminium Toxicity in Plants: A Review. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, p.21-37, 2013.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; BERTAN, I.; SILVA, J.A.G.; SCHMIDT, D.A.M.; VALÉRIO, I.P.; MAIA, L.C.; FONSECA, D.A.R.; dos REIS, C.E.S. Associated mechanisms of aluminum tolerance in plants. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, V.28, p.219-228, 2007.

HEIDARABADI, M.D.; GHANATI, F.; FUJIWARA, T. Interaction between boron and aluminum and their effects on phenolic metabolism of *Linum usitatissimum* L. roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.49, p.1377-1383, 2011.

HEPPERLE, D. WinIAP - Software for the Calculation of Ion Activities and Calcite Saturation Index. SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany. 2016.

HETHERINGTON, S.J.; ASHER, C.J.; BLAMEY, F.P.C. Tolerance of sugarcane to Al in soil and solution culture. **Proceedings of Australian Society of Sugar Cane Technologists Congress**, 63-68, 1986.

HETHERINGTON, S.J.; ASHER, C.J.; BLAMEY, F.P.C. Comparative tolerance of sugarcane, navybean, soybean and maize to Aluminium toxicity. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.38, p.171-176, 1988.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station**. Circ. n.347, 1950.

HOANG, N.V.; FURTADO, A.; BOTHA, F.C.; SIMMONS, B.A.; HENRY, R.J. Potential for genetic improvement of sugarcane as a source of biomass for biofuels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.3, p.1-15, 2015.

HUANG, S.C.; LU, G.H.; TANG, C.Y.; JI, Y.J.; TAN, G.S.; HU, D.Q.; CHENG, J.; WANG, G.H.; QI, J.L.; YANG, Y.H. Identification and comparative analysis of aluminum-induced microRNAs conferring plant tolerance to aluminum stress in soybean. **Biologia Plantarum**, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10535-017-0752-5>.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Comentarios/lspa_201507comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Comentarios/lspa_201507comentarios.pdf)> Acesso em 11 de agosto de 2015.

JOAQUIM, A. C.; BELLINASSO, I. F.; DONZELLI, J. L.; QUADROS, A. C.; BARATA, M. Q. F. Potencial e manejo de solos cultivado com cana-de-açúcar. In: Seminário Copersucar de tecnologia agrônômica, 6, 1994, Piracicaba. Anais... São Paulo: Copersucar, p.1-9, 1994.

JOZEF CZAK, M.; REMANS, T.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defences. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.3145-3175, 2012.

KEHRER, J.P.; The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* (149), p.43-50, 2000.

KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.A.; HOEKENGA, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and soil**, v.274, pg.175-195, 2005.

KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.A.; LIU, J.; MAGALHAES, J.V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **The Annual Review of Plant Biology**, v.11(1), p.23.1-23.28, 2015.

KOPITTKE, P.M.; BLAMEY, F.P.C. Theoretical and experimental assessment of nutrient solution composition in short-term studies of aluminium rhizotoxicity. **Plant and Soil**, p.1-16, 2016.

KOPITTKE, P.M.; MENZIES, N.W.; WANG, P.; BLAMEY, F.P.C. Kinetics and nature of aluminium rhizotoxic effects: a review. **Journal of Experimental Botany**, p.1-17, 2016.

KOPITTKE, P.M.; WANG, P. Kinetics of metal toxicity in plant roots and its effects on root morphology. **Plant and Soil**, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3342-6>.

KÖPP, M.M.; FILGUEIRAS, A.L.; MARQUES, R.; KELMER, G.R.; FERNANDES, F.S.; COSTA, A.M.; BARBACHAN, G.; PASSOS, L.P. Efeitos do alumínio tóxico sobre o desenvolvimento de cana de açúcar forrageira: metodologia de avaliação. **Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia - A produção animal no mundo em transformação**, Brasília-DF, 2012.

KRAUS, T.E.; MCKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, v.145, p.570-576, 1995.

KURAMA, E.E.; FENILLE, R.C.; ROSA JR, V.E.; ROSA, D.D.; ULIAN, E.C. Mining the enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in sugarcane. **Molecular Plant Pathology**, v.3, p.251-259, 2002.

LANÇAMENTO de novas Variedades RB de cana-de-açúcar. D.E. Simões Neto et al. (organizadores). Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. 28p. : il. – (Boletim técnico; 1).

LANDELL, M.G.A. Comportamento da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) frente a níveis de alumínio em solução nutritiva. Jaboticabal: UNESP/FCAV, 1989. 117p. (Tese – Doutorado).

LANDELL, M.G.A.; PRADO, H.; VASCONCELOS, A.C.M.; PERECIN, D.; ROSSETTO, R.; BIDOIA, M.A.P.; SILVA, M.A.; XAVIER, M.A. Oxisol subsurface chemical attributes related to sugarcane productivity. **Scientia Agricola**, v.60, n.4, pg.741-745, 2003.

LI, H.; YANG, L-T.; QI, Y-P.; GUO, P.; LU, Y-B.; CHEN, L.S. Aluminum toxicity-induced alterations of leaf proteome in two citrus species differing in aluminum tolerance. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17(1180), p.1-19, 2016.

LIBERAÇÃO nacional de variedades RB de cana-de-açúcar. OLIVEIRA, R.A.; DAROS, E.; HOFFMANN, H.P. (organizadores). 1ª edição – Curitiba: Graciosa, 72 p, 2015.

LOSKUTOV, I.G.; KOSAREVA, I.A.; MELNIKOVA, S.V.; BLINOVA, E.V.; BAGMET, L.V. Genetic diversity in tolerance of wild *Avena* species to aluminium (Al). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.64, p.955-965, 2016.

MA, J.F.; CHEN, Z.C.; SHEN, R.F. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. **Plant and Soil**, v.381, p.1-12, 2014.

MAIA, J.M.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VOIGT, E.L.; de MACÊDO, C.E.C.; PONTE, L.F.A.; SILVEIRA, J.A.G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, p.342-349, 2012.

MAGNAVACA, R. Genetic variability and inheritance of aluminum tolerance in maize. Lincoln: University of Nebraska, 1982. 135p. Ph.D. Thesis.

MARIANO, E.D.; PINHEIRO, A.S.; GARCIA, E.E.; KELTJENS, W.G.; JORGE, R.A.; MENOSSI, M. Differential aluminum-impaired nutrient uptake along the root axis of

two maize genotypes constrasting in resistance to aluminum. **Plant Soil**, p.323-335, 2015.

MARIN, F.R. Cana-de-açúcar: Variedades. In: **Árvore do Conhecimento - Agência Embrapa de Informação Tecnológica (AGEITEC)**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html>. Acesso em: 17 de julho de 2017.

MARIN, F.R.; MARTHA Jr, G.B.; CASSMAN, K.G.; GRASSINI, P. Prospects for increasing sugarcane and bioethanol production on existing crop area in Brazil. **BioScience Advance Access**, V.XX, n.X, 2016.

MARON, L.G.; KIRST, M.; MAO, C.; MILNER, M.J.; MENOSSI, M.; KOCHIAN, L.V. Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. **New Phytologist**, v.179, p.116-128, 2008.

MARTINS, P.R.; PARENTONI, S.N.; LOPES, M.A.; PAIVA, E. Eficiência de índices fenotípicos de comprimento de raiz seminal na avaliação de plantas individuais de milho quanto à tolerância ao alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1897-1904, 1999.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>> Acesso em 11 de agosto de 2015.

MCNEILLY, T. Metal toxicity. In: YEO, A.R.; FLOWERS, T.J. (Eds). **Soil Mineral Stresses: Approaches to Crop Improvement - Monographs on Theoretical and Applied Genetics**, v.21, p.145-174. Springer-Verlag, Berlin, 1994.

MOLDES, C.A.; MEDICI, L.O.; ABRAHÃO, O.S.; TSAI, S.M.; AZEVEDO, R.A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.30, p.469–479, 2008.

MUHAMMAD, K.; UR, R.H.; ASHIQ, R.; FARHATULLAH; SAMAD, A.; RASHID, M. Evaluating top vs. bottom segments performance of sugarcane genotypes. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v.16, p.216-223, 2016.

NETTO, L.E.S. Oxidative stress response in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.93-102, 2001.

NOCTOR, G.; REICHHELD, J-P.; FOYER, C.H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, in press, 2017.

NUNES-NESE, A.; BRITO, D.S.; INOSTROZA-BLANCHETEAU, C.; FERNIE, A.R.; ARAÚJO, W.L. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. **Trends in Plant Science**, V.19, p.399-407, 2014.

OECD/FAO (2016), “Sugar”, in OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025, OECD Publishing, Paris. DOI: http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-9-en

OLIVEIRA, M.S. Tolerância de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) à toxidez por alumínio em solução. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias, 2012, 109f.

OLORIZ, M.I.; GIL, V.; ROJAS, L.; PORTAL, O.; IZQUIERDO, Y.; JIMÉNEZ, E.; HÖFTE, M. Sugarcane genes differentially expressed in response to *Puccinia melanocephala* infection: identification and transcript profiling. **Plant Cell Reports**, v.31, p.955-969. Springer-Verlag, 2012.

PANDA, S.K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v.4, p.592-597, 2009.

POSCHENRIEDER, C.; GUNSÉ, B.; CORRALES, I.; BARCELÓ, J. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. **Science of the Total Environment**, v.400, p.356-368, 2008.

QIN, R.; JIAO, Y.; ZHANG, S.; JIANG, W.; LIU, D. Effects of aluminum on nucleoli in root tip cells and selected physiological and biochemical characters in *Allium cepa* var. *agrogarum* L. **BMC Plant Biology**, v.10(225), p.1-12, 2010.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2011. URL <http://www.R-project.org/>.

RICHARDS, K.D.; SCHOTT, E.J.; SHARMA, Y.K.; DAVIS, K.R.; GARDNER, R.C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v.116, p.409-418, 1998.

ROSSIELLO, R.O.P.; JACOB NETTO, J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: Fernandes, M.S. (Ed.). **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.375-418, 2006.

RODRIGUES, F.A.; LAIA, M.L.; ZINGARETTI, S.M. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant Science**, v.176, p.286-302, 2009.

SHA VALLI KHAN, P.S.; NAGAMALLAIAH, G.V.; DHANUNJAY RAO, M.; SERGEANT, K.; HAUSMAN, J.F. Abiotic stress tolerance in plants. In: P. Ahmad (Ed). **Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance**, v.2, p.23-68, 2014.

SHARMA, M.; SHARMA, V.; TRIPATHI, B.N. Rapid activation of catalase followed by citrate efflux effectively improves aluminum tolerance in the roots of chick pea (*Cicer arietinum*). **Protoplasma**, v.253, p.709-718, 2016.

SHARMA, S.; KIRAN, U.; SOPORY, S.K. Cell metabolism –Cell homeostasis and stress response: Developing stress-tolerant plants by manipulating components involved in oxidative stress, in: M.Z. Abdin et al. (eds). **Plant Biotechnology: Principles and Applications**. Springer Nature, Singapore, 2017.

SHIVASHANKARA, K.S.; PAVITHRA, K.C.; GEETHA, G.A. Antioxidant protection mechanism during abiotic stress. In: N.K.S. RAO et al. (eds). **Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops**, p.47-69, 2016.

SILVA, S. Aluminium toxicity targets in plants. **Journal of Botany**, V.2012, p.1-8, 2012.

SMITH, D.M.; INMAN-BAMBER, N.G.; THORBURN, P.J. Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**, v.92, p.169-183, 2005.

SPOSITO, G. The Chemistry of Soils. 2nd Edition, Oxford University Press, New York, 2008.

SPRY, D.J.; WIENER, J.G. Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: a critical review. **Environmental Pollution**, v.71, p.243-304, 1991.

VALDES, C. **Brazil's ethanol industry: looking forward**. A report from the Economic Research Services – USDA, 2011.

VAN DILLEWEJN, C. Botany of sugarcane. **The Chronica Botanica**, Waltham. 1952.

VARIÉDADES RB de Cana-de-açúcar. H.P. Hoffmann et al. (organizadores). 1ª edição – Araras: CCA/UFSCar, 30p., 2008.

VASCONCELOS, A.C.M.; GARCIA, J.C. Desenvolvimento radicular da cana-de-açúcar in Cana-de-açúcar: Ambientes de Produção. **Encarte Informações Agrônomicas Potafos**, nº 110, 2005. (Encarte Técnico)

VITORELLO, V.A.; CAPALDI, F.R.; STEFANUTO, V.A. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, 2005.

VON UEXKÜLL, H.R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, v.171, p.1–15, 1995.

WATT, D. Aluminium-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p.1163-1174, 2003.

WENZL, P.; PATIÑO, G.M.; CHAVES, A.L.; MAYER, J.E.; RAO, I.M. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. **Plant Physiology**, v.125, p.1473-1484, 2001.

WILLADINO, L.; FILHO, R.A.O.; JUNIOR, E.A.S.; NETO, A.G.; CAMARA, T.R. Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. **Revista Ciência Agrônômica**, v.42, p.417-422, 2011.

WU, D.; SHEN, H.; YOKAWA, K.; BALUŠKA, F. Alleviation of aluminium induced cell rigidity by overexpression of OsPIN2 in rice roots. **Journal of Experimental Botany**, v.65, p.5305–5315, 2014.

XU, X.; YU, Z-F.; KONG, J.; YI, M-J.; HUAN, C.; JIANG, L. Molecular cloning and expression analysis of Cu/Zn SOD gene from *Gynura bicolor* DC. **Journal of Chemistry**, v. 2017, p.1-8, 2017.

ZHANG, J.; ARRO, J.; CHEN, Y.; MING, R. Haplotype analysis of sucrose synthase gene family in three *Saccharum* species. **BMC Genomics**, v.14, p.1-11, 2013.

ZHAO, P.; SOKOLOV, L.N.; YE, J.; TANG, C-Y.; SHI, J.; ZHEN, Y.; LAN, W.; HONG, Z.; QI, J.; LU, G-H.; PANDEY, G.K.; YANG, Y-H.. The *LIKE SEX FOUR2* regulates root development by modulating reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 2016.

ZHAO, X.; CHEN, Q.; WANG, Y.; SHEN, Z.; SHEN, W.; XU, X. Hydrogen-rich water induces aluminum tolerance in maize seedlings by enhancing antioxidant capacities and nutrient homeostasis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.144, p.369-379, 2017.

ZHOU, D.; YANG, Y.; ZHANG, J.; JIANG, F.; CRAFT, E.; THANNHAUSER, T.W.; KOCHIAN, L.V.; LIU, J. Quantitative iTRAQ proteomics revealed possible roles for antioxidant proteins in sorghum aluminum tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.1-14, 2017.

ZSOLDOS, F.; VASHEGYI, A.; PECSVARADI, A.; SZEGLETES, Z. Growth and potassium transport in common and durum wheat as affected by aluminum and nitrite stress. **Journal of Plant Nutrition**, v.24, p.345-356, 2001.