



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

GEMIMA MANÇO DE MELO

**ADAPTABILIDADE FISIOLÓGICA AO ESTRESSE ABIÓTICO INDUZIDA PELA
APLICAÇÃO DE *PRIMING IN VITRO* EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

RECIFE

2016

GEMIMA MANÇO DE MELO

**ADAPTABILIDADE FISIOLÓGICA AO ESTRESSE ABIÓTICO INDUZIDA PELA
APLICAÇÃO DE *PRIMING IN VITRO* EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica – PPGB da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Botânica.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Terezinha Rangel Camara

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Arnóbio Gonçalves de Andrade

RECIFE

2016

Ficha catalográfica

M528a Melo, Gemima Manço de.
 Adaptabilidade fisiológica ao estresse abiótico induzida pela
 aplicação de *Priming in vitro* em plantas de cana-de-açúcar
 / Gemima Manço de Melo. -- Recife, 2016.
 134 f. : il.

 Orientadora: Terezinha Rangel Camara.
 Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade
 Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife,
 2016.
 Inclui referências e anexo(s).

 1. *Halopriming*. 2. *Saccharum spp*. 3. Pré-condicionamento.
 4. Estresse oxidativo. 5. Enzimas antioxidantes. 6. Cloreto de
 sódio. I. Camara, Terezinha Rangel, orientadora. II. Título

CDD 581

Gemima Manço de Melo

Adaptabilidade fisiológica ao estresse abiótico induzida pela aplicação de *priming in vitro* em plantas de cana-de-açúcar

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora em 29 de fevereiro de 2016.

Orientadora:

Profa. Dra. Terezinha Rangel Camara
Professora do Departamento de Química – Área Química Agrícola da UFRPE

Examinadores:

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Titular)
Professora Titular do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

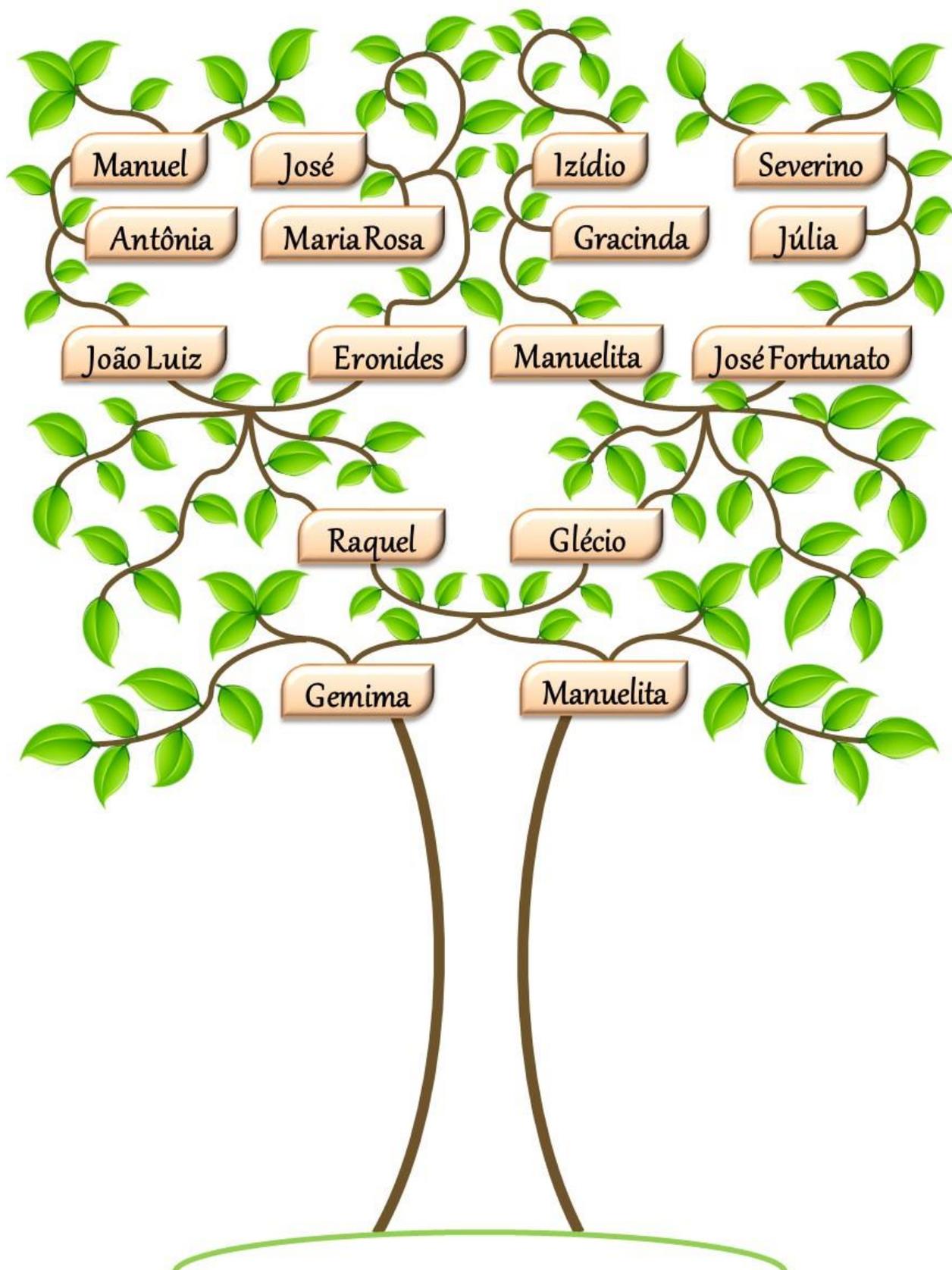
Profa. Dra. Emilia Cristina Pereira de Arruda (Titular)
Professora do Departamento de Botânica da UFPE

Profa. Dra. Lilia Willadino (Titular)
Professora Titular do Departamento de Biologia da UFRPE

Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos (Titular)
Professor do Departamento de Botânica da UFPE

Prof. Dr. Marciel Teixeira de Oliveira (Suplente)
Professor do Departamento de Botânica da UFPE

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva (Suplente)
Professora do Departamento de Bioquímica da UFPE



“À árvore que com suas raízes profundas me concebeu a vida”.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Durante o seu percurso e até chegar ao mar, o rio precisa vencer barreiras, para isso ele conta com a ajuda das correntes, do vento... se estou escrevendo essas singelas linhas é porque assim como o rio, eu consegui vencer barreiras. Grandes foram as “correntes e o vento”, que me transportaram até onde estou e agora o essencial é agradecer a todos por isso.

“Levantarei os meus olhos para os montes, de onde vem o meu socorro”. Salmo 121:1. A Deus sempre buscarei, sou grata por ele nunca ter se apartado de mim, por ele sempre iluminar a minha vida, pela saúde e paz de espírito, que ele me concebeu para a finalização deste trabalho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa; A usina Santa Tereza e ao CETENE.

Ao Coordenador do Curso o Professor Reginaldo de Carvalho e a Vice-Coordenadora a professora Carmem Zickel.

A Secretaria de Educação do Estado de Pernambuco, pelo afastamento de parte de minhas obrigações como professora; A Escola Timbi e as Gestoras Edinalva e Wendy, por toda a compreensão e apoio que me deram.

A minha Orientadora, Terezinha Rangel Camara, pela confiança, conselhos, amizade, cumplicidade, por me levantar toda vez que eu caia, por tudo que me ensinou, o que foi fundamental para o meu desenvolvimento pessoal e acadêmico.

Ao meu Co-orientador, professor Arnóbio G. de Andrade por todo o apoio durante o decorrer dos experimentos.

Aos membros da Banca Examinadora por toda a compreensão e contribuição dada para o aprimoramento deste trabalho.

As professoras Lilia Willadino e Cláudia Ulisses, por tudo que fizeram por mim durante toda a minha vida acadêmica, por terem me guiado no mundo da Cultura de Tecidos Vegetais.

A todos os professores e profissionais que contribuíram para a minha formação. A melhor secretária da UFRPE, a quem sempre serei grata por tudo – Kênia Muniz.

A Manuela da Usina Santa Tereza, por todo o apoio e concessão das mudas de cana-de-açúcar; A Lúcio, ao senhor Marcos e todos que me ajudaram durante os experimentos.

Aos amigos de trabalho Marci, Dany, Everaldo, Hildo, Sandrely, Sônia e Betinha por todo apoio pessoal e profissional.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (minha segunda casa) e a todos que compõem a FAMÍLIA LCTV.

A Wellington, pela amizade, pelos ensinamentos, por tudo que fez por mim durante todo esse período no LCTV.

A Rodolfo, Naila, Keila e Nivaldo por toda a ajuda e por todos os momentos vividos no laboratório.

Amigos são irmãos que o coração escolhe e graças a Deus eu tenho alguns...

Agradeço a minha irmã mais velha – Marta Ribeiro. Pela amizade, conselhos, pelas palavras de conforto, por todos os momentos de felicidade e tristeza. Você esteve comigo em todos eles, minha amiga. Por toda ajuda (não foi pouca, diga-se de passagem), que você me deu durante todas as etapas deste trabalho.

As minhas amigas, Lindomar, Marciana e Lais, por todo carinho, amizade, pelos ensinamentos, por estarem sempre ao meu lado, me levantando, dando amparo, conselhos, nos momentos mais difíceis. Por terem guiado o meu barco, quando precisei estar ao lado da minha família, por tudo que fizeram por mim.

As amigas Liliana e Carla. Foram muitos meses de trabalho árduo e vocês sempre estiveram comigo. Assim, tudo se tornava cada vez mais gratificante e divertido, porque existia pessoas como vocês, envolvidas.

Aos meus amigos Neto, Natália, André e Odemar pelos momentos de alegria, por toda a força que me deram nos dias das intermináveis coletas.

Aos amigos que muitas vezes distantes nunca deixaram de me amparar – Patrícia, Amanda, Gilvany, Vanessa, Danielle, Fabiana e Vitor.

Por último e em especial eu agradeço a minha família... A minha irmã por estar sempre presente, por me ajudar em todos os momentos. Mesmo quando não havia nada que pudesse fazer, até durante a redação deste trabalho, esteve ao meu lado me fazendo beber água, trazendo lanchinhos, por toda a madrugada... A minha mãe por ter acreditado em mim, por todo carinho, confiança, pelo colo, pela educação, amor... Ao meu pai por ser tão forte e por não ter se apartado de nós, por ter se mantido vivo, por tudo que fez por mim... Tudo o que tenho, o que sou eu devo a vocês – os três AMORES de minha vida.

Muito obrigada!

*Quando estiver em dificuldade e pensar em desistir, lembre-se dos
obstáculos que já superou.*

OLHE PARA TRÁS.

Se tropeçar e cair, levante, não fique prostrado, esqueça o passado.

OLHE PARA FRENTE.

*Ao sentir-se orgulhoso, por alguma realização pessoal,
sonde suas motivações.*

OLHE PARA DENTRO.

*Antes que o egoísmo o domine, enquanto seu coração é sensível,
socorra aos que o cercam.*

OLHE PARA OS LADOS.

*Na escalada rumo às altas posições, no afã de concretizar seus sonhos,
observe se não está pisando em alguém.*

OLHE PARA BAIXO.

*Em todos os momentos da vida, seja qual for sua atividade,
busque a aprovação de Deus!*

OLHE PARA CIMA.

Charles Chaplin

MELO, Gemima Manço de. Dra. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Fevereiro de 2016. Adaptabilidade fisiológica ao estresse abiótico induzida pela aplicação de *priming in vitro* em plantas de cana-de-açúcar. Terezinha Rangel Camara.

RESUMO: Durante todas as fases fenológicas, as plantas estão sob efeitos de variações ambientais e para sobreviver às condições estressantes, elas utilizam mecanismos de defesa antioxidativos, capazes de regular o excesso de espécies reativas de oxigênio. Técnicas de pré-condicionamento (*priming*), que consistem em uma prévia exposição a um agente estressor podem estimular os mecanismos de defesa antioxidativos e promover respostas mais eficientes, quando a planta for submetida a um novo ciclo de estresse. O trabalho de tese foi realizado com o objetivo de descrever o estado redox de variedades de cana-de-açúcar micropropagadas em sistema de biorreatores de imersão temporária (BIT) e submetidas a *priming in vitro* com cloreto de sódio (NaCl), visando favorecer a rustificação e o pré-condicionamento ao estresse salino e hídrico, através de análises de respostas de crescimento e bioquímicas. Foram realizados dois experimentos, que originaram três artigos científicos. No primeiro, plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 receberam tratamentos de halopriming com 100 mM de NaCl durante cultivo *in vitro* em BIT e posteriormente foram submetidas a estresse salino gradativo em estufa. No segundo, plantas da variedade RB98710 foram pré-condicionadas com halopriming *in vitro* (25 mM de NaCl), submetidas a tratamentos de estresse salino gradativo com posterior irrigação sem NaCl e avaliação da recuperação. No terceiro, também foram realizados tratamentos de halopriming (25 mM de NaCl) com a variedade RB98710, com posterior submissão das plantas ao estresse salino e hídrico. No primeiro artigo, o pré-condicionamento durante 24 horas proporcionou um melhor desenvolvimento das plantas da variedade RB867515 durante as condições de estresse salino. Preservou o crescimento das plantas, preveniu o acúmulo de íons tóxicos e contribuiu para a manutenção dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). No segundo artigo, o *priming* favoreceu os parâmetros de crescimento, mantendo o acúmulo de biomassa das plantas e o perfilhamento, proporcionando tolerância da variedade RB98710 à salinidade. No terceiro artigo, o tratamento de *priming* estimulou a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase, o que evitou a peroxidação lipídica e o acúmulo de H₂O₂, porém não preservou o crescimento das plantas em condições de estresse salino. Também não houve efeito do *priming* ao estresse hídrico, este provocou reduções no crescimento das plantas, aumento no teor de H₂O₂ e na peroxidação lipídica.

Palavras-chave: *Saccharum* spp; halopriming; cloreto de sódio; estresse oxidativo; enzimas antioxidantes.

MELO, Gemima Manço de. Dra. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Fevereiro de 2016. Adaptabilidade fisiológica ao estresse abiótico induzida pela aplicação de *priming in vitro* em plantas de cana-de-açúcar. Terezinha Rangel Camara.

ABSTRACT: During all phenological phases, the plants are under the effects of environmental variations and to survive stressful conditions, they use antioxidant defense mechanisms, able to regulate the excess reactive oxygen species. Preconditioning techniques (priming), consisting of prior exposure to a stressor agent can stimulate the antioxidative defense mechanisms and promote more efficient responses, when the plant was again subjected to a stress cycle. The thesis has been conducted with the aim to describe the redox state of varieties of sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactor system (BIT) and submitted to *in vitro* priming with sodium chloride (NaCl), aiming to promote the rustification and preconditioning to salt stress and water, through analysis of growth and biochemical responses. Two experiments, which originated three scientific articles were performed. In the first, planting sugarcane variety RB867515 halopriming received treatments with 100 mM NaCl during *in vitro* culture in BIT and were subsequently subject to gradual salt stress in the greenhouse. In the second, plants of the variety RB98710 were preconditioned with halopriming *in vitro* (25 mM NaCl), submitted to treatments gradual salt stress with posterior irrigation without NaCl and evaluation of recovery. In the third, they were also performed treatments halopriming (25 mM de NaCl) with the variety RB98710, with subsequent submission of plants to salt and water stress. In the first article, preconditioning for 24 hours to afforded a better development of the plants of the variety RB867515 during salt stress. Has preserved the growth of plants, prevented the buildup of toxic ions and contributed to maintenance of the hydrogen peroxide levels (H₂O₂). In the second article, the priming favored the growth parameters while keeping the buildup of plant biomass and tillering, providing tolerance to salinity variety RB98710. In the third article, the treatment of priming stimulated the of enzymes activity of superoxide dismutase and catalase, which avoided lipid peroxidation and H₂O₂ accumulation, but it is not preserved the growth of plants in saline stress conditions. There was also no effect of priming to water stress, this caused reduction in plant growth, increase in content of H₂O₂ and lipid peroxidation.

Keywords: *Saccharum* spp; halopriming; sodium chloride; oxidative stress; antioxidant enzymes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA – Ácido α -naftalenoacético
APX – Ascorbato peroxidase
AsA – Ascorbato
BAP – 6-benzilaminopurina
BIT – Biorreator de imersão temporária
BSPA – Biomassa seca da parte aérea
BSR – Biomassa seca da raiz
Ca²⁺ – Íon cálcio
CAT – Catalase
Chl – Clorofila
CHR – Conteúdo hídrico relativo
CO₂ – Dióxido de carbono
CuSOD – Enzima superóxido dismutase contendo cobre
DHA – Dehidroascorbato
DHAR – Dehidroascorbato redutase
Fe²⁺ – Ferro
FeSOD – Enzima superóxido dismutase contendo ferro
GPX – Peroxidase da glutathiona
GR – Glutathiona redutase
GSH – Glutathiona reduzida
GSSG – Glutathiona oxidada
ha – hectare
HO₂[•] – Radical hidropéroxido
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
K⁺ – Íon potássio
Kg – Kilograma
KI – Iodeto de potássio
KIN – Cinetina
MDA – Malondialdeído
MDHA – Monodehidroascorbato
MDHAR – Monodehidroascorbato redutase
mM – Milimolar
MnSOD – Enzima superóxido dismutase contendo manganês

ms – Milissegundo
Na⁺ – Íon sódio
NaCl – Cloreto de sódio
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nm – Nanómetro
O₂ – Oxigênio molecular
O₂^{•-} – Radical superóxido
¹O₂ – Oxigênio singleto
OH[•] – Radical hidroxila
pH – Potencial hidrogeniônico
Prx – Peroxiredoxina
PVPP – Polivinilpirrolidona
RO[•] – Alcoxila
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SOD – Superóxido dismutase
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TCA – Ácido tricloroacético
TCRØ – Taxa de crescimento relativo de diâmetro da parte aérea
ZnSOD – Enzima superóxido dismutase contendo zinco
Ø PA – Diâmetro da parte aérea
µL – Microlitro
µs – Microsegundo

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Fenologia vegetativa da cana-de-açúcar	24
Figura 2. Morfologia da cana-de-açúcar	24
Figura 3. Sistema de biorreator de imersão temporária (BIT)	28
Figura 4. Danos oxidativos induzidos pelas Espécies reativas de oxigênio (ROS) a lipídios, proteínas e DNA	30
Figura 5. Formação de espécies reativas de oxigênio: oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\bullet)	31
Figura 6. Resumo do processo de formação do “ <i>stress imprint</i> ”: (Mecanismo 1) <i>imprint</i> formado por acumulação de proteínas ou fatores de transcrição; (Mecanismo 2) <i>imprint</i> formado por alteração epigenética	37

CAPÍTULO I

Figura 1. Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 aos 15 dias de aclimatização. (A) Plantas provenientes do tratamento controle SP; (B) Plantas provenientes do priming P12 = 12 h; (C) Plantas provenientes do priming P24 = 24 h; (D) Plantas provenientes do priming P36 = 36 h. Barra: 8 cm	56
Figura 2. Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de priming <i>in vitro</i> (SP = sem priming; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) aos 30 dias de estresse salino gradativo (SPC, P1C, P2C e P3C = controle; SPS1, P1S1, P2S1 e P3S1 = 20→40→60 mM de NaCl – S60); SPS2, P1S2, P2S2 e P3S2 = 20→60→100 mM de NaCl – S100). Barra: 12 cm	60

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Massa seca da parte aérea - MSPA (A) e massa seca da raiz - MSR (B) das plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, provenientes de aplicação de priming com 25 mM de cloreto de sódio (NaCl), durante 0 (sem priming), 12 (priming 1), 24 (priming 2) e 36 (priming 3) h, submetidas a tratamentos de estresse salino gradativo em estufa: S0 = controle sem NaCl; S1 = 20 → 40 → 60 mM de NaCl, durante 30 dias..... 85
- Figura 2.** Número de perfilhos (A) e estimativa de clorofila - Chl (B) pelo índice SPAD das plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, provenientes de aplicação de priming com 25 mM de cloreto de sódio (NaCl), durante 0 (sem priming), 12 (priming 1), 24 (priming 2) e 36 (priming 3) h, submetidas a tratamentos de estresse salino gradativo em estufa: S0 = controle sem NaCl; S1 = 20 → 40 → 60 mM de NaCl, durante 30 dias 86
- Figura 3.** Conteúdo hídrico relativo - CHR (A) e dano de membrana (B) das plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, provenientes de aplicação de priming com 25 mM de cloreto de sódio (NaCl), durante 0 (sem priming), 12 (priming 1), 24 (priming 2) e 36 (priming 3) h, submetidas a estresse salino gradativo em estufa: S0 = controle sem NaCl; S1 = 20 → 40 → 60 mM de NaCl, durante 30 dias 86
- Figura 4.** Massa seca da parte aérea - MSPA (A); massa seca da raiz - MSR (B); número de perfilhos (C); estimativa de clorofila - Chl, pelo índice SPAD (D); conteúdo hídrico relativo - CHR (E) e dano de membrana (F) das plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, provenientes de aplicação de priming com 25 mM de cloreto de sódio (NaCl), durante 0 (sem priming), 12 (priming 1), 24 (priming 2) e 36 (priming 3) h, após 15 dias de supressão do NaCl (recuperação ao estresse) 87

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710; **a** plantas em fase de subcutivo. Barra 2 cm; **b** estabelecimento dos tratamentos de priming in vitro com 25 mM de NaCl, durante a fase de multiplicação em sistema de biorreatores de imersão temporária. Barra 10 cm 94
- Figura 2.** Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 em sistema de biorreatores de imersão temporária, no estabelecimento da fase de enraizamento; **a** plantas provenientes do tratamento controle SP; **b** priming P12 = 12 h; **c** priming P36 = 36 h. Barra 5cm 94
- Figura 3.** Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, provenientes dos tratamentos de priming in vitro, na fase de estabelecimento e aos 30 dias de aclimatização, respectivamente. **a** e **b** plantas do tratamento controle SP; **c** e **d** plantas do priming P12 = 12 h; **e** e **f** plantas do priming P36 = 36 h. Barra 10 cm 95

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Biomassa seca da parte aérea (BSPA) e das raízes (BSR), e taxa de crescimento relativo do diâmetro da parte aérea (TCRØ) de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl)..... 59
- Tabela 2.** Número de perfilhos (NP) e biomassa seca dos perfilhos (BSP) de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl)... 60
- Tabela 3.** Teores de sódio (Na⁺), potássio (K⁺), relação Na⁺/K⁺ e cloreto (Cl⁻) da parte aérea, raízes e perfilhos de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl) 62
- Tabela 4.** Teor de malondialdeído (MDA) da parte aérea, perfilhos e raízes de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl).. 63
- Tabela 5.** Teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) na parte aérea e raízes de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl) 65

Tabela 6. Teor de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) nos perfilhos de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de <i>priming in vitro</i> (SP = sem <i>priming</i> ; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl)	66
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Biomassa seca da parte aérea (BSPA), das raízes (BSR) e diâmetro da parte aérea (ØPA), aos 30 dias de estresse salino gradativo ex vitro: (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl), de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de tratamentos de <i>priming in vitro</i> com 25 mM de NaCl na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT).	98
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 2. Biomassa seca da parte aérea (BSPA), das raízes (BSR) e diâmetro da parte aérea (ØPA), aos 30 dias de estresse hídrico gradativo (Controle = 100% da CP; estresse hídrico gradual = 50% da CP seguido de 25% da CP, durante 15 dias cada), de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de tratamentos de <i>priming in vitro</i> com 25 mM de NaCl na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT)	99
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 3. Teores de malondialdeído (MDA) em folhas de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de tratamentos de <i>priming in vitro</i> com 25 mM de NaCl (SP = sem <i>priming</i> ; P12 = 12h; P36 = 36h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl)	99
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 4 Efeitos isolados dos tratamentos de <i>priming in vitro</i> com 25 mM de NaCl na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (SP, P12 e P36) e dos tratamentos salinos (S0, S60 e S100) sobre o teor de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em folhas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, aos 30 dias	100
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Tabela 5. Teores de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em folhas de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de tratamentos de <i>priming in vitro</i> com 25 mM de NaCl (SP = sem <i>priming</i> ; P12 = 12h; P36 = 36h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos	
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

30 dias de estresse hídrico gradativo (Controle = 100% da CP; estresse hídrico gradual = 50% da CP seguido de 25% da CP, durante 15 dias cada) 101

Tabela 6. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em folhas de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de priming in vitro com 25 mM de NaCl (SP = sem priming; P12 = 12 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl) 102

Tabela 7. Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em folhas de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de tratamentos de priming in vitro com 25 mM de NaCl (SP = sem priming; P12 = 12h; P36 = 36h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse hídrico gradativo (Controle = 100% da CP; estresse hídrico gradual = 50% da CP seguido de 25% da CP, durante 15 dias cada) 103

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	21
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1.	CANA-DE-AÇÚCAR: CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	23
2.2.	MICROPROPAGAÇÃO E SISTEMA DE BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA	26
2.3.	O ESTRESSE E A GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO ..	29
2.4.	SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDATIVO	33
2.5.	PRÉ-CONDICIONAMENTO AO ESTRESSE (<i>PRIMING</i>)	36
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
	CAPÍTULO I	51
	Indução de tolerância a estresse salino em cana-de-açúcar por meio de <i>priming in vitro</i>	52
	RESUMO	52
	Palavras-chave	52
	INTRODUÇÃO	53
	MATERIAL E MÉTODOS	55
	Material vegetal e condições de cultivo	55
	Pré-condicionamento <i>in vitro</i> com cloreto de sódio (NaCl)	55
	Aclimatização das plantas	55
	Aplicação de estresse salino <i>ex vitro</i>	56
	Avaliações biométricas e bioquímicas	57
	Análise estatística	59
	RESULTADOS	59
	Biometria e biomassa	59
	Teores de Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻	61
	Teores de MDA, H ₂ O ₂ e atividade enzimática do sistema de defesa antioxidativo	63
	DISCUSSÃO	67
	Biometria e biomassa	67
	Teores de Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻	68
	Teores de MDA, H ₂ O ₂ e atividade enzimática do sistema de defesa antioxidativo	69

AGRADECIMENTOS	74
REFERÊNCIAS	74
CAPÍTULO II	82
Pré-condicionamento <i>in vitro</i> de plantas de cana-de-açúcar (<i>Saccharum spp.</i>) para tolerância ao estresse salino	83
RESUMO	83
ABSTRACT	83
INTRODUÇÃO	83
MATERIAL E MÉTODOS	84
RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
CONCLUSÃO	88
AGRADECIMENTOS	88
LITERATURA CITADA	88
CAPÍTULO III	90
Efeito do estresse salino ou hídrico em plantas de cana-de-açúcar provenientes de halopriming em biorreatores de imersão temporária	91
Resumo	91
Palavras-chave	92
Introdução	92
Material e métodos	93
Local de desenvolvimento da pesquisa e condições de cultivo	93
Aplicação de halopriming <i>in vitro</i> com cloreto de sódio (NaCl)	94
Aclimatização das plantas	95
Aplicação de estresse salino e hídrico	96
Avaliações biométricas e bioquímicas	96
Análise estatística	97
Resultados	98
Biometria e biomassa	98
Teores de MDA, H ₂ O ₂ e atividade enzimática do sistema de defesa antioxidativo	99
Discussão	103
Biometria e biomassa	103
Teores de MDA, H ₂ O ₂ e atividade enzimática do sistema de defesa antioxidativo	105

Contribuição dos autores	109
Agradecimentos	109
Referências	109
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
ANEXOS – NORMATIZAÇÃO DOS PERIÓDICOS	115
NORMAS DO PERIÓDICO PLANT BIOLOGY	116
NORMAS DA REVISTA BRASILEIRA DE ENGENHARIA AGRÍCOLA E AMBIENTAL	123
NORMAS DO PERIÓDICO ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM	124

1. INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo de todo o seu ciclo vital, as plantas passam constantemente por desequilíbrios entre as interações bióticas e abióticas, que promovem alterações no equilíbrio homeostático e acabam por limitar o seu desenvolvimento (LOKHANDE & SUPRASANNA, 2012). Nas plantas, organelas que apresentam intenso fluxo de elétrons e que promovem reações vitais como a respiração e a fotossíntese são fontes de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (MITTLER et al., 2004).

As ROS podem apresentar-se na forma de radicais livres e na forma molecular (GILL & TUTEJA, 2010). Estas, podem agir na sinalização de processos de crescimento, desenvolvimento e de defesa (MITTLER et al., 2004), porém o desequilíbrio na sua produção pode acarretar em distúrbios metabólicos, com alterações no sistema redox e danos a macromoléculas, caracterizando o estresse oxidativo (GILL & TUTEJA, 2010).

Como forma de sobrevivência, as plantas desenvolveram um sistema de defesa que regula a homeostase redox celular frente ao estresse oxidativo (WILLADINO & CAMARA, 2010). Esse complexo sistema de defesa é constituído por enzimas e metabólitos antioxidantes que agem conjuntamente no combate ao excesso de ROS (DEWIR et al., 2006). Nas plantas, os principais componentes enzimáticos envolvidos na eliminação das ROS, incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), a ascorbato peroxidase (APX) e a catalase (CAT) (MITTLER et al., 2004).

Muitas evidências experimentais têm demonstrado o papel das ROS na mediação de respostas a vários estímulos (GILL & TUTEJA, 2010). Quando uma planta é submetida a um estímulo, dependendo da sequência e da intensidade, ele pode acionar o sistema de “memória” da planta e essa pré-exposição é capaz de promover respostas a estímulos subsequentes, o que é denominado *priming* ou aclimatação (SANI et al., 2013).

Técnicas de *priming* são utilizadas há muitos anos e buscam favorecer a germinação e o acúmulo de biomassa das plântulas em condições de seca e salinidade (HEYDECKER, HIGGINS & GULLIVER, 1973; EIRA & MARCOS FILHO, 1990; DUBROVSKY, 1996). Entre os principais agentes pré-condicionantes e técnicas utilizadas, destacam-se o cloreto de sódio (NaCl) e o halopriming, respectivamente. No halopriming, as sementes são imersas em concentrações toleráveis de soluções salinas, com o objetivo de favorecer a germinação e a emergência da plântula em condições ambientais adversas (JISHA & PUTHUR, 2014). Tratamentos de halopriming com NaCl, promovem tolerância ao estresse mediante a expressão de genes que contribuem para a ativação da capacidade antioxidante (PATADE, BHARGAVA

& SUPRASANNA, 2012). O que contribui para a tolerância à salinidade, promove proteção ao sistema fotossintético e manutenção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar (PATADE, KUMARI & AHMED, 2011).

A salinidade é considerada um dos mais disseminados riscos ambientais, sobretudo nas regiões áridas e semiáridas (PITMAN & LAUCHLI, 2002). Juntamente com a seca, constitui um dos principais fatores de estresse abiótico que limita e ameaça a produção agrícola (WANG et al, 2003). Portanto, desenvolvimento de culturas mais tolerantes ao estresse salino e hídrico têm importância marcante para a agricultura sustentável (PANDOLFI, MANCUSO & SHABALAB et al., 2012; OSAKABE et al., 2014).

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp* L.) tem sensibilidade moderada ao estresse salino e pode apresentar reduções de 50% em seu rendimento, quando cultivada em solos com condutividade elétrica de 10,4 dS m⁻¹ (SANTANA et al., 2007). No Nordeste, a cultura vem se expandindo para regiões semiáridas (SEAGRI, 2007), onde estará exposta a um ambiente mais propenso à salinidade e à seca. Alternativas de cultivos de variedades de cana-de-açúcar adaptadas e tolerantes a estas condições é um fator primordial para assegurar o desenvolvimento da região e reduzir perdas na produção.

Atrelada à expansão do conhecimento sobre o metabolismo das plantas em condições de estresse, a prática de alternativas de baixo custo e garantida eficiência no manejo do cultivo *in vitro* de plantas em biofábricas, são necessidades iminentes. A produção de mudas com maior tolerância pode ser obtida pelo pré-condicionamento *in vitro* de plantas em sistema de biorreatores de imersão temporária (MELO et al., 2014). Nesse sistema, o material vegetal fica totalmente submerso em meio nutritivo líquido em intervalos regulares, o que aumenta a superfície de contato entre o explante e o meio, favorecendo, portanto, a absorção dos nutrientes (SANDAL, BHATTACHARYA & AHUJA, 2001).

O trabalho de tese foi desenvolvido com o objetivo de avaliar alterações de crescimento e bioquímicas, que descrevam o estado redox e sua relação com a tolerância ao estresse oxidativo e apontar alternativas de adaptabilidade fisiológica induzida mediante a aplicação de *priming in vitro*, que se constitui em uma metodologia que pode favorecer a tolerância cruzada ao estresse abiótico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CANA-DE-AÇÚCAR: CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

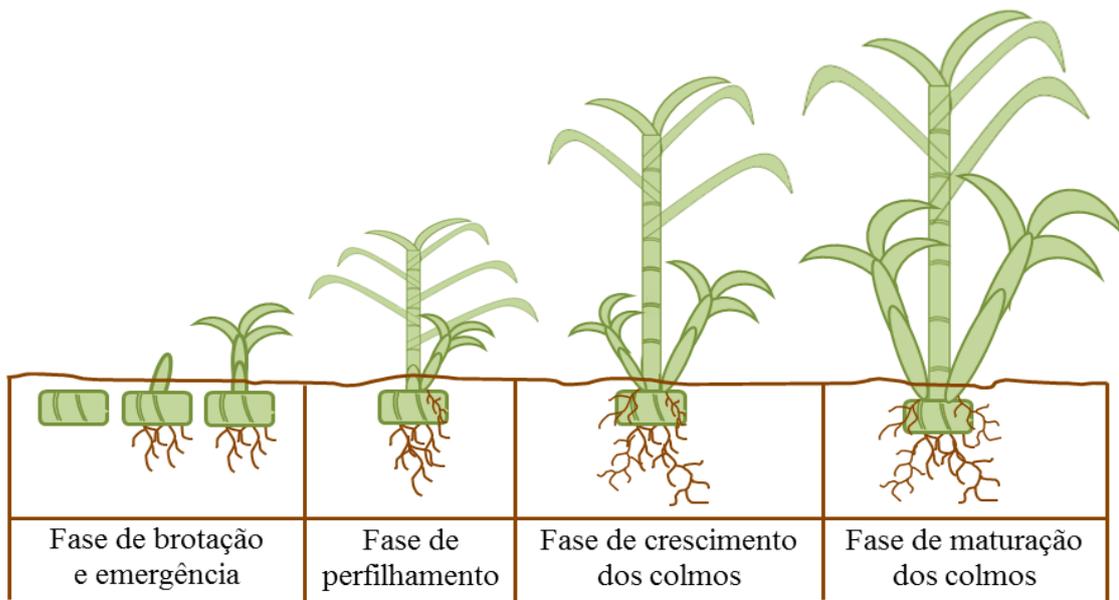
A cana-de-açúcar pertence à classe Liliopsida, ordem Poales, família Poaceae, tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum* L. (APG, 2006). É uma planta de ciclo perene, que se desenvolve em regiões com climas tropicais e subtropicais, com possível centro de origem no sudeste da Ásia (BORÉM et al., 2010). Suas principais cultivares são de híbridos interespecíficos, constituídos geneticamente pelas espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule* (GUPTA et al., 2010).

Considerada uma planta tropical, a cana-de-açúcar apresenta hábito herbáceo e o seu cultivo ocorre entre as latitudes 35° N e 30° S, em altitudes que variam do nível do mar até um pouco mais que 1.000 m (DIOLA & SANTOS, 2010).

Sua estrutura caulinar é cilíndrica, maciça, claramente dividida em nós e entrenós; possui folhas alternas dísticas, paralelinérveas, com lígula entre a bainha e o limbo; possui inflorescência do tipo panícula, contendo flores subdivididas por um par de brácteas (lema e pálea) e seu fruto é do tipo cariopse (SOUZA & LORENZI et al., 2008).

A fenologia da cana-de-açúcar (Figura 1), compreende estádios de: (1) brotação e emergência, que tem início com o rompimento das folhas da gema, emergindo de 20 a 30 dias após o plantio. Nessa fase, quando existem boas condições de umidade e temperatura, inicia-se a brotação das gemas presentes nos toletes (secção do colmo contendo uma ou mais gemas) e simultaneamente ocorre a emissão das raízes de fixação a partir do tolete; (2) perfilhamento, que compreende a emissão de colmos por uma mesma planta. Sob condições ideais, o perfilhamento assume papel principal no processo produtivo da cana-de-açúcar. Quando atingem o máximo da produção, algumas variedades chegam a produzir 20 ou mais perfilhos por touceira; (3) crescimento, nessa fase o colmo acumula sacarose. É diretamente estimulado pela luz, temperatura e umidade, este, desempenha um importante papel na alongação dos perfilhos e no crescimento dos colmos; (4) maturação inicia-se concomitantemente com o crescimento, sendo determinada pela duração do ciclo da cana (EMBRAPA; SILVA et al., 2010).

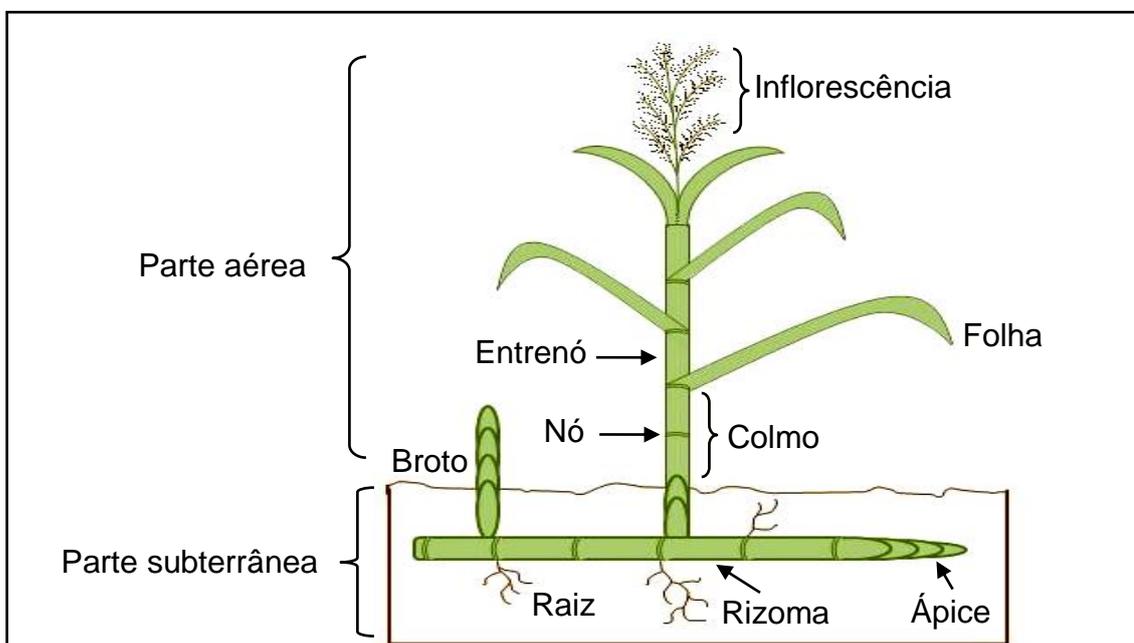
Figura 1. Fenologia vegetativa da cana-de-açúcar.



Fonte: Adaptado de Gascho & Shih (1983).

Apesar de apresentar reprodução sexuada, quando cultivada comercialmente, é utilizada a propagação assexuada, mediante a propagação vegetativa do colmo seccionado em segmentos com aproximadamente trinta centímetros de comprimento (CAIEIRO et al., 2010; MAGRO et al., 2011). O desenvolvimento da planta é em forma de touceira, tendo a parte aérea formada por colmos, folhas e inflorescências e a subterrânea formada por rizomas e raízes (Figura 2).

Figura 2. Morfologia da cana-de-açúcar.



Relatos indicam que a cana-de-açúcar pode ter sido primeiramente cultivada na Nova Guiné em torno de 4000 a.C., mais tarde surgiu na Índia, foi introduzida, por Árabes, na região do Mediterrâneo em torno de 700 d.C. e durante viagens ao redor do mundo, espanhóis e portugueses espalharam a cultura (AGP, 2006). No Brasil, a introdução da produção de cana-de-açúcar se deu por volta do século XIV e em meados do século XVII, o país tornou-se o maior produtor de açúcar (RODRIGUES & ORTIZ, 2006). Dessa forma, o cultivo da cana-de-açúcar é uma das primeiras atividades econômicas documentadas na história do Brasil (CUENCA & NAZÁRIO, 2005),

A cana-de-açúcar pertence a principal família de importância econômica das Angiospermas (SOUZA & LORENZI, 2008). E sua importância econômica é atribuída à sua ampla utilização, podendo ser empregada *in natura*, como planta forrageira; disponibilizar subprodutos como a torta de filtro e o bagaço; ou como matéria prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool (TORRES et al., 2012).

O Brasil, além de ser o maior produtor mundial da cultura, seguido por Índia e China, também é o maior produtor e exportador de açúcar, sendo responsável por mais de 50% do açúcar comercializado no mundo (CONAB, 2015a). Em relação ao etanol, atualmente os Estados Unidos e o Brasil são os principais produtores e consumidores, porém a maior parte do etanol produzido nos Estados Unidos tem origem do milho, enquanto que o produzido no Brasil é originado da cana-de-açúcar (MERCADO SUCROALCOOLEIRO, 2015).

A nível nacional estima-se que a área cultivada com cana-de-açúcar na safra 2015/16 seja de aproximadamente 8.995,5 mil hectares, com uma produção total de 658,7 milhões de toneladas e um rendimento médio em torno de 73.228 kg/há. Entre os estados nordestinos, Pernambuco encontra-se como segundo maior produtor da cultura canavieira, com cerca de 264 mil ha, ficando atrás apenas do Estado de Alagoas com uma estimativa de safra 2015/2016 de aproximadamente 338,3 mil ha (CONAB, 2015b).

Na região Nordeste, o cultivo da cana-de-açúcar é realizado, tradicionalmente, na Zona da Mata, a qual apresenta as melhores condições climáticas para o desenvolvimento da agricultura canavieira, mas o seu cultivo vem se expandindo para regiões semiáridas, onde a utilização de sistemas de irrigação permitiu o desenvolvimento da atividade canavieira (OLIVEIRA & BRAGA, 2011; OLIVEIRA, BRAGA & SANTOS et al., 2014).

O clima na região semiárida apresenta um regime de chuvas fortemente concentrado nos meses de fevereiro a maio, o que não propicia o desenvolvimento da cultura canavieira, além disso, essas regiões muitas vezes são afetadas pela ocorrência de solos com sinais de salinização e de águas com elevado teor de sais (CIRILO, MONTENEGRO & CAMPOS et al., 2010).

No Brasil, particularmente no Nordeste, destacam-se as variedades RB (República Brasileira), lançadas pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA. As variedades RB apresentam adaptações para os diversos ambientes agroecológicos do Brasil, proporcionando níveis adequados de produtividade, além de fornecer genótipos mais tolerantes ao estresse hídrico com eficiente recuperação desse estresse e variedades resistentes a doenças graves, como a ferrugem marrom, o carvão, a escaldadura-das-folhas e o mosaico (RIDESA, 2010).

Diante do exposto, alternativas de cultivos adaptados e tolerantes de cana-de-açúcar às condições estressantes do semiárido é uma medida interessante para impulsionar o desenvolvimento da região, reduzindo assim perdas na produção da cultura.

2.2. MICROPROPAGAÇÃO E SISTEMA DE BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

A micropropagação é a técnica mais difundida no cultivo *in vitro* de plantas, consiste no cultivo de células, tecidos ou órgãos, através de um explante coletado de uma planta matriz, resultando na produção de uma grande quantidade de plantas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

O princípio básico da cultura de tecidos é a aplicação da totipotência celular, propriedade inerente às células vegetais, definida pela capacidade de regenerar plantas a partir de células isoladas não diferenciadas, ou a partir de órgãos e tecidos vegetais (RAMALHO, SANTOS & PINTO, 2004). Trata-se de um método de propagação econômico, pois a produção de plantas é realizada em grande escala, permitindo que as mesmas possam ser cultivadas em pequenos espaços e por longos períodos; produzindo plantas livres de patógenos, sendo, portanto, universalmente utilizado para produção de mudas (CHANNARAYAPPA, 2007).

Os explantes extraídos de várias partes da planta, tais como folhas, raízes, segmentos nodais, gemas axilares, gemas florais e apicais são cultivados assepticamente em meios nutritivos com composição adequada para a regeneração da planta (MALAJOVICH, 2004).

Dependendo diretamente do tipo de explante utilizado, a micropropagação pode ser conduzida de três maneiras: (1) a partir da multiplicação de gemas, o qual envolve o isolamento de regiões meristemáticas; (2) a partir da multiplicação mediante indução de gemas adventícias por organogênese direta ou indireta; (3) ou a partir da multiplicação via embriogênese somática (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

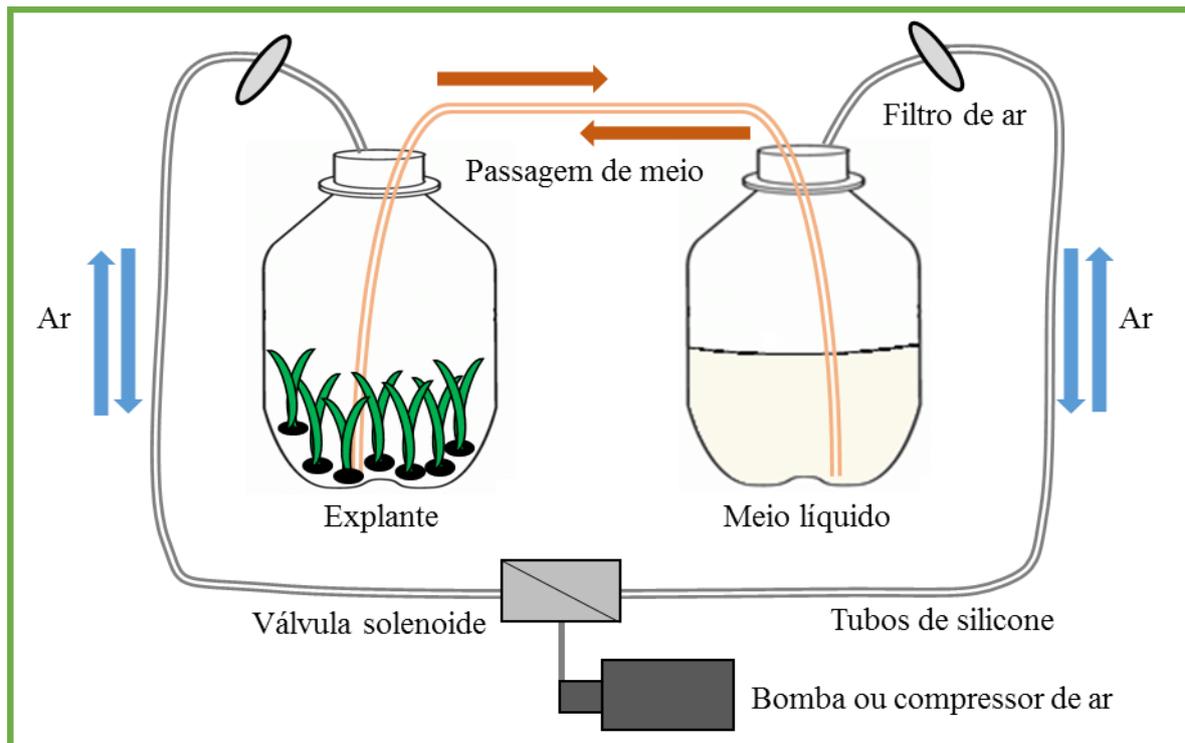
Além de ser aplicada na produção de plantas em escala comercial, a micropropagação pode ser utilizada na manutenção de bancos de germoplasma, para limpeza clonal, o que

promove a produção de mudas com elevada qualidade fitossanitária (FERNANDES, 2013; SILVA et al., 2013), como também para a conservação de espécies vegetais raras ou ameaçadas pelo processo de extinção (SUZUKI et al., 2010; NORTHCUTT et al., 2012).

Os meios nutritivos utilizados no cultivo *in vitro*, fornecem substâncias essenciais para o crescimento e geralmente controlam o desenvolvimento *in vitro*, tendo por base as exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas de cada espécie (CALDAS, HARIDASAN & FERREIRA, 1998). Apresentam em sua constituição macronutrientes, micronutrientes, água, vitaminas, aminoácidos, fonte de carbono, podendo conter ainda reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Quanto à sua consistência, os meios nutritivos podem ser semissólidos ou líquidos, isto se dá respectivamente, pela adição ou ausência de agentes gelificantes (CALDAS, HARIDASAN & FERREIRA, 1998). Apesar de promover condições ideais de suporte para as plantas, a natureza física dos meios semissólidos possibilita uma absorção dos nutrientes, apenas pelas partes da planta que estão em contato direto com o meio, o que reflete em uma baixa produção de biomassa (LEMOS et al., 2001; CHANNARAYAPPA, 2007). Com o intuito de minimizar os custos durante a micropropagação, facilitar o preparo dos meios nutritivos e a manipulação das culturas *in vitro*, soluções alternativas que incluem a redução ou supressão de agentes gelificantes podem ser utilizadas, destacando a micropropagação em sistemas de imersão temporária (SCHEIDT et al., 2009 a,b).

O sistema de imersão temporária funciona através de um sistema de bombeamento de ar no qual o meio nutritivo líquido, que fica armazenado em um recipiente próprio, é transferido periodicamente para o recipiente onde estão sendo cultivados os explantes, estes ficam submersos por um período pré-estabelecido (Figura 3). Nesse sistema o meio líquido cobre totalmente os explantes e esse maior contato entre explante e meio de cultura incrementa a absorção uma vez que os nutrientes podem ser absorvidos diretamente pela epiderme das folhas, caules e raízes (ULISSES et al., 2010), favorecendo a taxa de assimilação, crescimento e multiplicação de brotos e, ainda, o acúmulo de biomassa seca (LEMOS et al., 2001; SANDAL, BHATTACHARYA & AHUJA, 2001; PEREIRA & FORTES, 2003).

Figura 3. Sistema de biorreator de imersão temporária (BIT).

Fonte: Adaptado de Lemos (2009).

Os primeiros biorreatores tiveram origem de equipamentos denominados fermentadores, os quais eram utilizados no cultivo de fungos e bactérias para fins industriais (TEIXEIRA, 2002). O primeiro relato sobre o uso de biorreatores para fins de propagação vegetal foi realizado por Takayama & Misawa (1981), os quais utilizaram a nova técnica para a micropropagação de begônia.

Os sistemas de imersão temporária e outros biorreatores, geralmente são utilizados quando se deseja uma maior uniformidade das mudas, aumentar a taxa de multiplicação e diminuir os custos de produção, uma vez que nesses sistemas verifica-se uma menor manipulação e transferência dos explantes, em relação aos sistemas tradicionais (TEXEIRA, 2011).

Esse tipo de sistema promove redução no tempo requerido para propagação e aumento na produção de mudas de *Saccharum* spp (LEMOS et al., 2002), *Musa* AAB, CEMSA ¾ (ARAGÓN et al., 2010), *Cattleya walkeriana* (MOREIRA et al., 2013), *Ananas comosus* (SCHERER et al., 2015), dentre outras. De acordo com Gerald & Lee (2011) as plantas produzidas em biorreatores são normalmente maiores e bem enraizadas, o que facilita o processo de aclimatização.

2.3. O ESTRESSE E A GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

De acordo com Larcher (2004): “todo organismo experimenta estresse, embora a maneira pela qual ele o expresse varie de acordo com seu nível de organização. Se os limites de tolerância são excedidos, pode resultar em dano permanente ou mesmo na morte” (GASPAR et al., 2002).

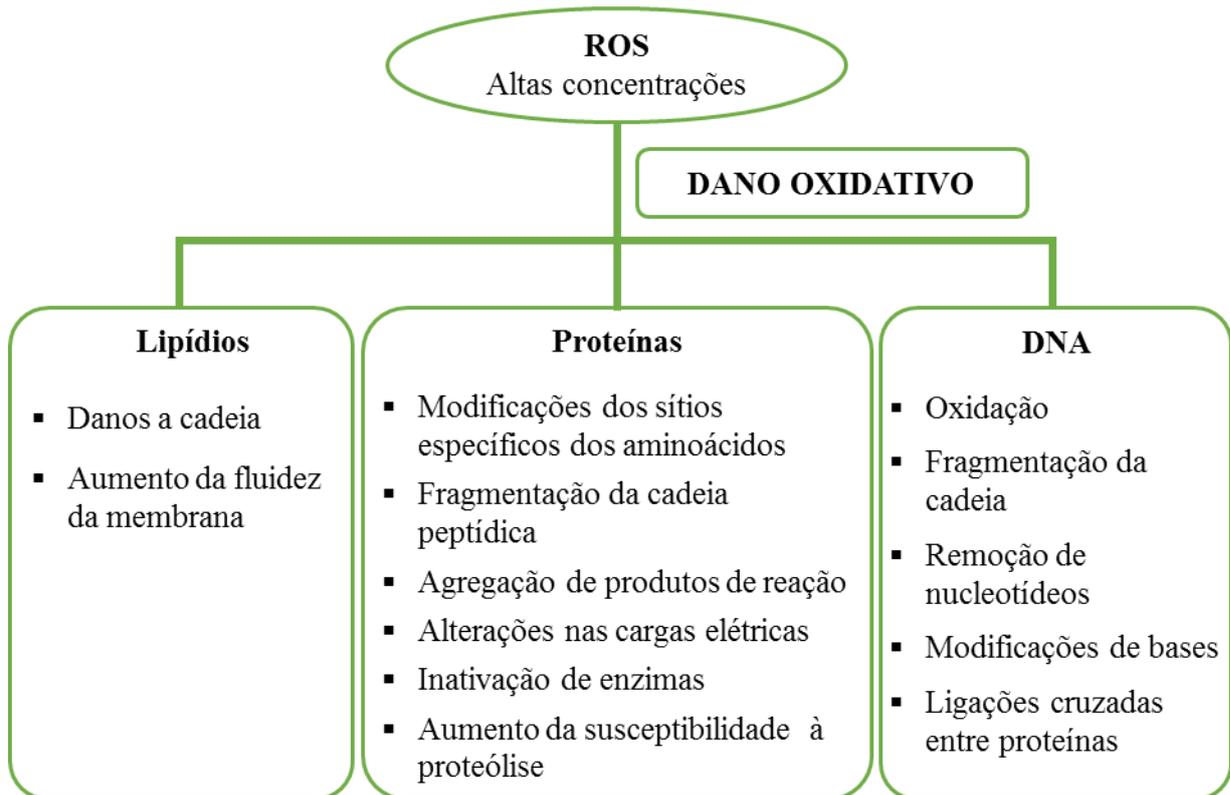
A intensidade e a duração do estresse imposto, podem desencadear respostas positivas ou negativas, caracterizando o eu-estresse ou o dis-estresse, respectivamente. O eu-estresse é definido como aquela condição de estresse suave e estimulante que ativa o metabolismo celular e incrementa a atividade fisiológica da planta, é um fator positivo que impulsiona o crescimento vegetal. Por outro lado, o dis-estresse afeta negativamente o metabolismo, o crescimento e o desenvolvimento vegetal (LICHTENTHALER, 2004).

A resposta ao estresse é mediada pelas vias de sinalização. Estresses moderados e graves são reconhecidos por diferentes elementos do sistema de detecção de células vegetais. Nas células das plantas acredita-se que atuam dois grupos de sistemas sensores dependentes das membranas: o sistema dependente da relação entre o equilíbrio redox e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); os sistemas que dependem de perturbações na interação membrana plasmática/parede celular (MP/PC). Esses sistemas sensores são responsáveis pela indução da via de ativação de genes de resposta ao estresse (KACPERSKA, 2004).

Estresses abióticos, como o estresse hídrico e o salino podem afetar as plantas, em vários níveis de organização. Quando em contato com o estresse hídrico, um dos primeiros eventos que ocorre na planta é o fechamento estomático, o que provoca uma redução na disponibilidade de dióxido de carbono (CO_2) nas folhas, inibe a fixação de carbono com consequente redução das taxas fotossintéticas (LISAR et al., 2012; OSAKABE et al., 2014). Este evento pode desencadear um estresse secundário, como o estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo acúmulo excessivo de ROS, esse acúmulo ocorre quando os mecanismos de defesa se encontram em níveis mais baixos que as ROS (GIL & TUTEJA, 2010). O equilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS é perturbado por vários fatores bióticos e abióticos de estresse, o que conduz a um aumento súbito dos níveis intracelulares, que por sua vez, podem causar danos significativos para a estrutura celular (Figura 4), com perda da competência fisiológica e eventual morte celular (MOLLER, JENSEN & HANSSON, 2007; MULLINEAUX & BAKER 2010).

Figura 4. Danos oxidativos induzidos pelas Espécies reativas de oxigênio (ROS) a lipídios, proteínas e DNA.



Fonte: Sharma et al. (2012).

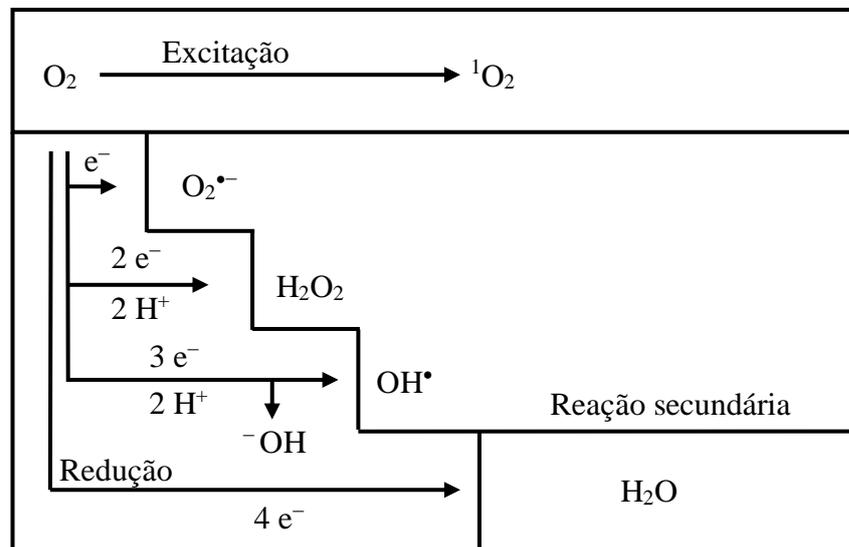
Apesar de provocar danos, quando em baixas concentrações, as ROS atuam como moléculas sinalizadoras nos processos de crescimento e desenvolvimento celular (DEL RÍO et al., 2006). Além disso, possuem a capacidade de induzir mudanças no padrão de expressões gênicas, no metabolismo celular, na totipotência, na competência embriogênica, e atuam na sinalização do estresse (OBERT et al., 2005).

As ROS podem apresentar-se na forma de radicais livres, como exemplo os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}), hidroperóxido (HO_2^{\cdot}) e alcoxila (RO^{\cdot}), na forma molecular, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a excitação do oxigênio molecular (O_2) dá origem ao oxigênio singleto (1O_2) (GILL & TUTEJA, 2010). Sua produção ocorre em variados compartimentos celulares, como cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, retículo endoplasmático, membrana plasmática, parede celular e apoplasto (SHARMA et al., 2012).

Durante o processo de respiração celular, o oxigênio molecular é completamente reduzido por quatro elétrons transportados ao longo da cadeia respiratória, gerando duas moléculas de água (SOARES & MACHADO, 2007). Porém, durante esse processo uma pequena quantidade de elétrons escapa ocorrendo uma redução parcial do O_2 e a conseqüente geração ROS. A redução parcial do O_2 , com um, dois ou três elétrons (Figura 5), resulta na

formação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), da molécula peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila (OH^{\bullet}), respectivamente; já a excitação do oxigênio molecular, promove uma mudança na distribuição dos seus elétrons, o que dá origem ao oxigênio singlete (1O_2) (BARTOSZ, 1997; MITTLER, 2002).

Figura 5. Formação de espécies reativas de oxigênio: oxigênio singlete (1O_2), radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet}).



Fonte: adaptado de Bartosz, 1997.

O radical $O_2^{\bullet-}$ é moderadamente reativo, instável por possuir número ímpar de elétrons (13) na última camada eletrônica e possui meia-vida de aproximadamente 2-4 μs (PRASAD, 2004; BARBOSA et al., 2014). De acordo com Gill & Tuteja (2010), o principal local de produção do radical $O_2^{\bullet-}$ é na membrana do tilacoide no PSI. Todavia, ele pode ser produzido em vários compartimentos celulares, como o citosol, mitocôndrias e peroxissomos (MOLLER, JENSEN & HANSSON, 2007). Durante o catabolismo das purinas, o radical $O_2^{\bullet-}$ pode ser produzido nos peroxissomos, através da xantina oxidase e no retículo endoplasmático, esse radical é formado como resultado das reações de desintoxicação catalisadas pelos citocromos (AHMAD et al., 2008).

Considerada uma ROS primária, quando formado, o radical $O_2^{\bullet-}$ desencadeia uma cascata de reações, capazes gerar ROS "secundárias", através de enzimas ou processos catalisados por meio de metais (VALKO, MORRIS & CRONIN, 2005), que incluem radicais livres, halogênios oxidados e oxigênio singlete (APEL & HIRT, 2004). A dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 ocorre facilmente através da SOD (SHARMA et al., 2012).

O H_2O_2 é uma molécula moderadamente reativa, porém é a mais estável das ROS, possuindo uma meia-vida relativamente longa (1 ms) em relação às demais (GILL & TUTEJA, 2010). Ele pode atravessar distâncias consideráveis, é capaz de se difundir, por apresentar permeabilidade através das membranas (BROSCHÉ et al., 2010) e sua produção se dá nas vias metabólicas normais, ocorrendo nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, citosol, retículo endoplasmático e núcleo (MOLLER, JENSEN & HANSSON, 2007). Pode ser produzido na fotorrespiração, durante reações de fotoxidação do NADPH oxidase, bem como da xantina oxidase e através da β -oxidação de ácidos graxos (NEILL, DESIKAN & HANCOCK, 2002; SHARMA et al., 2012).

De acordo com Quan et al. (2008), o H_2O_2 age como um segundo mensageiro para os sinais gerados por meio de ROS, atuando em uma rota dupla nas plantas, podendo ocasionar a morte celular programada, quando em altas concentrações ou agir na sinalização de respostas de aclimatação ao estresse. Isso ocorre porque o estresse produzido pelo H_2O_2 promove alterações na expressão dos genes nucleares, o que propicia a sua disponibilidade em regular com precisão a manutenção da homeostase redox celular e mediar a transdução de sinais (MYLONA & POLIDOROS, 2011).

O OH^\bullet é formado a partir da reação do H_2O_2 com o $\text{O}_2^{\bullet-}$, na presença de catalisadores metálicos como o ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+}) (GILL & TUTUJA, 2010). Esse radical possui potencial para reagir com todas moléculas biológicas, como DNA, proteínas, lipídios e devido à ausência de qualquer mecanismo enzimático, que possa promover a sua eliminação, ele é considerado uma ROS altamente reativa, onde o seu excesso conduz à morte celular (VRANOVÁ, INZE & VAN BREUSEGEM, 2002).

O $^1\text{O}_2$ é uma molécula altamente reativa, capaz de se difundir através de distâncias consideráveis (centenas de nanômetros) (SHARMA et al., 2012). Pesquisas demonstram que o aumento na formação do $^1\text{O}_2$ promoveu 80% da peroxidação de lipídios de membrana em folhas de *Arabidopsis thaliana* (TRANTAPHYLIDÈS et al., 2008).

Níveis prejudiciais de $^1\text{O}_2$ são produzidas em resposta ao excesso de excitação do PSII, quando o metabolismo fotossintético é drasticamente reduzido por inibidores ou por estresses abióticos tais como a salinidade e a seca. Nestas situações, a energia de excitação não é extinta de maneira suficientemente rápida no PSII pelo centro de reação fotoquímica ou por carotenoides, o que promove aumento da atividade ou a morte celular (GILL & TUTEJA, 2010; MULLINEAUX & BAKER, 2010). A eliminação desse radical pode ocorrer através da transferência da sua energia de excitação para outras moléculas, o que faz ele retornar ao estado fundamental ou através de reações de oxidação com outras moléculas como lipídios, proteínas,

aminoácidos, ácidos nucleicos e carboidratos, o que conseqüentemente provoca danos às células (RONSEIN et al., 2006; TRIANTAPHYLIDÈS & HAVAUX, 2009).

Já o radical hidroperóxido (HO_2^{\bullet}) é formado a partir da protonação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ em soluções aquosas, e pode atravessar membranas biológicas e subtrair átomos de hidrogênio de ácidos graxos poli-insaturados e hidroperóxidos de lipídios, disparando a auto-oxidação de lipídios (BARTOSZ, 1997; NEILL, DESIKAN & HANCOCK, 2002).

2.4 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDATIVO

Durante o ciclo de vida, os organismos estão suscetíveis a reações de desequilíbrio, que promovem a formação de radicais livres em excesso e por sua vez podem provocar vários danos celulares. Para impedir ou equilibrar esse tipo de dano, as células vegetais desenvolveram mecanismos de defesa, bastante sensíveis às condições de estresse (MITTLER, 2002).

O estado redox celular mantém a homeostase em geral e, em particular, a capacidade da célula para lidar com eventos redoxes, tais como o estresse oxidativo (POTTERS et al., 2010). Como tal, o estado redox não é apenas ponto de controle na resposta ao estresse da planta, é um mecanismo capaz de perceber até pequenas mudanças nas condições ambientais, e conduzir a adequação das respostas celulares a tais mudanças (DE TULLIO et al., 2010). Assim como o pH e a composição iônica do citoplasma, o estado redox de uma célula influencia o ambiente fisiológico e, conseqüentemente, a funcionalidade de muitas proteínas (BIENERT et al., 2006).

Para suportar o estresse oxidativo, impedindo que o mesmo provoque danos irreversíveis à célula, as plantas utilizam mecanismos de defesa antioxidativo formados por enzimas e metabólitos antioxidantes, que agem conjuntamente no combate ao excesso de ROS (DEWIR et al., 2006).

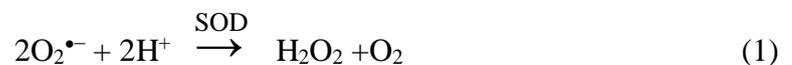
Enzimas são proteínas que catalisam reações químicas e mediam praticamente todas as reações bioquímicas que constituem a vida, portanto, são essenciais para a manutenção adequada de qualquer organismo (BARBOSA et al., 2014). Ainda de acordo com os mesmos autores, as enzimas antioxidantes podem ser encontradas nos diferentes compartimentos celulares e contribuem para o controle das ROS em plantas, o que confere um estágio de homeostase redox no sistema.

As principais enzimas envolvidas na eliminação das ROS em plantas incluem a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidases (POD, EC: 1.11.1.7), polifenoloxidase (PPO, EC: 1.14.18.1), glutathione redutase (GR, EC: 1.6.4.2), peroxidase da glutathione (GPX, EC: 1.11.1.91) e peroxiredoxinas (Prx, EC: 1.11.1.15). E os principais metabólitos antioxidantes são o ácido

ascórbico (AsA), a glutatona (GSH), o α -tocoferol e os carotenoides (MITTLER et al., 2004; BARBOSA et al., 2014).

As SODs compõem uma família de metaloenzimas consideradas como a primeira linha de defesa contra as ROS (BARBOSA et al., 2014). Essas enzimas podem ser encontradas em vários compartimentos subcelulares, organelas onde as atividades metabólicas são altamente oxidantes, devido ao intenso fluxo de elétrons e tais como cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, glioxissomos, citosol e apoplasto (ALSCHER et al., 2002; MYLONA & POLIDOROS, 2011).

Essas enzimas participam da reação que catalisa a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$. A remoção desse radical pela SOD é essencial, pois diminui os riscos de formação do radical OH^{\bullet} , a partir do $O_2^{\bullet-}$, durante a reação de Harber-Weiss (DINAKAR et al., 2012). De acordo com Sharma et al. (2012), durante a dismutação o radical $O_2^{\bullet-}$ reage com um elétron e dois prótons, o que produz H_2O_2 e O_2 , como demonstrado na reação:



Dependendo dos cofatores metálicos, as SODs podem ser subdivididas em três grupos: (1) FeSOD (enzima superóxido dismutase contendo ferro), encontradas nos cloroplastos; (2) MnSOD (enzima superóxido dismutase contendo manganês), localizadas nas mitocôndrias e nos peroxissomos; e (3) Cu/ZnSOD (enzima superóxido dismutase contendo cobre e zinco, respectivamente), encontradas nos cloroplastos, no citosol e nos espaços extracelulares (ALSCHER et al., 2002).

Entre as enzimas antioxidantes, a CAT foi a primeira enzima a ser descoberta e caracterizada. É uma proteína tetramérica, contendo o grupo heme, que catalisa a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio (SHARMA et al., 2012), como mostra a reação a seguir:



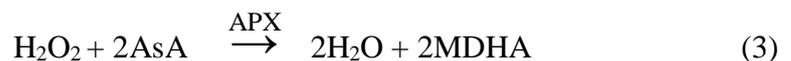
Nas células vegetais, a eliminação do H_2O_2 é realizada por um conjunto de enzimas antioxidantes, codificadas por genes nucleares, incluindo CAT, APX, GPX e Prx. E entre essas enzimas, a CAT é a única que decompõem o H_2O_2 , sem necessitar de um adicional redutor, o que proporciona à célula um mecanismo de energia eficiente (MYLONA & POLIDOROS, 2011). As CATs são indispensáveis na desintoxicação de ROS, principalmente em condições

de estresse severo, quando ocorre altas concentrações de H₂O₂ e sua atividade apresenta-se mais efetiva (DUBEY, 2011).

Podem ser encontradas nos glioxissomos, porém o principal sítio de localização da CAT são os peroxissomos, nestes locais essas enzimas estão envolvidas em mecanismos enzimáticos primários, como a eliminação do H₂O₂ formado pela oxidação do glicolato na fotorrespiração (SHARMA et al., 2012). Contudo há evidências da atividade desta enzima em outros compartimentos subcelulares, como exemplo o citosol, as mitocôndria e cloroplastos (MHAMDI et al., 2010).

A APX é uma heme proteína, pertencente a Classe I da superfamília das peroxidases, com distintas formas isoenzimáticas, diversamente reguladas (BARBOSA et al., 2014). Com base nas sequências de aminoácidos e nas isoformas, essas enzimas podem ser encontradas em diferentes localizações subcelulares (SHARMA et al., 2012), como exemplo o citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, glioxissomos e parede celular (SHIGEOKA et al., 2002; DABROWSKA et al., 2007).

Ao contrário da CAT, a APX utiliza o ascorbato como doador de elétrons, para reduzir o H₂O₂ à água, constituindo parte do ciclo conhecido como ciclo da ascorbato-glutationa ou ciclo de Halliwell-Asada (DAVLETOVA et al., 2005; D'ARCY-LAMETA et al., 2006). A continuidade das reações, no ciclo da ascorbato-glutationa, se dá com: a formação do radical monodehidroascorbato (MDHA), devido a oxidação do ascorbato (reação 3), a MDHA redutase (MDHAR) reduz o MDHA com ajuda do NADPH (reação 4); Dehidroascorbato (DHA) é produzido espontaneamente através do MDHA e pode ser reduzida para ascorbato, através da DHA redutase (DHAR) (reação 5); o ciclo se completa com a glutatona redutase (GR), que converte a glutatona oxidada (GSSG) em glutatona reduzida (GSH) (reação 6) (BARTOSZ, 1997; APEL & HIRT, 2004).



A mudança de ASA para DHA e de GSH para GSSG é essencial para que a célula consiga reconhecer o estresse e responder adequadamente, o que representa um importante papel no combate ao estresse oxidativo (SHARMA et al., 2012).

2.5. PRÉ-CONDICIONAMENTO AO ESTRESSE (*PRIMING*)

Devido a sua natureza sésstil as plantas não podem evitar a exposição ao estresse e para conseguir completar o seu ciclo vital, elas utilizam adaptações fisiológicas, mecanismos moleculares e respostas bioquímicas (JIMÉNEZ-ARIAS et al. 2015a). As respostas das plantas às condições estressantes vão diferir de acordo com a espécie, cultivar, órgão, tecidos, estágio de desenvolvimento, tempo de exposição e fatores edáficos (WILLADINO & CAMARA, 2010; NASCIMENTO et al., 2011). Com o intuito de favorecer o desenvolvimento das plantas, frente às variadas formas de estresse, pesquisadores vêm utilizando o pré-condicionamento, também denominado de *priming*.

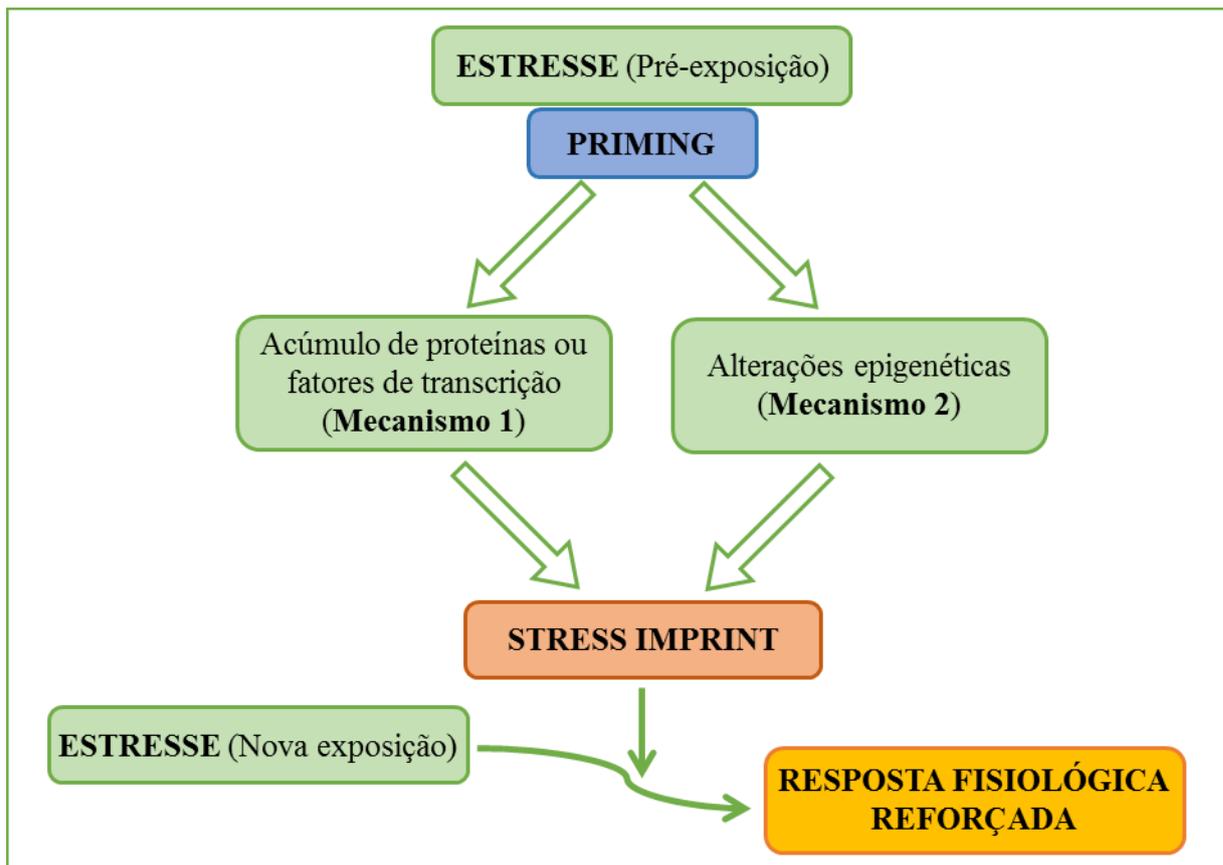
Quando expostas a fatores estressantes, as plantas possuem a capacidade de “memorizar”, o que é denominado de “*stress imprint*”, termo geralmente definido como uma alteração genética ou bioquímica capaz de induzir o armazenamento de respostas de estresses bióticos e abióticos, o que auxilia a planta a responder de forma diferente a um futuro estresse (JIMÉNEZ-ARIAS et al. 2015b). Nesse sentido o *priming* tem o objetivo de deixar a planta mais tolerante quando exposta a um novo ciclo de estresse e para isso é realizada uma exposição prévia a um fator de estresse biótico ou abiótico (PATADE, BHARGAVA & SUPRASANNA, 2009).

O intervalo de tempo entre a percepção do estresse, durante a aplicação de um *priming* e a exposição a um novo evento estressante, pode habilitar a planta a gerar e armazenar informações que permitam respostas mais rápidas e precisas (PASTOR et al., 2014). Pesquisas pioneiras com a espécie *Nicotiana sylvestris*, demonstraram uma “memória imunológica”. Essa resposta foi obtida mediante uma prévia indução com metil jasmonato, este, promoveu após seis dias um aumento nos níveis de nicotina nas plantas induzidas (BALDWIN & SCHMELZ, 1996 apud BRUCE et al. 2007).

Apesar de não muito compreendidos, alguns autores descrevem os possíveis mecanismos moleculares responsáveis pelo *priming*. A primeira hipótese envolve proteínas sinalizadoras e acumulação de fatores de transcrição. Por exemplo, o *priming* induz a fosforilação de uma proteína quinase dependente de cálcio (CDPK), levando a uma mudança conformacional e, em seguida, o estresse pode causar alterações nos níveis de Ca^{2+} livres, desencadeando a atividade da quinase, o que leva a uma sinalização e uma mais rápida

transcrição de genes de defesa (CONRATH et al., 2006). A segunda hipótese inclui a ação de mecanismos epigenéticos (Figura 6). Tais mecanismos permitiriam não apenas efeitos transitórios, mas uma “memória” mais longa, pois provocaria alterações que poderiam envolver metilação do DNA e modificação de histonas (BRUCE et al., 2007; CHINNUSAMY & ZHU, 2009; PASTOR et al., 2013).

Figura 6. Resumo do processo de formação do “*stress imprint*”: (Mecanismo 1) *imprint* formado por acumulação de proteínas ou fatores de transcrição; (Mecanismo 2) *imprint* formado por alteração epigenética.



Fonte: adaptado de Bruce et al. (2007).

A utilização de tratamentos de pré-condicionamento (*priming*) é bastante difundida em sementes (*seed priming*) por melhorar a tolerância à seca e ao estresse salino (JISHA & PUTHUR, 2014), aumentar a taxa germinativa (TAVILI et al., 2010), promover resistência a pragas e patógenos (WORRALL et al., 2012), dentre outros.

Entre as técnicas utilizadas no pré-condicionamento de sementes, destacam-se: o hidropriming, o osmocondicionamento e o halopriming (NAWAZ et al., 2013). Além dessas três principais é relatado uma infinidade de técnicas de pré-condicionamento que podem

promover a germinação, aumentar o vigor da planta e promover resistência a estresses bióticos e abióticos (JISHA, VIJAYAKUMARI & PUTHUR, 2013).

O hidropriming consiste na imersão das sementes em água antes da semeadura e geralmente é utilizado em áreas agrícolas onde as condições ambientais são desfavoráveis para a germinação das sementes (NAWAZ et al., 2013). Essa técnica é considerada simples e econômica e proporciona aumento na capacidade de ajustamento osmótico das sementes, o que consequentemente aumenta o estabelecimento e a produção em condições de estresse (KAUR et al., 2002). O que pôde ser relatado em sementes de *Bromus tomentellus*, quando tratadas com hidropriming apresentaram aumentos na taxa germinativa, no comprimento dos coleótilos, no comprimento das plantas e em seu vigor (TAVILI et al., 2010).

Também conhecido como condicionamento osmótico, o osmocondicionamento consiste na embebição das sementes por um período estabelecido em soluções de açúcar, polietilenoglicol (PEG), glicerol, sorbitol ou manitol (NAWAZ et al., 2013). Essa técnica expõe a semente a um potencial osmótico baixo, para restringir a taxa de embebição e alongamento (JISHA, VIJAYAKUMARI & PUTHUR, 2013). A utilização de osmopriming em sementes de *Bromus inermis* promoveu aumento na taxa germinativa, no comprimento dos coleótilos e das radículas, no comprimento das plantas e em seu vigor (TAVILI et al., 2010).

Na técnica de halopriming, as sementes são imersas em soluções salinas, apresentando concentrações toleráveis, com o intuito de facilitar o processo de germinação e emergência da plântula em condições ambientais adversas (JISHA & PUTHUR, 2014). Geralmente são utilizados sais inorgânicos como exemplo o NaCl, cloreto de cálcio (CaCl_2), sulfato de cálcio (CaSO_4), nitrato de potássio (KNO_3) (NAWAZ et al., 2013).

Evidências indicam que o halopriming pode melhorar a germinação e emergência das plântulas, contudo essa resposta vai depender da espécie (NAWAZ et al. 2013), como também do tempo de pré-condicionamento e da sua concentração. A utilização de 50 mM de CaSO_4 ou CaCl_2 como agentes pré-condicionantes de sementes de cultivares de *Triticum aestivum* L. foi eficaz na tolerância ao estresse salino, promovendo melhoria no vigor das mudas, melhor acumulação de íons K^+ , Ca^{2+} e menor acúmulo de íons Na^+ . No mesmo experimento, a utilização de NaCl, na mesma concentração não promoveu os mesmos resultados (AFZAL et al., 2008). Por outro lado, tratamento de halopriming com 35 mM de NaCl proporcionou aumento no comprimento das brotações, na biomassa fresca e seca e no teor de proteínas, em sementes de uma variedade sensível ao NaCl de *Vigna radiata* (JISHA & PUTHUR, 2014).

Como forma de promover a ativação de respostas positivas, frente ao estresse, os tratamentos de *priming* podem ser utilizados em outros órgãos vegetais, contudo, são poucos os registros desse tipo de pré-condicionamento. Em cana-de-açúcar existem relatos da

utilização dessa técnica em rebolos (PATADE, BHARGAVA & SUPRASANNA, 2009, 2015; PATADE, KUMARI & AHMED, 2011) como também em calos (MUNIR & AFTAB, 2011) e plantas (MELO et al., 2014), ambas cultivadas *in vitro*.

O pré-condicionamento de rebolos de cana-de-açúcar com 100 mM de NaCl favoreceu o crescimento e o acúmulo de biomassa fresca das plantas, promoveu redução da senescência foliar, melhor ajustamento osmótico por meio do acúmulo de glicina betaína e ativação de enzimas do sistema de defesa antioxidativo, quando diferentes variedades foram submetidas a 15 dias de estresse osmótico induzido por 150 mM de NaCl (-0,7 MPa) ou polietilenoglicol (PEG 8000 20 % p/v) (Patade *et al.*, 2009, 2015).

A utilização de ácido ascórbico, como pré-condicionante durante o cultivo *in vitro* de calos de *Saccharum* sp (cvs. HSF 240 e SPF 234) proporcionou aumento significativo no número de brotos e no comprimento da parte aérea das plantas regeneradas, além de promover aumento na atividade das enzimas POD, CAT e SOD (MUNIR & AFTAB, 2011).

Tratamentos de halopríming *in vitro*, em plantas de diferentes variedades de cana-de-açúcar (RB98710 e RB867515) também favoreceram parâmetros de crescimento e ativaram o sistema de defesa antioxidativo das plantas, quando estas foram submetidas a estresse salino em estufa (MELO et al., 2014). Contudo, esse trabalho mais uma vez destaca que a concentração do *priming*, o tempo de exposição e a variedade foram fatores determinantes para obtenção de resultados positivos.

Diante do que foi descrito, os tratamentos de *priming* em variedades de cana-de-açúcar, cultivadas em sistema de biorreatores de imersão temporária, mostram-se como uma técnica simples e de baixo custo, podendo ser capaz de promover adaptabilidade fisiológica nas plantas e favorecer o seu desenvolvimento em condições de estresse hídrico e salino.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, I. et al. Halopriming improves vigor, metabolism of reserves and ionic contents in wheat seedlings under salt stress. **Plant Soil Environ**, v. 54, n. 9, p. 382-388, 2008.

AHMAD, P. SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. **Journal of Plant Biology**, v. 51, n. 3, p.167-173, 2008.

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

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-379, 2004.

APG. 2006. **Angiosperm Phylogeny Group**. Disponível em:

<<http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=285293&isprofile=0&basic=%25#AllImages>>. Acesso em 03 de Janeiro de 2016.

ARAGÓN, C. E. et al. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 46, p. 89-94, 2010

BALDWIN, I. T.; SCHMELZ, E. A. Immunological “memory” in the induced accumulation of nicotine in wild tobacco, **Ecology**, Washington, v. 77, p. 236-246, 1996.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p.453-460, 2014.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 19, n. 1, p. 47-64, 1997.

BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, p.994-1003, 2006.

BORÉM, A.; SILVA, J. A.; DIOLA, V. Biologia molecular e biotecnologia. In: SANTOS, F.;

BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool – tecnologia e perspectiva**. Viçosa: UFV, 2010, p. 333-335.

BROSCHÉ, M. et al. Stress signaling III: reactive oxygen species (ROS). In: PAREEK, A.; SOPORY, S. K.; BOHNERT, H. J.; GOVINDJE. **Abiotic stress adaptation in plants - physiological, molecular and genomic foundation**. Dordrecht: Springer, 2010. p. 91-102.

BRUCE, T. J.A et al. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, p. 603-608, 2007.

CAIEIRO, J. T. et al. C. Physical purity and germination of sugarcane seeds (Caryopses) (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 140-145, 2010.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA/CNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.

CHANNARAYAPPA. **Molecular biotechnology: principles and practices**. Bangalore: Universities Press, 2007. 1217p.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current Opinion Plant Biology**, v. 12, p. 1-7, 2009.

CIRILO, J. A. et al A questão da água no semiárido brasileiro. In: BICUDO, C. E. de M.; TUNDISI, J. G.; SCHEUENSTUHL, M. C. B. **Águas do Brasil análises estratégicas**. 1. ed. São Paulo: Instituto de Botânica, 2010. cap. 5, p. 81-91.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar. Safra 2015/16**. Brasília: CONAB, 2015a. 29p. (Primeiro levantamento, abril/2015).

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar. Safra 2015/16**. Brasília: CONAB, 2015b. 70p. (terceiro levantamento, dezembro/2015).

CONRATH, U. et al. *Priming: getting ready for battle*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 10, p. 1062-1071, 2006.

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

DABROWSKA, G. et al. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia**, v. 49, n. 1, p.7-17, 2007.

D'ARCY-LAMETA, A. et al. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in *Cowpea* leaves. **Annals of Botany**, v. 97, n. 1, p. 133-140. 2006.

DAVLETOVA, S. et al. Cytosolic ascorbate peroxidase is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Waterbury, v. 17, n. 1, p. 268-281, 2005.

DEL RÍO, L. A. et al. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes: production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 330-335, 2006.

De TULLIO. Antioxidants and redox regulation: changing notions in a changing world. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 289-291, 2010.

DEWIR, Y. H. et al. Lipidperoxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia millii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 93-99, 2006.

DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, v. 182, p. 29-41, 2012.

DIOLA, V.; SANTOS, F. Fisiologia. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool - tecnologias e perspectivas**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2010. cap. 2, p. 25-49.

DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidativo defense system in plants. In: GUPTA, S. D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. cap. 9, p.178-203.

DUBROVSKY, J. G. Seed hydration memory in Sonoran Desert cacti and its ecological implication. **American Journal of Botany**, v. 83, p. 624-632, 1996.

EIRA, M. T. S.; MARCOS FILHO, J. M. Condicionamento osmótico de sementes de alface: II. Desempenho sob estresses hídrico, salino e térmico. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 12, n. 1, p. 28-45, 1990.

EMBRAPA. MARIN, F. R. **Árvore do conhecimento: cana-de-açúcar – Fenologia**. AGEITEC/EMBRAPA Disponível em:

<https://www.agenci.cnpia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_68_22122006154840.html> Acesso em: 19 dez. 2015.

FERNANDES, F. R. **Limpeza clonal de batata-doce: produção de matrizes com elevada qualidade fitossanitária**. Brasília: Embrapa, 2013. 8p. (Circular Técnica, 117).

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: TEARE, I. D; PEET, M. M. (Ed.). **Crop-water relations**. New York: Wiley-Interscience, 1983. p. 445-479.

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 263-285, 2002.

GERALD, L. T. S.; LEE, L. L. Biofábrica de plantas: por que biorreator? In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua, 2011. cap. 1, p.13-31.

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

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1998. cap. v. 1, p. 183-260.

GUPTA, V. et al. The water-deficit stress- and red-rot-related genes in *sugarcane*. **Functional Integrative Genomics**, v. 10, n. 2, p. 207-214, 2010.

HEYDECKER, W.; HIGGINS, J.; GULLIVER, R. L. Accelerated germination by osmotic seed treatment. **Nature**, v. 246, p.42-44, 1973.

JIMÉNEZ-ARIAS, D. et al. Priming effect of menadione sodium bisulphite against salinity stress in *Arabidopsis* involves epigenetic changes in genes controlling proline metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, v. 120, p. 23-30, 2015a.

JIMÉNEZ-ARIAS, D. et al. Treating seeds in menadione sodium bisulphite primes salt tolerance in *Arabidopsis* by inducing an earlier plant adaptation. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 23-30, 2015b.

JISHA, K. C.; PUTHUR, J. T. Halopriming of seeds imparts tolerance to NaCl and PEG induced stress in *Vigna radiate* (L.) wilczek varieties. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 20, n. 3, p.303-312, 2014.

JISHA, K. C.; VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. T. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 1381-1396, 2013.

KACPERSKA, A. Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? **Physiologia Plantarum**, v. 122, p. 159-168, 2004.

KAUR, S.; GUPTA, A. K.; KAUR, N. Seed priming increases crop yield possibly by modulating enzymes of sucrose metabolism in chickpea. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 19, p. 81-87, 2002.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2004. 531p.

LEMOS, E. E. P. Micropropagação de plantas por biorreatores. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. cap. 4, p. 83-119.

LEMOS, E. E. P. et al. Micropropagação de clones de banana cv. Terra em biorreator de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 482-487, dez. 2001.

LEMOS, E. E. P. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

LICHTENTHALER, H. K. El estrés y la medida del estrés en plantas. In: REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; SÁNCHEZ, A. **La Ecofisiología Vegetal – Una ciencia de síntesis**. Madrid: Thomson, 2004. cap. 2, p. 59-111.

LISAR, S. Y. S. et al. Water stress in plants: causes, effects and responses Seyed. In: RAHMAN, I. M. M.; HASEGAWA, H. **Water stress**. Croatia: Intech, 2012, cap. 1, p. 1-14.

MAGRO, F. J. et al. Biometria em cana-de-açúcar. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2011. 18p.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Axcel Books do Brasil, 2004. 344p.

MELO, G. M. et al. Pré-condicionamento *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) para tolerância ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 18, p.27-33, 2014.

MERCADO SUCROALCOOLEIRO. São Martinho, São Paulo, 02 set. 2015. Disponível em <http://ri.saomartinho.ind.br/saomartinho/web/conteudo_pt.asp?idioma=0&conta=28&tipo=25150>. Acesso em: 20 set. 2015.

MHAMDI, A. et al. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 27, p. 1-24, 2010.

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

MITTLER, R. et al. F. Reactive oxygen gene network of Plants. **Plant Science**, v. 9, p. 490-498, 2004.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.

MOREIRA, A. L. et al. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.

MULLINEAUX, P. M.; BAKER, N. R. Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? **Plant Physiology**, v. 154, p. 521-525, 2010.

MUNIR, N.; AFTAB, F. Enhancement of salt tolerance in sugarcane by ascorbic acid pretreatment. **African Journal of Biotechnolog**, v. 10, n. 80, p. 18362-18370, (2011).

MYLONA, P.V.; POLIDOROS, A. N. ROS regulation of antioxidant genes. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. cap.6, p.101-128.

NASCIMENTO, S. P. et al., Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 8, p.853-860, 2011.

NAWAZ, J. et al. Seed priming a technique. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 6, n. 20, p.1373-1381, 2013.

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

NORTHCUTT, C. et al. Germination in vitro, micropropagation, and cryogenic storage for three rare pitcher plants: *Sarracenia oreophila* (Kearney) wherry (Federally endangered), *S. leucophylla* Raf., and *S. purpurea* spp. *venosa* (Raf.) wherry. **Hort Science**, v. 47, n. 1, p.74-80, 2012.

OBERT, B. et al. Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 537-547, 2005.

OLIVEIRA, A. R.; BRAGA, M. B. **Florescimento e acamamento de cultivares de cana-de-açúcar submetidas a diferentes lâminas de irrigação**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011. 23p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 87).

OLIVEIRA, A. R.; BRAGA, M. B.; SANTOS, B. L. S. Produção de biomassa de cana-de-açúcar no Vale do São Francisco. **Revista Energia na Agricultura**. v. 29, n. 1, p. 14-21, 2014.

OSAKABE, Y. et al. Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 86, p. 1-8, 2014.

PANDOLFI, C.; MANCUSO, S.; SHABALAB, S. Physiology of acclimation to salinity stress in pea (*Pisum sativum*). **Environmental and Experimental Botany**. v. 84. p. 44-51. 2012.

PASTOR, V. et al. Primed plants do not forget. **Environmental and Experimental Botany**, v. 94, p. 46-56, 2013

PASTOR, V. et al. Preparing to fight back: generation and storage of priming compounds. **Frontiers in Plant Science**, v. 5 p. 1-12, 2014.

PATADE, V. Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Halopriming imparts tolerance to salt and PEG induced drought stress in sugarcane. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, n. 134, p. 24-28, 2009.

PATADE, V. Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Halopriming mediated salt and iso-osmotic PEG stress tolerance and, gene expression. profiling in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 9563-9572, 2012.

PATADE, V.,Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Better osmotic adjustment mediates salt and PEG stress tolerance in primed plants of contrasting cultivars of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 17, n. 4, p. 348-355, 2015.

PATADE, V. Y.; KUMARI, M.; AHMED, Z. Seed priming mediated germination improvement and tolerance to subsequent exposure to cold and salt stress in *Capsicum*. **Research Journal of Seed Science**, v. 4, n. 3, p. 125-136, 2011.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, set. 2003.

PITMAN, M. G.; LAUCHLI, A. Global impact of salinity and agricultural ecosystems. In: LAUCHLI, A.; LUTTGE, U. **Salinity: environment plants molecules**. Dordrecht: Kluwer, 2002, p. 3-20.

POTTERS, G.; HOREMANS, N.; JANSEN, M. A K. The cellular redox state in plant stress biology - A charging concept. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p.292-300, 2010.

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

QUAN, L-J. et al. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n.1 p. 2-18, 2008.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 3. ed. Lavras: Editora da Universidade Federal de Lavras, 2004. 472 p.

RIDESA – REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO. Catálogo Nacional de Variedades “RB” de cana-de-açúcar. Curitiba, 2010. 136p.

RODRIGUES, D.; ORTIZ, L.S. 2006. Em direção à sustentabilidade da produção de etanol de cana-de-açúcar no Brasil. Disponível em:

<http://www.vitaecivilis.org.br/anexos/etanol_sustentabilidade.pdf>.

Acesso em: 03 de junho de 2013.

RONSEIN, G.E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singleto: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p.563-568, 2006.

SANDAL, I.; BHATTACHARYA, A.; AHUJA, P. S. An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 65, p. 75-80, 2001.

SANTANA, M. J. et al. Efeitos da salinidade da água de irrigação na brotação e desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) e em solos com diferentes níveis texturais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1470-1476, 2007.

SCHEIDT, G. N. et al. Utilization of the biorreactor of imersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merrill. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p.37-43, nov. 2009a.

SCHEIDT, G. N. et al. Multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) em diferentes sistemas de cultivo. **Biociências**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 82-85, dez. 2009b.

SCHERER, R. F. J. et al., Effects of immersion system and gibberellic acid on the growth and acclimatization of micropropagated pineapple. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, p.66-71, 2015.

SEAGRI – Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária da Bahia. 2007. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/programas.asp?qact=viewprogrameprgid=49>>. Acesso em: 22 set. 2011.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidativo defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, p. 1-26, 2012.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1305-1319, 2002.

SILVA, A. M. F. et al. Limpeza clonal de mudas de videira infectadas por *Xanthomonas campestris* pv. viticola. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 316-319, 2013.

SILVA, M. A. et al. Fenologia da cana-de-açúcar. In: CRUSCIOL, C. A. C. et al. **Tópicos em ecofisiologia da cana-de-açúcar**. Botucaru: FEPAF, 2010. cap. 1. p. 8-21.

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

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, 704p.

SUZUKI, R. M. et al. Germinação e crescimento *in vitro* de *Cattleya bicolor* Lindley (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 37, n. 4, p.731-742, 2010.

TAKAYAMA, S.; MISAWA, M. Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. **Plant & Cell Physiology**, v. 22, n. 3, p. 461-467, 1981.

TAVILI, A. et al. Effects of priming techniques on seed germination and early growth characteristics of *Bromus tomentellus* L. and *Bromus inermis* L. Notulae. **Scientia Biologicae**, v. 2, n. 1, p. 104-108, 2010.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n. 24, p. 36-41, 2002. Disponível em:

<<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio24/biorreat.pdf>>.

Acesso em: 24 mar. 2014.

TEXEIRA, J. B. Biorreatores de imersão temporária – o futuro da produção industrial de plantas *in vitro*. In: GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. São Paulo: Antiqua, 2011. cap. 2, p.33-49.

TORRES, N. H. et al. Indústria sucroalcooleira: gestão de subprodutos. **Revista de Ciências Agro-ambientais**, v. 10, n. 2, p. 225-236, 2012.

TRANTAPHYLIDÈS, C. et al. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. **Plant Physiology**, v. 148, p. 960-968, 2008.

TRANTAPHYLIDÈS, C.; HAVAUX, M. Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 4, p. 219-229, 2009.

ULISSES, C. et al. Clonagem vegetal. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7. p. 86-91, 2010.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. “Metals, toxicity and oxidative stress,” **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 2005.

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

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

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p.1-23, 2010.

WORRAL, D. et al. Treating seeds with activators of plant defence generates longlasting priming of resistance to pests and pathogens. **New Phytologist**, v. 193, p.770-778, 2012.

CAPÍTULO I

Indução de tolerância a estresse salino em cana-de-açúcar por meio de *priming in vitro*¹

¹ O manuscrito que compõe o capítulo I será submetido ao periódico Plant Biology (Anexo)

Indução de tolerância a estresse salino em cana-de-açúcar por meio de *priming in vitro*

G. M. de Melo^{1*}, M. R. Barbosa¹, A. G. de Andrade², Terezinha R. Camara³

1 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Departamento de Química, Área Química Agrícola, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil. *Autor para correspondência: e-mail: gemimamelo@hotmail.com

2 Professor aposentado da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Área Química Agrícola, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil.

RESUMO

Como forma de promover rustificação das plantas e geração de respostas efetivas à ação de estresses abióticos, foi realizado um pré-condicionamento (*priming*) com cloreto de sódio (NaCl) em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, durante multiplicação *in vitro* em sistema de biorreatores de imersão temporária (BIT). O *priming* caracterizou-se por quatro períodos de imersão: 0, 12, 24 e 36 h (SP, P12, P24 e P36, respectivamente), em meio MS acrescido com 100 mM de NaCl. Posteriormente, as plantas foram aclimatizadas e submetidas a estresse salino gradativo: S0 = sem NaCl; S60 = 20→40→60 mM de NaCl e S100 = 20→60→100 mM de NaCl, acrescido à solução nutritiva. O aumento da concentração salina ocorreu a cada 10 dias, criando um estresse gradativo ao longo de 30 dias. Avaliou-se biomassa seca da parte aérea (BSPA), raízes (BSR) e perfilhos (BSP), taxa de crescimento relativo do diâmetro da parte aérea (TCRØ) e número de perfilhos (NP). Também foram determinados os teores de sódio (Na⁺), potássio (K⁺), cloreto (Cl⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA), além das atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT). O estresse salino não proporcionou redução da BSPA, BSR, BSP e TCRØ das plantas pré-condicionadas durante 24 h. O *priming* preveniu o acúmulo de íons tóxicos. A atividade da SOD, CAT e APX foi efetiva ao estresse salino, proporcionando manutenção dos níveis de H₂O₂, nas plantas pré-condicionadas durante 24 h, o que demonstra que o *priming* utilizado evitou o aumento do estresse oxidativo e favoreceu a tolerância à salinidade.

Palavras-chave *Saccharum*; pré-condicionamento; estresse oxidativo; malondialdeído; peróxido de hidrogênio; enzimas antioxidantes

INTRODUÇÃO

Fatores abióticos, como a salinidade prejudicam o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade das plantas, especialmente nas regiões áridas e semiáridas (Parihar *et al.* 2015). Visando melhorar o desempenho das culturas frente ao estresse abiótico, métodos de pré-condicionamento (*priming*) são utilizados para promover a rustificação das plantas, conferindo maior tolerância e assegurando a produção e qualidade dos produtos. O pré-condicionamento permite que a exposição prévia a um agente estressante estimule a planta a responder de forma mais efetiva a uma futura exposição (Bruce *et al.* 2007).

O intervalo entre a percepção durante a aplicação de um *priming* e a exposição a um novo estresse pode habilitar a planta a gerar e armazenar informações que permitam respostas mais rápidas e precisas ao estresse (Pastor *et al.* 2014). Essas respostas envolvem o acúmulo de proteínas sinalizadoras, fatores de transcrição e mecanismos de remodelação da cromatina (Conrath *et al.* 2006; Bruce *et al.* 2007). A aplicação de *priming* é bastante difundida em sementes (*seed priming*), proporcionando aumento da taxa germinativa (Atreya *et al.* 2009; Bakht *et al.* 2011), aumento da capacidade de tolerância à seca (Rivas *et al.* 2013) e tolerância ao estresse salino por cloreto de sódio (NaCl) (Patade *et al.* 2011). Em cana-de-açúcar já foram relatados tratamentos de aplicação de *priming* com NaCl em rebolos (Patade *et al.* 2009, 2015), em calos cultivados *in vitro* (Munir & Aftab 2011), como também em plantas cultivadas em sistema de biorreatores de imersão temporária, em trabalhos prévios do grupo (Melo *et al.* 2014).

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma planta glicófita, com moderada sensibilidade ao estresse salino. No Nordeste Brasileiro, a Zona da Mata é a região que apresenta as melhores condições climáticas para o desenvolvimento da agricultura canavieira e ultimamente, essa atividade vem se expandindo para regiões semiáridas, onde se desenvolve uma agricultura irrigada (Oliveira & Braga 2011). Contudo, essas regiões muitas vezes são afetadas pela crescente ocorrência de solos com sinais de salinização e a ocorrência de águas com elevados teores de sais (Cirilo *et al.* 2010).

Um dos principais fatores que afetam negativamente a produtividade das glicófitas é a salinidade, por comprometer os principais processos metabólicos dos vegetais (Munns & Tester 2008; Willadino & Camara 2010). Esse fato ocorre devido ao excesso de NaCl o qual provoca toxicidade pelo desequilíbrio osmótico e iônico em muitas espécies. Plantas como as glicófitas conseguem sobreviver em um solo contendo uma grande variedade de íons solúveis em sua solução, porém apenas algumas espécies conseguem sobreviver aos íons sódio, estes quando em elevadas concentrações são prejudiciais (Badar-uz-Zaman *et al.* 2012).

O excesso de íons sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) na solução do solo provocam inibição do crescimento (Bakht *et al.* 2011), isso porque quando em altas concentrações, esses íons provocam um desbalanço nutricional, produzindo relações extremas de $\text{Na}^+:\text{K}^+$, $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$, $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ e $\text{Cl}^-:\text{NO}_3^-$, o que pode danificar a estrutura e a composição das células vegetais (Evelin *et al.* 2012). Além disso, o acúmulo de sais nos cloroplastos pode exercer um efeito tóxico direto sobre os processos bioquímicos e fotoquímicos (Munns & Tester 2008).

A salinidade pode provocar o acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas, quando em baixas concentrações, participam de processos de sinalização importantes durante o crescimento, desenvolvimento e aclimatação ao estresse (Passaia & Margis-Pinheiro 2015), porém quando em altas concentrações proporcionam distúrbios metabólicos graves, que caracterizam o estresse oxidativo (Gil & Tuteja 2010).

Em compartimentos celulares onde as atividades metabólicas são altamente oxidantes, o oxigênio molecular (O_2), pode reagir com elétrons e originar ROS, na forma de radicais, como o superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), como também na forma molecular, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sharma *et al.* 2012). Para suportar o estresse oxidativo, impedindo que o mesmo provoque danos irreversíveis às células, as plantas utilizam mecanismos eficientes de defesa, formados por metabólitos antioxidantes e enzimas (You & Chan 2015). As enzimas antioxidantes podem ser encontradas nos diferentes compartimentos celulares e são essenciais para a manutenção adequada dos organismos, isso porque, contribuem para o controle das ROS em plantas, proporcionando um estágio de homeostase redox no sistema (Barbosa *et al.*, 2014). Com forma de manter essa homeostase, enzimas como a superóxido dismutase (SOD), age na dismutação do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, o que reduz os riscos de formação do radical OH^{\bullet} (Dinakar *et al.* 2012). Essa redução na formação do radical OH^{\bullet} é importante porque ele é considerado o radical mais reativo e por possuir um único elétron não emparelhado, pode reagir com o oxigênio no estado fundamental, podendo provocar à morte celular (Sharma *et al.* 2012). Em outra linha de defesa, enzimas como a ascorbato peroxidase (APX) e a catalase (CAT) estão envolvidas em mecanismos de eliminação do H_2O_2 (You & Chan 2015), molécula que pode se difundir através das membranas, podendo agir como sinalizadora do estresse ou promotora da morte celular (Quan *et al.* 2008).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a tolerância ao estresse salino gradativo em plantas de cana-de-açúcar aclimatizadas após micropropagação sob diferentes tempos de exposição ao *priming* com 100 mM de NaCl.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Para a montagem do experimento, foram selecionadas vinte plantas de cana-de-açúcar, da variedade RB867515, provenientes de cultivo *in vitro*, apresentando cerca de 4 cm de altura. As plantas foram submetidas a uma fase de multiplicação em sistema de biorreatores de imersão temporária (BIT), contendo um litro de meio de cultivo, composto pelos sais e vitaminas do meio MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,1 g L⁻¹ de inositol; 0,2 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP); 0,1 mg L⁻¹ de cinetina (KIN); 0,05 g L⁻¹ de ácido cítrico e 0,05 g L⁻¹ de ácido ascórbico.

Pré-condicionamento *in vitro* com cloreto de sódio (NaCl)

Durante a fase de multiplicação *in vitro*, as vinte plantas receberam tratamentos de pré-condicionamento (*priming*), caracterizados pela adição de 100 mM NaCl ao meio de cultivo, durante três períodos de imersão: 12 h, 24 h e 36 h (P12, P24 e P36, respectivamente), além do tratamento controle (SP). O ciclo de imersão diário, do BIT foi constituído por oito imersões a cada três horas, com duração de três minutos cada uma. As plantas permaneceram recebendo esse ciclo durante 21 dias. Após a fase de multiplicação, as plantas foram submetidas a uma fase de enraizamento em meio com composição similar ao meio de multiplicação, contendo 1 mg L⁻¹ de ácido α -naftalenoacético (ANA), sem a adição do NaCl, do BAP e da KIN, permanecendo nessas condições durante 30 dias.

Durante todo o período experimental *in vitro*, as plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por quatro tratamentos de *priming in vitro* (SP, P12, P24 e P36), sendo utilizadas quatro repetições, por tratamento.

Aclimatização das plantas

Após o cultivo *in vitro*, foram selecionadas cerca de 200 plantas de cada tratamento de *priming in vitro* e as mesmas foram aclimatizadas, separadamente, em bandejas de polipropileno com 98 células, contendo aproximadamente 35 cm³ de substrato comercial Carolina Soil[®] (Fig. 1). As plantas permaneceram em estufa com sistema de nebulização, durante 35 dias e após esse período, foram transplantadas para sacos de polietileno (capacidade

para 6 Kg) contendo 5 Kg de areia lavada, contendo brita na superfície, como forma de reduzir a evaporação e evitar a proliferação de microalgas. Nessa fase, as plantas permaneceram em estufa sem sistema de nebulização, onde foram fertirrigadas diariamente com uma solução nutritiva composta por $0,7428 \text{ g L}^{-1}$ de Kristalon® e $0,8400 \text{ g L}^{-1}$ de Calcinit®, durante 15 dias, antes da aplicação do estresse.

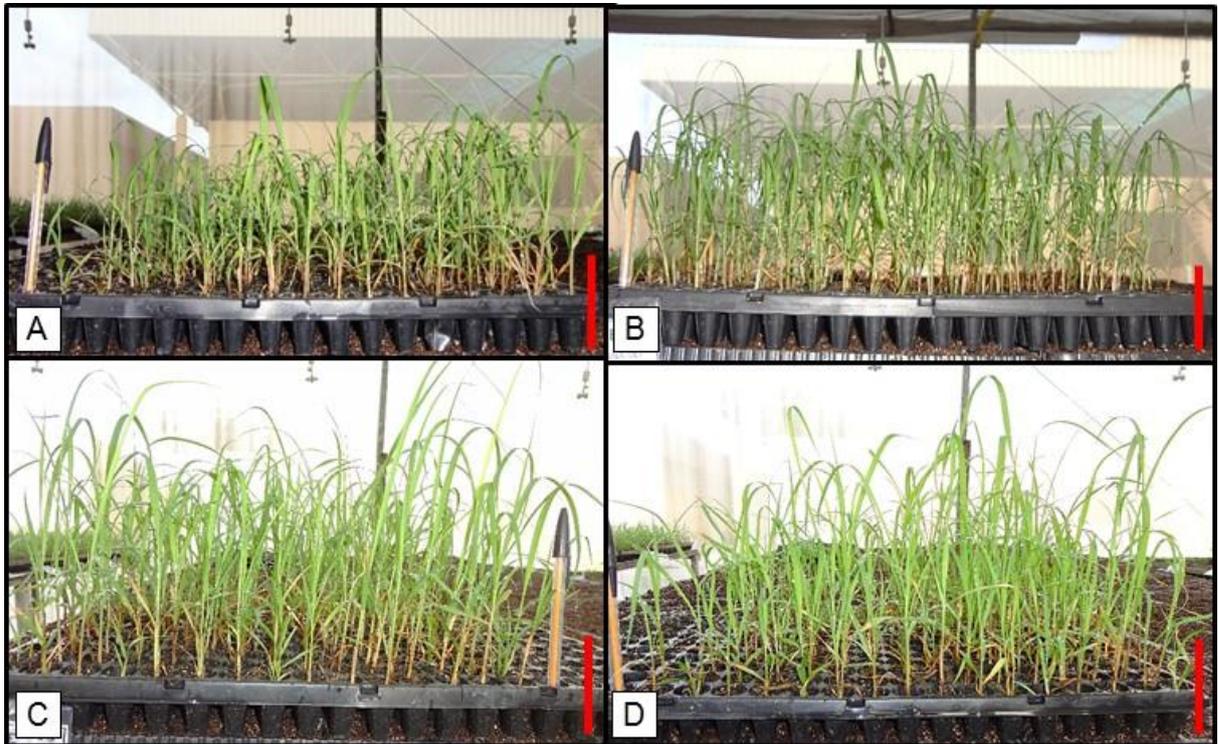


Fig. 1. Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 aos 15 dias de aclimatização. (A) Plantas provenientes do tratamento controle SP. (B) Plantas provenientes do *priming* P12 = 12 h. (C) Plantas provenientes do *priming* P24 = 24 h. (D) plantas provenientes do *priming* P36 = 36 h. Barra: 8 cm.

Aplicação de estresse salino *ex vitro*

Após a aclimatização, 12 plantas de cada tratamento de *priming in vitro*, foram submetidas a um experimento de indução de estresse salino, no qual, as mesmas receberam solução nutritiva com metade da força iônica, acrescida de NaCl. O experimento de estresse salino consistiu de um tratamento controle (S0), sem adição de sal na solução de fertirrigação, com condutividade elétrica (CE) de $1,20 \text{ dS m}^{-1}$ e dois tratamentos com aumento gradativo da concentração de NaCl: S60 = 20→40→60 mM de NaCl; CE de 3,49; 4,50 e $8,00 \text{ dS m}^{-1}$, respectivamente e S100 = 20→60→100 mM de NaCl; CE de 3,49; 8,00 e $11,28 \text{ dS m}^{-1}$, respectivamente. O aumento na concentração de NaCl ocorreu com um incremento de 20 mM (S60) ou de 40 mM (S100) a cada 10 dias, de forma a criar um estresse salino gradativo ao longo de 30 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, distribuído em um arranjo fatorial 4 x 3, constituído por quatro tratamentos de *priming in vitro* (SP, P12, P24 e P36) e três níveis salinos (S0, S60 e S100), sendo utilizadas quatro repetições por tratamento, durante o período de estresse *ex vitro*.

Avaliações biométricas e bioquímicas

Durante o período de estresse salino (30 dias), as variáveis de crescimento analisadas foram: número de perfilhos (NP) e taxa de crescimento relativo de diâmetro da parte aérea (TCRØ). A TCRØ foi calculada pela (Eq. 1):

$$TCRØ = \frac{L_n(\text{diâmetro final}) - L_n(\text{diâmetro inicial})}{T2 - T1} \quad (1)$$

em que L_n é o logaritmo neperiano; T1 e T2 são os tempos de cultivo, inicial e final, respectivamente (Cairo *et al.* 2008).

Após o período de estresse salino, amostras de parte aérea, perfilhos e raízes foram coletadas, acondicionados em sacos de papel previamente identificados e levados à estufa de ventilação forçada à temperatura de 70°C até peso constante. Em balança analítica foram determinadas as biomassas secas da parte aérea (BSPA), das raízes (BSR) e dos perfilhos (BSP) e posteriormente as amostras foram trituradas em moinho do tipo Wiley. Foram determinados os teores de sódio (Na^+) e potássio (K^+) através de fotometria de chama e para determinação de cloreto (Cl^-) foi utilizada a titulometria do nitrato de prata pelo método de Mohr (Malavolta *et al.* 1989).

As análises biométricas e as análises de teores de Na^+ , K^+ e Cl^- foram realizadas nas quatro repetições, durante o cultivo em estufa.

As variáveis bioquímicas analisadas na parte aérea, perfilhos e raízes foram: teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de malondialdeído (MDA); atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidase (APX – EC 1.11.1.11) e catalase (CAT – EC 1.11.1.6).

Amostras de folhas frescas foram homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%, contendo aproximadamente 20% de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g durante 15 minutos a -4°C. Esse extrato foi utilizado para determinação do H_2O_2 , do qual foi coletado 200 µL do sobrenadante, sendo adicionado 800 µL de iodeto de potássio (KI) a 1 M e 200 µL de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) a 1 M. As amostras permaneceram em gelo e no escuro durante uma hora. Após este período, as

amostras foram retiradas do gelo e mantidas em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm (Alexieva *et al.* 2001). O mesmo extrato foi utilizado para a quantificação do MDA, de acordo com Heath & Packer (1968). Foi coletado 250 µL de sobrenadante, ao qual foi adicionado 1 mL de solução composta por ácido tricloroacético (TCA – 20%) e ácido tiobarbitúrico (TBA – 0,5%). A solução foi mantida em banho-maria a 95°C durante 30 minutos, passando por um rápido resfriamento por 10 minutos. Antes da leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm, as amostras foram centrifugadas por mais 10 minutos a 10.000 g.

Foram homogeneizadas em nitrogênio líquido, 500 mg de folhas frescas com 2 mL de tampão de extração composto por fosfato de potássio monobásico e dibásico, ambos a 1M (pH 7,5) e 20% de polivinilpirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g a uma temperatura de -4°C durante 20 minutos (modificado de Zeraik *et al.* 2008). O sobrenadante foi armazenado em freezer a -20°C para posterior determinação das proteínas solúveis totais e das atividades enzimáticas.

A determinação do teor de proteínas solúveis seguiu o método descrito por Bradford (1976), no qual as soluções padrões (100 µl) e os extratos das amostras (100 µl) receberam 2 ml do reagente coomassie brilliant blue. Os padrões foram preparados com albumina de soro bovino (BSA) e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595 nm, sendo o conteúdo de proteína expresso em mg de proteína solúvel g⁻¹ de matéria fresca.

A análise da atividade da CAT seguiu a metodologia proposta por Berris & Sizer (1952). A reação foi constituída por uma solução contendo 1390 µL do tampão fosfato de potássio monobásico 100 mM (pH 7,0), 50 µL do extrato enzimático e 60 µL de peróxido de hidrogênio (0,5 M). As leituras foram feitas no tempo zero e aos 60 segundos, a uma temperatura de 25°C em espectrofotômetro a 240 nm. A atividade enzimática foi determinada pela decomposição do H₂O₂ durante 1 min e expressa em mmol H₂O₂ mg⁻¹ proteína min⁻¹.

A atividade da APX foi realizada mediante a metodologia de Nakano & Asada (1981). A reação foi constituída por uma solução contendo 1335 µL de tampão fosfato de potássio monobásico a 50 mM (pH 6,0), 75 µL do extrato enzimático, 75 µL de ácido ascórbico a 10 mM e 15 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 100 mM. As leituras foram realizadas no tempo zero e aos 60 segundos, em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade enzimática foi expressa em mmol Ascorbato mg⁻¹ proteína min⁻¹ e calculada usando o coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ de ascorbato.

A atividade da superóxido dismutase foi determinada seguindo a metodologia de Giannopolitis & Reis (1977). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 560 nm e a atividade da SOD expressa em U SOD mg⁻¹proteína.

Para as análises bioquímicas foram selecionadas três repetições, de cada tratamento, com as quais foram feitas leituras em triplicatas para cada uma.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade, utilizando o programa de análises estatísticas Assistat 7.7 (Assis & Silva 2013).

RESULTADOS

Biometria e biomassa

Os tratamentos de *priming* por 12 h (P12) e 24 h (P24) preveniram a redução da BSPA e da TCRØ de plantas submetidas ao estresse salino gradativo em estufa, independente da concentração de NaCl. A produção de BSR das plantas do P24 também apresentaram os mesmos resultados (Tabela 1). A ausência do pré-condicionamento (SP) *in vitro* bem como a aplicação do tratamento de *priming* mais prolongado (P36), por outro lado, resultaram em queda na produção de BSPA (Fig. 2), bem como na TCRØ quando as plantas aclimatizadas foram expostas ao estresse salino mais severo (100 mM de NaCl).

Tabela 1. Biomassa seca da parte aérea (BSPA) e das raízes (BSR), e taxa de crescimento relativo do diâmetro da parte aérea (TCRØ) de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl).

<i>Priming</i> <i>in vitro</i>	BSPA (g)			BSR (g)			TCRØ (mm mm ⁻¹ dia ⁻¹)		
	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60	S100
SP	9,57aA	7,79aAB	6,47aB	4,54aA	3,07aAB	2,55aB	0,053aA	0,046aAB	0,044aB
P12	9,28aA	7,36aA	7,39aA	4,23aA	3,24aAB	2,49aB	0,048aA	0,042aA	0,041aA
P24	11,08aA	8,62aA	8,14aA	3,78aA	3,20aA	2,93aA	0,050aA	0,043aA	0,044aA
P36	9,26aA	8,07aAB	5,08aB	2,83aA	2,76aA	2,00aA	0,052aA	0,045aAB	0,037aB

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade (minúscula entre tratamentos de *priming in vitro* e maiúscula entre tratamentos de estresse salino gradativo).

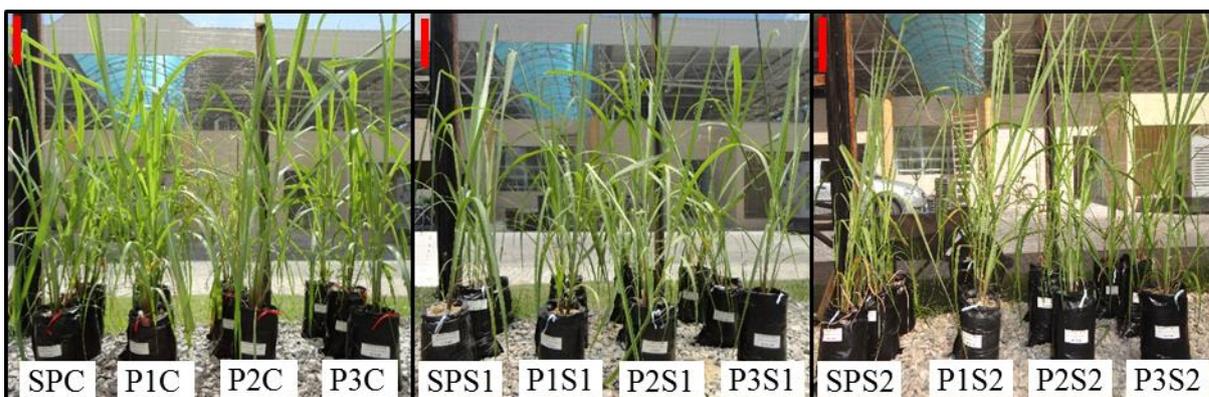


Fig. 2. Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) aos 30 dias de estresse salino gradativo (SPC, P1C, P2C e P3C = controle; SPS1, P1S1, P2S1 e P3S1 = 20→40→60 mM de NaCl – S60); SPS2, P1S2, P2S2 e P3S2 = 20→60→100 mM de NaCl – S100). Barra: 12 cm

As plantas da variedade RB867515, que não passaram pelo pré-condicionamento, quando submetidas ao estresse salino gradativo, apresentaram uma menor quantidade de perfilhos e redução da BSP (Tabela 2). Por outro lado, o estresse salino não afetou o perfilhamento e a BSP das plantas dos tratamentos P24 e P36 (Tabela 2).

Tabela 2. Número de perfilhos (NP) e biomassa seca dos perfilhos (BSP) de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl).

<i>Priming in vitro</i>	NP			BSP (g)		
	S0	S60	S100	S0	S60	S100
SP	5,00aA	3,00aB	4,25aAB	6,40abA	3,16aB	3,44aB
P12	4,50aA	5,00aA	3,75aA	7,97aA	2,78aB	3,13aB
P24	3,50aA	4,25aA	3,25aA	5,60abA	5,11aA	4,26aA
P36	3,25aA	4,50aA	3,75aA	4,64bA	3,60aA	2,57aA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade (minúscula entre tratamentos de *priming in vitro* e maiúscula entre tratamentos de estresse salino gradativo).

Teores de Na⁺, K⁺ e Cl⁻

Quanto maior a concentração salina na solução nutritiva de irrigação (S100), maior foi a concentração de íons Na⁺ na parte aérea, nas raízes e nos perfilhos provenientes de plantas dos tratamentos SP e P36 (Tabela 3). A parte aérea das plantas submetidas ao *priming* durante 12 e 24 h (P12 e P24), tiveram aumento no teor de Na⁺ com a adição de 60 mM de NaCl, o qual foi mantido sob estresse com 100 mM de NaCl, nas raízes, esse padrão de aumento só foi verificado naquelas provenientes do pré-condicionamento durante 12 h (P12) (Tabela 3). Perfilhos provenientes de plantas submetidas aos tratamentos com *priming in vitro*, apresentaram uma menor concentração de íons Na⁺, quando expostos a uma concentração salina mais elevada (Tabela 3).

A aplicação do estresse salino (S60 e S100) aumentou a concentração de K⁺ na parte aérea das plantas, dos tratamentos SP e P12 (Tabela 3). Nas raízes das plantas do SP e P24 o teor de K⁺ foi menor em relação ao controle, nos dois níveis salinos (Tabela 3). Nos perfilhos, o efeito do *priming* sobre o teor de K⁺ foi significativo apenas no tratamento controle (S0) observando-se um acúmulo nas plantas do P12. Com o estresse salino essas plantas apresentaram redução da concentração desse cátion, mas mantiveram teores correspondentes às plantas dos demais tratamentos de *priming* (Tabela 3).

A relação Na⁺/K⁺ na parte aérea e na raiz aumentou de acordo com o aumento da concentração salina (Tabela 3). Os perfilhos provenientes dos tratamentos P12, P24 e P36 apresentaram uma maior relação Na⁺/K⁺, quando submetidos a 100 mM de NaCl, ou seja, estresse salino mais severo (Tabela 3).

O estresse salino promoveu aumento no teor Cl⁻ na parte aérea das plantas que não foram pré-condicionadas (Tabela 3). Os tratamentos de *priming* (P12, P24 e P36) preveniram o acúmulo de Cl⁻ na parte aérea das plantas que receberam até 60 mM de NaCl. O mesmo padrão foi obtido nas plantas pré-condicionadas durante 12 e 24 h e submetidas a 100 mM de NaCl. Nas raízes e nos perfilhos o aumento da concentração salina promoveu aumento nos íons Cl⁻.

Tabela 3. Teores de sódio (Na⁺), potássio (K⁺), relação Na⁺/K e cloreto (Cl⁻) da parte aérea, raízes e perfilhos de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl).

Parte aérea									
<i>Priming</i>	Na ⁺ (g Kg ⁻¹)			K ⁺ (g Kg ⁻¹)			Relação Na ⁺ /K ⁺		
	<i>in vitro</i>	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60
SP	0,51aC	2,53aB	4,13aA	34,77aB	39,54aA	40,11aA	0,01aC	0,06aB	0,10aA
P12	0,78aB	2,80aA	3,07aA	34,77aB	37,83aA	40,11aA	0,02aB	0,07aA	0,08aA
P24	1,05aB	2,80aA	3,33aA	36,71aB	37,26aB	40,40aA	0,03aB	0,08aA	0,08aA
P36	1,05aC	2,80aB	4,40aA	37,26aB	38,12aB	41,82aA	0,03aB	0,07aA	0,10aA
Raízes									
<i>Priming</i>	Na ⁺ (g Kg ⁻¹)			K ⁺ (g Kg ⁻¹)			Relação Na ⁺ /K ⁺		
	<i>in vitro</i>	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60
SP	9,47aC	17,73bB	29,47aA	15,90aA	6,78aB	11,05aB	0,60aB	2,83aA	2,96aA
P12	13,47aB	26,27aA	26,27aA	11,05aA	7,64aA	11,05aA	1,22aC	3,44aA	2,39aB
P24	10,27aC	21,73abB	28,13aA	12,19aA	7,07aB	11,34aAB	0,85aB	3,08aA	2,59aA
P36	8,13aC	22,80abB	32,40aA	11,05aA	6,21aB	14,47aA	0,76aC	3,76aA	2,25aB
Perfilhos									
<i>Priming</i>	Na ⁺ (g Kg ⁻¹)			K ⁺ (g Kg ⁻¹)			Relação Na ⁺ /K ⁺		
	<i>in vitro</i>	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60
SP	1,47aC	9,20aB	14,53aA	42,11bA	42,39aA	39,54aA	0,35aC	0,22aB	0,37aA
P12	2,27aB	7,87abA	7,07bA	52,65aA	43,54aB	41,54aB	0,43aB	0,18abA	0,17bA
P24	0,67aB	7,07abA	8,67bA	42,11bA	41,25aA	39,26aA	0,02aB	0,17abA	0,22bA
P36	0,67aC	4,93bB	8,93bA	41,82bA	39,83aA	42,68aA	0,02aC	0,12bB	0,21bA
Cl ⁻ (mg g ⁻¹)									
<i>Priming</i>	Parte aérea			Raízes			Perfilhos		
	<i>in vitro</i>	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60
SP	21,86aB	27,33aA	25,70aA	12,33aC	19,79aB	26,96bA	19,35aC	27,25aB	32,79bA
P12	20,53abA	22,30bA	22,31bA	11,08aB	25,48aA	28,29bA	23,56aC	28,14aB	33,38abA
P24	18,91bA	21,27bA	21,27bA	13,07aC	22,38aB	35,16aA	19,43aC	27,63aB	37,30aA
P36	21,86aA	21,05bA	23,34abA	10,86aC	23,19aB	29,84abA	21,42aA	25,11aA	22,75cA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade (minúscula entre tratamentos de *priming in vitro* e maiúscula entre tratamentos de estresse salino gradativo).

Teores de MDA, H₂O₂ e atividade enzimática do sistema de defesa antioxidativo

O teor de MDA na parte aérea das plantas do tratamento SP foi superior ao das plantas dos demais tratamentos de *priming*, quando submetidas a 60 mM de NaCl (Tabela 4). Quando a concentração salina chegou a 100 mM de NaCl o teor de MDA elevou-se na parte aérea de todas as plantas, independente do *priming* (Tabela 4).

Nas raízes, praticamente não se observou efeito dos tratamentos sobre o teor de MDA (Tabela 4). Os perfilhos provenientes de plantas pré-condicionadas apresentaram maior concentração de MDA, quando submetidos ao estresse salino (Tabela 4).

Tabela 4. Teor de malondialdeído (MDA) da parte aérea, perfilhos e raízes de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl).

<i>Priming in vitro</i>	MDA (nmol g ⁻¹ matéria fresca)								
	Parte aérea			Raízes			Perfilhos		
	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60	S100
SP	3,27abB	4,80aA	5,07aA	2,30abA	2,43aA	2,27aA	2,60aA	2,63bA	3,03cA
P12	3,87aB	4,17abB	5,50aA	2,03abA	2,37aA	2,60aA	2,93aB	4,23aA	4,33abA
P24	2,07bB	3,03bB	5,03aA	2,63aA	2,53aA	2,37aA	3,53aB	3,97aA	3,83bcA
P36	4,00aB	3,80abB	5,83aA	1,67bA	2,17aA	2,13aA	3,17aB	3,20abB	5,10aA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade (minúscula entre tratamentos de *priming in vitro* e maiúscula entre tratamentos de estresse salino gradativo).

A aplicação do estresse salino aumentou o teor de H₂O₂ na parte aérea das plantas que não foram pré-condicionadas e submetidas a 60 mM de NaCl. A geração de H₂O₂ na parte aérea de plantas submetidas ao S60, foi menor naquelas pré-condicionadas durante 12 e 24 h (P12 e P24), quando comparadas com àquelas dos tratamentos SP e P36 (Tabela 5). Nas raízes, o pré-condicionamento durante 24h (P24) proporcionou um menor teor de H₂O₂ (Tabela 5).

Nos perfilhos provenientes das plantas dos tratamentos P24 e P36 não foi verificado aumento no teor de H₂O₂, entretanto, nos perfilhos das plantas do tratamento SP o estresse salino proporcionou aumento no teor dessa ROS (Tabela 6).

As plantas tratadas com 100 mM de NaCl durante 12 e 24 h (P12 e P24) e que receberam até 60 mM de NaCl durante o estresse *ex vitro*, apresentaram menor atividade da SOD. Também foi observado que as plantas do P24 não demonstraram aumento significativo em sua atividade

com aplicação de NaCl (Tabela 5). Quando comparado parte aérea e raízes, verifica-se que o aumento da concentração salina proporcionou uma alta atividade da SOD nos órgãos radiculares (Tabela 5).

As raízes provenientes dos tratamentos SP, P12 e P24 obtiveram uma menor atividade da SOD, quando comparadas ao tratamento P36 (Tabela 5). O estresse salino também não promoveu aumento na atividade da SOD, nos perfilhos provenientes das plantas tratadas com *priming* durante 12 h (P12) e os perfilhos provenientes de todos os tratamentos de *priming* apresentaram uma menor atividade dessa enzima, quando submetidos a 100 mM de NaCl (Tabela 6).

Os resultados da atividade da APX mostram respostas diferentes à aplicação de rega salina, dentro dos tratamentos de pré-condicionamento (Tabela 5). Comparando os valores de atividade da APX entre a parte aérea das plantas dos tratamentos de *priming*, verifica-se que aquelas pré-condicionadas durante 24 h apresentaram menor ativação da APX, quando submetidas ao estresse salino. A atividade da CAT, por sua vez, não foi afetada pelo tratamento salino na parte aérea das plantas pré-condicionadas, mas aumentou nas plantas não pré-condicionadas, quando receberam fertirrigação com 60 mM de NaCl, apresentando um decréscimo de aproximadamente 3%, quando a concentração chegou a 100 mM de NaCl (Tabela 5).

Nas raízes pré-condicionadas durante 36 h (P36), assim como a SOD, a atividade da APX e da CAT também apresentaram os maiores valores, quando submetidas aos dois níveis de estresse salino (Tabela 5). Entretanto, nos perfilhos a atividade da APX e da CAT foi menos expressiva nesse tratamento (Tabela 6). A maior atividade da APX foi verificada nos perfilhos provenientes de plantas pré-condicionadas durante 12 e 24 h, para os dois níveis salinos, enquanto que a CAT só apresentou aumento na atividade naquelas submetidas a até 60 mM de NaCl e provenientes de tratamento de *priming in vitro*, durante 24 h (Tabela 6).

Tabela 5. Teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) na parte aérea e raízes de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl).

Parte aérea												
<i>Priming in vitro</i>	H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹ matéria fresca)			SOD (U SOD mg ⁻¹ proteína)			APX (mmol AsA mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)			CAT (mmol H ₂ O ₂ mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)		
	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60	S100
	SP	0,867aB	1,033abA	0,967cAB	5,65aC	7,59aB	10,45aA	2,27bB	3,51bA	3,51aA	0,151aB	0,225aA
P12	0,900aB	0,967bcB	1,500aA	4,51abB	2,98bB	9,34aA	2,85abB	5,11aA	3,43aB	0,178aA	0,207aA	0,163aA
P24	0,500bC	0,800cB	1,400aA	5,48aA	2,90bB	3,85bAB	3,63aA	1,99cB	1,41bB	0,167aA	0,103bA	0,143aA
P36	0,533bB	1,167aA	1,167bA	3,16bB	8,50aA	4,65bB	2,80abA	3,26bA	3,20aA	0,185aA	0,245aA	0,191aA

Raízes												
<i>Priming in vitro</i>	H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹ matéria fresca)			SOD (U SOD mg ⁻¹ proteína)			APX (mmol AsA mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)			CAT (mmol H ₂ O ₂ mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)		
	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60	S100
	SP	0,207bA	0,207bcA	0,230bA	18,90bA	29,68bA	40,05bA	31,37dB	45,55cA	45,14bA	2,18bcA	2,19 bA
P12	0,343aB	0,493aA	0,323bB	13,31bB	21,46bAB	50,11bA	72,42bA	57,31bB	32,82cC	2,94abA	1,74 bB	2,09 bB
P24	0,097cA	0,107cA	0,107cA	13,32bA	37,75bA	34,73bA	44,06cA	46,05cA	26,47cB	1,75cA	1,87 bA	0,94 cB
P36	0,333aB	0,297bB	0,680aA	131,63aA	94,74aB	132,15aA	154,29aB	120,13aC	187,96aA	3,40aA	4,08 aA	3,56 aA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade (minúscula entre tratamentos de *priming in vitro* e maiúscula entre tratamentos de estresse salino gradativo).

Tabela 6. Teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) nos perfilhos de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* (SP = sem *priming*; P12 = 12 h; P24 = 24 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl).

Perfilhos												
<i>Priming in vitro</i>	H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹ matéria fresca)			SOD (U SOD mg ⁻¹ proteína)			APX (mmol AsA mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)			CAT (mmol H ₂ O ₂ mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)		
	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60	S100
	SP	0,667aB	1,100aA	1,033aA	24,31aB	25,10aB	34,65aA	18,70aA	12,02bB	16,65bA	0,342bA	0,229cB
P12	0,733aB	1,067aA	0,867aAB	7,10bA	9,95bA	15,08bA	13,02bB	24,91aA	25,06aA	0,399bA	0,370bA	0,304aB
P24	0,667aA	0,900aA	0,700aA	16,17abB	28,27aA	19,14bAB	14,82abB	22,98aA	21,61aA	0,523aA	0,468aA	0,272abB
P36	0,633aA	0,833aA	0,867aA	11,69bA	19,62abA	13,02bA	13,91bA	11,36bA	10,51cA	0,253cA	0,266cA	0,235bA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade (minúscula entre tratamentos de *priming in vitro* e maiúscula entre tratamentos de estresse salino gradativo).

DISCUSSÃO

Biometria e biomassa

A pré-exposição a estresses abióticos, pode alterar as respostas metabólicas subsequentes, melhorando a tolerância das plantas a futuras exposições (Ding *et al.* 2013). Trabalhos de pré-condicionamento com 100 mM de NaCl em rebolos de cana-de-açúcar, registraram efeito benéfico sobre a biomassa fresca, a altura da planta e a largura das folhas, quando estas foram submetidas a 15 dias de estresse osmótico induzido por 150 mM de NaCl (-0,7 MPa) ou polietilenoglicol (PEG 8000 20 % p/v) (Patade *et al.* 2009; Patade *et al.* 2012). Resultados semelhantes, quanto à biomassa seca de parte aérea e raízes de *Sorghum bicolor*, foram observados quando as sementes da espécie foram pré-condicionadas com 80 µM de acetato de sódio tri-hidratado (CH₃COONa·3H₂O) (Daffalla *et al.* 2014). Os dados de BSPA, BSR e TCRØ (Tabela 1) demonstram que o *priming* P24 foi efetivo e conseguiu evitar um efeito negativo em relação ao crescimento dessas plantas, quando expostas ao estresse salino. Essas respostas são alcançadas porque os procedimentos de pré-condicionamento ou *priming* “habilitam” a planta para enfrentar um evento de estresse secundário após a exposição a um estresse primário (Conrath *et al.* 2006; Kilian *et al.* 2012). De acordo com Jaskiewicz *et al.* (2011), essa capacidade de apresentar respostas positivas, quando expostas a um novo ciclo de estresse seria possível devido à ativação da expressão de genes através da modificação de histonas.

Um estresse suave ou severo é reconhecido por diferentes elementos do sistema de detecção das células vegetais, responsáveis pela indução da via de ativação de genes de resposta ao estresse, a partir de moléculas sinalizadoras (Kacperska 2004). A intensidade e o tempo de exposição a um fator de estresse podem desencadear respostas positivas ou negativas (Lichtenthaler 2004). Essas respostas foram confirmadas através do menor acúmulo da BSPA e da TCRØ (Tabela 1) das plantas dos tratamentos SP e P36, o que evidencia, que a intensidade e/ou duração do tratamento pré-condicionante é um aspecto que precisa ser levado em conta no estabelecimento de um protocolo de *priming*. Em outras espécies como *Vigna radiata* a aplicação do *priming* também não se mostrou eficiente para manter a biomassa das plantas, quando as mesmas foram submetidas ao estresse salino (Jisha & Puthur 2014).

Os tratamentos de *priming* P24 e P36 conseguiram manter o perfilhamento e a BSP das plantas submetidas ao estresse salino (Tabela 2), o que corrobora com os resultados obtidos com a variedade RB98710 (Melo *et al.* 2014). Segundo os autores, o perfilhamento é uma característica genotípica que realça a sensibilidade ao estresse salino, uma vez que apenas os

tratamentos de *priming in vitro* por 24 e 36 h preveniram o efeito deletério da salinidade *ex vitro* com até 60 mM de NaCl durante 30 dias. A emissão de perfilhos pela cana-de-açúcar começa em torno dos 40 dias após o plantio e pode ter duração de até 120 dias, sendo considerada uma das fases de crescimento características da cultura. Juntamente com o crescimento do colmo, o perfilhamento destaca-se como uma das fases mais exigentes em água e ambas as fases constituem a formação propriamente dita da cultura canavieira (Ramesh 2000). O pré-condicionamento com NaCl pode, portanto, ser uma alternativa importante para assegurar um bom perfilhamento em mudas de variedades mais sensíveis ao estresse salino nesse estágio de crescimento.

Teores de Na⁺, K⁺ e Cl⁻

As raízes são os primeiros órgãos vegetais a entrar em contato com os íons tóxicos. Algumas espécies evitam a absorção excessiva de sais por esses órgãos e outras controlam os níveis salinos em tecidos especializados de armazenamento, os quais tendem a acumular água para compensar a concentração excessiva de sais no meio intracelular (García *et al.* 2008). Quando comparada a concentração de Na⁺ entre raízes e parte aérea, observa-se que as raízes apresentaram maiores teores desse íon (Tabela 3). Esses resultados demonstram que a variedade apresentou uma retenção desses íons tóxicos nas células radiculares. Reduzir a translocação de Na⁺ para a parte aérea é considerado um mecanismo de tolerância ao estresse salino, possivelmente realizado através da recuperação de Na⁺ do xilema por transportadores HKT1 (Bojórquez-Quintal *et al.* 2014). Esse tipo de mecanismo evita que o excesso de íons tóxicos promova danos nas folhas, tais como a degradação dos pigmentos fotossintéticos (Brés *et al.* 2016), distúrbios nas respostas estomáticas, inibição da fotossíntese, perda de água e necrose (Hasanuzzaman *et al.* 2013). Por outro lado, a maior concentração de Na⁺ nas raízes também pode ser explicada pelo fato desse elemento ter uma mobilidade menor que o Cl⁻, este por ser um ânion livre, possui uma maior mobilidade, o que conseqüentemente, aumenta o seu transporte na planta (Marschner, 1995).

O potássio é um elemento essencial para as plantas, tendo como funções a síntese de proteínas, o equilíbrio de cargas e a osmorregulação (Wakeel *et al.* 2011). A sua deficiência, promove a inibição do crescimento devido ao importante papel que esse íon desempenha na manutenção da turgescência celular (Ranade-Malvi 2011). Portanto, a manutenção do nível de potássio, observada nas plantas pré-condicionadas é uma resposta positiva da planta em condições de estresse salino e pode ter evitado a redução do crescimento quando as mesmas foram expostas à salinidade (Tabela 1). Resultados significativos em relação à altura, área

foliar, matéria fresca e seca também foram obtidos em sementes de duas cultivares de *Zea mays* L. (Azam e Sarhad yellow), pré-condicionadas com NaCl (6 dS m⁻¹) e submetidas a um estresse com cloreto de cálcio (CaCl₂) (Bakht *et al.* 2011). Esses autores também relatam que as plantas pré-condicionadas da cultivar Azam, acumularam 10% menos Na⁺ e 12,5% mais K⁺. Para muitas espécies, manter os níveis de íons K⁺ em detrimento dos íons Na⁺, conservando a relação K⁺/Na⁺ é mais importante que simplesmente manter uma baixa concentração de Na⁺ no citoplasma (Himabindu *et al.* 2016). Para as plantas, evitar o excesso de Na⁺ no citoplasma é essencial para manter o equilíbrio osmótico e proteger o metabolismo enzimático, uma vez que esse tipo de íon inibe a ação de muitas enzimas (Hussain *et al.* 2016). Em variedades de *Oryza sativa*, o aumento na relação Na⁺/K⁺ na parte aérea e nas raízes provocou sinais de desequilíbrio nutricional, o que promoveu reduções significativas no peso seco das raízes e do caule (Hakim *et al.* 2014). O aumento desse tipo de relação também é beneficiado pela similaridade existente entre o raio iônico hidratado do Na⁺ e do K⁺, o que dificulta a discriminação entre esses dois cátions pelas proteínas transportadoras e conseqüentemente pode promover uma competição pelos sítios de absorção, entre os íons tóxicos e outros nutrientes, especialmente o K⁺ (Heidari & Jamshid 2010; Willadino & Camara 2010).

O excesso de íons Cl⁻ pode promover sintomas de toxicidade nas folhas, devido à degradação da clorofila, e assim como o Na⁺, esse íon também pode limitar o crescimento vegetal (Tavakkoli *et al.* 2010). Portanto, a redução da BSPA e da TCRØ (Tabela 1), nas plantas que não foram pré-condicionadas pode ter sido promovido pelo acúmulo de Cl⁻ (Tabela 3) quando as plantas foram submetidas ao estresse salino. Por outro lado, o menor acúmulo desse ânion, na parte aérea das plantas pré-condicionadas (Tabela 3), pode ter prevenido a redução da BSPA, BSR e TCRØ, sobretudo no tratamento P24 (Tabela 1). Tratamentos de pré-condicionamento em *Zea mays* L. também proporcionaram um menor teor de íons Na⁺ e Cl⁻ nas plantas pré-condicionadas e mantiveram o crescimento das plantas, que apresentaram ganho na massa seca das partes aéreas e raízes, quando submetidas a um estresse de 80 mM de NaCl (Gondim *et al.* 2011).

Teores de MDA, H₂O₂ e atividade enzimática do sistema de defesa antioxidativo

Um dos agravantes do estresse salino é o aumento na geração de ROS, que podem ocasionar um estresse oxidativo secundário, quando o sistema de defesa não é eficientemente ativado, podendo ocorrer danos às membranas celulares decorrentes da peroxidação lipídica (Gil & Tuteja 2010). Os ácidos graxos poli-insaturados dos lipídios de membrana são os principais alvos das ROS (Apel & Hirt 2004). Como observado no presente trabalho, o estresse

salino, promoveu aumento na peroxidação lipídica, detectado através do aumento no teor de MDA, na parte aérea das plantas que não foram pré-condicionadas *in vitro* (Tabela 4). Aumento no teor de MDA devido ao estresse salino já foi relatado nas variedades RB855536 e RB867515 de cana-de-açúcar (Murad *et al.* 2014) e em outras espécies glicófitas como *Vigna radiata* (Nahar *et al.* 2015) e *Zea mays* L. (Shtereva *et al.* 2015). Entretanto, tratamentos de *priming* podem prevenir a geração desse produto de oxidação e evitar a peroxidação lipídica. Em cana-de-açúcar, a aplicação do *priming* durante 24h preveniu o dano oxidativo nas plantas submetidas a até 60 mM de NaCl (Tabela 4). Resultados semelhantes foram obtidos em plantas de *Sorghum bicolor* (L.), quando as sementes foram pré-condicionadas com 150 mM de NaCl e expostas a um estresse salino de 300 mM de NaCl durante sete dias (Yan *et al.* 2015). Da mesma forma, o teor de MDA foi controlado com outros agentes de pré-condicionamento ao estresse salino, como o uso de redox haloprining, composto por nitroprussiato de sódio (SNP) diluído em 0,2 mM de água do mar (CE = 9,25 dS m⁻¹) em sementes de *Triticum aestivum* L. (Maswada & El-Kader 2016) e o pré-condicionamento em plantas de *Oryza sativa* com sulfeto de hidrogênio (H₂S) (Mostofa *et al.* 2015).

O estresse salino não promoveu aumento significativo do nível de peroxidação lipídica nas raízes da variedade RB867515 (Tabela 4). Os lipídios de membrana podem ser degradados quando há um excesso de ROS como o oxigênio singleto (¹O₂) e o radical [•]OH (Sharma *et al.* 2012). Embora não participe da peroxidação de lipídios de membrana, o H₂O₂ é capaz de reagir com o radical [•]O₂⁻ e formar o [•]OH, este é altamente reativo, capaz de penetrar membranas e reagir, indiscriminadamente, com ácidos graxos poli-insaturados dos lipídios, acarretando graves danos às membranas celulares (Gill & Tuteja 2010). Apesar do [•]OH não ter sido quantificado no presente estudo, o baixo teor de MDA sugere, que o teor desse radical era baixo, uma vez que a atividade da SOD e o teor de H₂O₂ nas raízes não apresentaram aumento significativo entre os tratamentos salinos (Tabela 5). Raízes de cultivares de *Oryza sativa*, quando submetidas a estresse salino, apresentaram respostas distintas em relação ao teor de MDA. A cultivar sensível à salinidade apresentou aumento gradual no nível de peroxidação lipídica, enquanto que na cultivar resistente não houve aumento (Demiral & Turkan 2005). Respostas semelhantes em diferentes cultivares de *Oryza sativa* também foram obtidas por Tu *et al.* (2014). De acordo com Demiral & Turkan (2005), um menor nível de peroxidação lipídica nas raízes também sugere uma melhor proteção contra danos oxidativos sob estresse salino.

O H₂O₂, em função do seu teor no tecido vegetal, pode promover o desenvolvimento da planta e a resistência a estresses ambientais, isso porque a molécula age sinalizando a existência de estresses bióticos e abióticos (Quan *et al.* 2008). O controle no nível endógeno de H₂O₂ na parte aérea das plantas dos tratamentos P12 e P24 coincidiu com os maiores valores de produção

de BSPA e TCRØ no P12 e BSPA, BSR e TCRØ no P24 (Tabela 1). Também foi possível observar que os teores de H₂O₂ apresentaram uma tendência semelhante aos teores de MDA. Destaca-se novamente o tratamento de *priming in vitro* P24, no qual foi gerado menos H₂O₂ até a concentração salina S60 e não se registrou peroxidação lipídica (Tabela 4), aliado à manutenção do crescimento (Tabela 1). Nas raízes, o tratamento P24 e, nos perfilhos, o P24 juntamente com o P36 induziram um menor teor de H₂O₂ (Tabela 5 e 6), o que provavelmente estimulou respostas condizentes quanto ao acúmulo de BSR e BSP (Tabela 1 e 2), sem redução devido ao estresse salino em estufa. Um bom desenvolvimento das raízes em condições de salinidade é uma característica interessante porque quanto maior o sistema radicular, maior será o volume de solo explorado para a captação de água e nutrientes (Medeiros *et al.* 2014). Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os observados em plantas de *Oryza sativa*, quando submetidas a *priming* com H₂S, o qual promoveu o controle nos níveis de H₂O₂, MDA, manteve o crescimento das plantas, como também a massa fresca e seca, quando as plantas foram submetidas a 150 mM de NaCl (Mostofa *et al.* 2015).

O excesso de H₂O₂ pode desencadear estresse oxidativo, porque é capaz de inativar enzimas, devido à oxidação dos grupos tiol (Gill & Tuteja 2010), limitar o crescimento e o desenvolvimento das plantas, o que conseqüentemente reduz a produtividade das culturas (Choudhury *et al.* 2013). O acúmulo de H₂O₂ na parte aérea (Tabela 5), assim como nos perfilhos (Tabela 6), das plantas do tratamento SP quando submetidas ao estresse salino provavelmente afetou a BSPA, BSR, TCRØ (Tabela 1), NP e BSP (Tabela 2). Da mesma forma os dados evidenciam a sobrecarga do tratamento de pré-condicionamento aplicado durante toda a fase de multiplicação (P36), cujas plantas apresentaram maior concentração de H₂O₂ associado a um menor crescimento (Tabela 1).

Muitos estudos têm elucidado a importância de manter um nível antioxidante favorável na adaptação das plantas ao estresse salino (Wang *et al.* 2013), portanto, o significado das análises de atividades de enzimas que possuem ação detoxificante contra as ROS, deve buscar traçar uma correlação precisa entre a atividade enzimática e a adaptação das plantas, interpretando os resultados com base na resposta global da planta ao estresse por sal, nos níveis celulares das ROS e nas atividades de outras enzimas envolvidas no sequestro dessas espécies reativas (Abogadallah 2010). Considerando os baixos teores de MDA e H₂O₂ (Tabela 5) na parte aérea das plantas do tratamento P24, observa-se que o pré-condicionamento *in vitro* com NaCl foi capaz de habilitá-las para enfrentar um nível intermediário de estresse salino *ex vitro* (60 mM de NaCl), sem aumentar os níveis de estresse oxidativo, demonstrado pelas baixas atividades das enzimas SOD, CAT e APX (Tabela 5) e sem reduzir o crescimento (Tabela 1). Apesar de alguns trabalhos correlacionarem alta atividade de enzimas antioxidantes à eficiência

no controle do estresse oxidativo e tolerância à salinidade (Barakat *et al.* 2013), cada uma destas enzimas realiza uma função específica e sua atividade deve ser atribuída a um papel específico na desintoxicação das ROS, ou seja, a atividade antioxidante eficiente não significa necessariamente uma forte regulação positiva de todo o conjunto de enzimas antioxidantes e vice-versa (Abogadallah 2010). Resultados distintos foram obtidos em plantas de cana-de-açúcar, provenientes de rebolos pré-condicionados durante 8 dias, com 100 mM de NaCl e submetidas a um estresse salino com 150 mM de NaCl, as quais não apresentaram diferenças significativas entre as variáveis de crescimento e as atividades expressadas pela SOD, CAT e APX não foram eficientes para controlar o estresse, o que pode ter contribuído para um maior dano oxidativo (Patade *et al.* 2015).

A CAT é responsável pela dismutação do H_2O_2 , atuando sobre duas moléculas desse substrato (Sharma *et al.* 2012). A geração celular do H_2O_2 ocorre principalmente nos cloroplastos e mitocôndrias, além dos peroxissomos, principal sítio de localização da CAT. Nos peroxissomos o H_2O_2 pode ser resultante de reações catalisadas por oxidases como glicolato oxidase (metabolismo fotorrespiratório) e acil-CoA oxidase (da β -oxidação de ácidos graxos), ou ainda por ação da SOD peroxissomal (Mhamdi *et al.* 2012). Em plantas C3 a fotorrespiração é a principal via de geração de H_2O_2 em células fotossintéticas, mas em se tratando de uma planta C4 como a cana-de-açúcar, a contribuição da via fotorrespiratória nesse processo é apenas residual (Foyer & Noctor 2009). Dessa forma, a atividade da CAT não se apresenta nessas plantas com incrementos de atividade expressivos frente ao estresse salino na intensidade e duração impostas neste trabalho (Tabela 5 e 6). Resultados similares foram registrados em plantas da variedade RB867515 tratadas com 25, 50, 75 e 100 mM de NaCl por 30 dias, as quais apresentaram uma tendência a aumento na atividade da CAT, mas que não se mostrou significativo (Willadino *et al.* 2011). Apesar da abrangente noção de que enzimas antioxidantes são fortemente reguladas positivamente em resposta ao estresse, ainda não está claro se este é o caso da CAT e de outros constituintes foliares (Mhamdi *et al.* 2012). Apesar dos registros de maior ativação da CAT em condições de estresse salino (Abogadallah *et al.* 2010; Barakat *et al.* 2013), há também evidências de uma regulação negativa pelo aumento da intensidade do estresse ou a manutenção da atividade sem alteração significativa (Mhamdi *et al.* 2012; Huang *et al.* 2014), como registrado nesse trabalho.

Tendo como função indispensável, o transporte de água e nutrientes para toda a planta, as raízes também possuem como função a fixação da planta no solo. Nesse momento ela torna-se o órgão com maior contato com os fatores bióticos e abióticos provenientes do solo, sendo o primeiro órgão a ser afetado (Zhang *et al.* 2013). Durante o estresse salino vários processos bioquímicos e fisiológicos são desencadeados nas plantas e isso pode interferir no crescimento

radicular e na atividade enzimática (Maia *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2013). Assim, espera-se que a raiz seja o primeiro órgão a promover respostas (Medeiros *et al.* 2014), que irão auxiliar na recuperação do crescimento radicular e nas atividades metabólicas após a redução do estresse (Guo *et al.* 2015). Considerando-se o teor de Na^+ , os valores observados nas raízes são invariavelmente superiores aos da parte aérea (Tabela 3), chegando a atingir teores dez vezes maiores do que na parte aérea de plantas de vários tratamentos. Isso explica o fato de todos os valores de atividades enzimáticas obtidos das raízes foram superiores em relação aos da parte aérea dessas plantas. O aumento da atividade enzimática nas raízes (Tabela 5) mostra que a ação conjunta dessas enzimas preveniu a peroxidação lipídica, evidenciado pelo controle dos níveis de MDA (Tabela 4). Entre os tratamentos de *priming*, observa-se que as plantas do tratamento P24, quando submetidas ao estresse salino (S60 e S100) apresentaram baixa atividade da SOD, APX e CAT e menor teor de H_2O_2 (Tabela 5), o que pode ter refletido positivamente nas variáveis de crescimento das plantas desse tratamento (Tabela 1). Fica evidente mais uma vez, que o pré-condicionamento *in vitro* durante 24h (P24) conseguiu equilibrar as respostas do sistema antioxidante de maneira a evitar danos oxidativos e no crescimento das plantas. Resultados distintos foram obtidos com a cultivar Pitiúba de *Vigna unguiculata* L. Walp, na qual a redução na atividade da CAT e da APX e o aumento na peroxidase de fenóis (POX) na raiz pode ter promovido reduções no alongamento desse órgão, quando as plantas foram submetidas a 100 mM da NaCl (Maia *et al.* 2012).

A “memória” do estresse pode ser preservada por curtos períodos, quando depende da meia-vida de proteínas, RNAs e metabólitos; porém quando envolve processos epigenéticos, como a metilação do DNA e modificações das histonas, a preservação da memória do estresse pode ocorrer por períodos mais longos (Chinnusamy & Zhu 2009). Em alguns casos a “memória” da experiência do estresse permanece no epigenoma do organismo, que sofreu o estresse e se essa “memória” promover respostas à descendência do organismo pré-condicionado, o *priming* epigenético é dito transgeracional (Tricker 2015). Por esses motivos, o efeito do *priming* é capaz de ser transmitido para a progênie (Bruce *et al.* 2007). No presente trabalho, o contato direto dos perfilhos com a planta mãe durante toda a fase de cultivo *ex vitro*, possivelmente conferiu algum tipo de sinalização, que habilitou e aprimorou as respostas do seu sistema de defesa. Essa sinalização pode ter transmitido o efeito do *priming* para os perfilhos, porém de forma muito sucinta. Esse efeito promoveu o funcionamento do sistema de defesa antioxidativo dos perfilhos, que foi efetivo em prevenir reduções na quantidade de perfilhos provenientes de plantas pré-condicionadas, bem como na BSP, de tratamentos como o P24 e P36, quando submetidos ao estresse salino (Tabela 2), porém não foi suficiente para evitar a peroxidação lipídica (Tabela 4). Em *Arabidopsis thaliana*, o efeito do *priming* foi

passado para a progênie das plantas pré-condicionadas com ácido β -aminobutírico, o que proporcionou uma melhor proteção contra o ataque do patógeno *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Slaughter *et al.* 2012).

De acordo com as respostas obtidas no trabalho é possível inferir que a aplicação de *priming in vitro* com NaCl, durante 24 h, se destacou como melhor. O mesmo favorece a capacidade de enfrentamento ao estresse salino gradativo de até 60 mM de NaCl em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, durante 30 dias de estresse, com manutenção do crescimento, controle do nível de H₂O₂ e da peroxidação lipídica em função da atividade das enzimas antioxidantes. Esses resultados demonstram que o pré-condicionamento *in vitro* pode ser uma prática de baixo custo na produção comercial de mudas micropropagadas, necessitando de informações adicionais sobre o desenvolvimento das plantas em condições de campo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia/FACEPE pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa de doutorado e ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste/CETENE pela infraestrutura.

REFERÊNCIAS

- Abogadallah G.M., (2010) Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling e Behavior*, **5**(4), 369–374.
- Assis E., Silva F.A.Z. (2013). Assisat 7.7 beta. DEAG-CTRN-UFCEG, Campina Grande.
- Alexieva V., Sergiev I., Mapelli S., Karanov E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, **24**, 1337–1344.
- Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 373–379.
- Atreya A., Vartak V., Bhargava S. (2009) Salt *priming* improves tolerance to desiccation stress and to extreme salt stress in *Bruguiera cylindrica*. *International Journal of Integrative Biology*, **6**(2), 68–73.
- Badar-uz-Zaman, A.A., Hyder S.I., Arshadullah M., Bhatti S.U. (2012) Potassium chloride as a nutrient seed primer to enhance salt-tolerance in maize. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **47**(8), 1181–1184.

- Bakht J., Shafi M., Jamal Y., Sher H. (2011) Response of maize (*Zea mays* L.) to seed *priming* with NaCl and salinity stress. Spanish Journal of Agricultural Research, **9**, 252–261.
- Barakat N., Laudadio V., Cazzato E., Tufarelli V. (2013) Antioxidant potential and oxidative stress markers in wheat (*Triticum aestivum*) treated with phytohormones under salt-stress condition. International Journal of Agriculture & Biology, **15**(5), 843–849.
- Barbosa M.R., Silva M.M.A., Willadino L., Ulisses C., Camara T.R. (2014) Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. Ciência Rural, **44**(3), 453–460.
- Berris L.S.J.R., Sizer I.W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry, **195**(1), 133–140.
- Bojórquez-Quintal E., Velarde-Buendía A., Ku-González A., Carillo-Pech M., Ortega-Camacho D., Echevarría-Machado I., Pottosin I., Martínez-Estévez M. (2014) Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.): Proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation. Frontiers in Plant Science, **5**(605), 1–14.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, **72**, 248–254.
- Brés W., Bandurska H., Kupka A., Niedziela J., Fraszczak B. (2016) Responses of *Pelargonium* (*Pelargonium x hortorum* L.H. Bailey) to long-term salinity stress induced by treatment with different NaCl doses. Acta Physiologiae Plantarum, **38**, 1–26.
- Bruce T.J.A., Matthes M.C., Napier J.A., Pickett JA (2007) Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. Plant Science, **173**, 603–608.
- Cairo P.A.R., Oliveira L.E.M., Mesquita A.C. (2008) Análise de crescimento de plantas, UESB, Vitória da Conquista.
- Chinnusamy V., Zhu J-K. (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. Current Opinion Plant Biology, **12**, 1–7.
- Choudhury S., Panda P., Sahoo L., Panda S.K. (2013) Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. Plant Signaling e Behavior, **8**, 1–6.
- Cirilo J.A., Montenegro S.M.G.L., Campos J.N.B. (2010) A questão da água no semiárido brasileiro. In: Bicudo C.E.M., Tundisi J.G., Scheuenstuhl M.C.B. (ed) Águas do Brasil análises estratégicas, 1ed. Instituto de Botânica, São Paulo, pp 81–91.

- Conrath U., Beckers G.J.M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M-A., Pieterse C.M.J., Poinssot B., Pozo M.J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L., Mauch-Mani B. (2006) *Priming*: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**(10), 1062–1071.
- Daffalla H.M., Hassan M.M., Osman M.G., Eltayeb A.H., Dagash Y.I., Gani M.E.A. (2014) Effect of seed *priming* on early development of *Sorghum* (*Sorghum bicolor* L. Moench) and *Striga hermonthica* (Del.) Benth. *International Scholarly Research Notices*, **2014**, 1–8.
- Demiral T., Turkan I. (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, **53**, 247–257.
- Dinakar C., Djilianov D., Bartels D. (2012) Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science*, **182**, 29–41.
- Ding Y., Liu N., Virilouvet L., Riethoven J-J., Fromm M., Avramova Z. (2013) Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, **13**(229), 1–11.
- Evelin H., Giri B., Kapoor R. (2012) Contribution of *Glomus intraradices* inoculation to nutrient acquisition and mitigation of ionic imbalance in NaCl-stressed *Trigonella foenum-graecum*. *Mycorrhiza*, **22**(3), 203–207.
- Foyer C.H., Noctor G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, **11**(4), 861–905.
- García M., Jáuregui D., Medina E. (2008) Adaptaciones anatómicas foliares en especies de agiospermas que crecen en la zona costera del Estado Falcón (Venezuela). *Acta Botánica Venezuelica*, **31**(1), 291–306.
- Giannopolitis C.N., Reis S.K. (1977) Superoxide dismutases. *Plant Physiology*, **59**, 309–314.
- Gill S.S., Tuteja N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**, 909–930.
- Gondim F.A., Gomes-Filho E.G., Marques E.C., Prisco J.T. (2011) Efeitos do H₂O₂ no crescimento e acúmulo de solutos em plantas de milho sob estresse salino. *Revista Ciência Agronômica*, **42**(2), 373–381.
- Guo W-Q., Zhang P-T., Li C-H., Yin J-M., Han X-Y. (2015) Recovery of root growth and physiological characters in cotton after salt stress relief. *Chilean Journal of Agricultural Research*, **75**(1), 85–91.

- Kacperska A. (2004) Sensor types in signal transduction pathways in plant cells responding to abiotic stressors: do they depend on stress intensity? *Physiologia Plantarum*, **122**, 159–168.
- Kilian J., Peschke F., Berendzen K.W., Harter K., Wanke D. (2012) Prerequisites, performance and profits of transcriptional profiling the abiotic stress response. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1819**(2), 166–175.
- Hakim M.A., Juraimi A.S., Hanafi M.M., Ismail M.R., Rafii M.Y., Islam M.M., Selamat A. (2014) The effect of salinity on growth, ion accumulation and yield of rice varieties. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, **24**(3), 874–885.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Fujita M. (2013) Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In: Ahmad P., Azooz M.M., Prasad M.N.V. (ed) *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*, Springer, New York, pp 25–87.
- Heath R.L., Packer L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **125**, 189–198.
- Heidari M., Jamshid P. (2010) Interaction between salinity and potassium on grain yield, carbohydrate content and nutrient uptake in pearl millet. *Journal of Agricultural and Biological Science*, **5**(6), 39–46.
- Himabindu Y., Chakradhar T., Reddy M.C., Kanygin A., Redding K.E., Chandrasekhara T. (2016) Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. *Environmental and Experimental Botany*, **124**, 39–63.
- Huang C.J., Wei G., Jie Y., Wang L., Zhou H., Ran C., Huang Z.J.H, Anjum S.A. (2014) Effects of concentrations of sodium chloride on photosynthesis, antioxidative enzymes, growth and fiber yield of hybrid ramie. *Plant Physiology and Biochemistry*, **76**, 86–93.
- Hussain M.I., Lyra D., Farooq M., Nikoloudakis N., Khalid N. (2016) Salt and drought stresses in safflower: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, **36**(4), 1–31.
- Jaskiewicz M., Conrath U., Peterhänsel C. (2011) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *Scientific Report*, **12**, 50–55.
- Jisha K.C., Puthur J.T. (2014) Halopriming of seeds imparts tolerance to NaCl and PEG induced stress in *Vigna radiata* (L.) Wilczek varieties. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **20**(3), 303–312.
- Lichtenthaler H.K. (2004) El estrés y la medida del estrés en plantas. In: Reigosa M.J, Pedrol N, Sánchez A (ed) *La ecofisiología vegetal – una ciencia de síntesis*, Thomson, Madrid, pp 59–111.

- Maia J.M., Ferreira-Silva S.L., Voigt E.L., Macêdo C.E.C., Ponte L.F.A. Silveira J.A.G. (2012) Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. *Acta Botanica Brasilica*, **26**(2), 342–349.
- Malavolta E., Vitti G.C., Oliveira S.A. (1989) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, Piracicaba. 201p.
- Marschner H. (1995) Mineral nutrition of higher plant, 2 ed, Academy, New York. 889p.
- Maswada H.F., El-Kader N.I.K. (2016) Redox haloprimering: a promising strategy for inducing salt tolerance in bread wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **202**, 37–50.
- Medeiros C.D., Ferreira Neto J.R.C., Oliveira M.T., Rivas R., Pandolfi V., Kido E.A., Baldani J. I. Santos M. G. (2014) Photosynthesis, antioxidant activities and transcriptional responses in two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, **36**, 447–459.
- Melo G.M., Barbosa M.R., Dias A.L.F., Willadino L., Camara T.R. (2014) Pré-condicionamento *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) para tolerância ao estresse salino. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **18**, 27–33.
- Mhamdi A., Noctor G., Baker A. (2012) Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **525**, 181–194.
- Mostofa M.G., Saegusa D., Fujita M., Tran L-S.P. (2015) Hydrogen sulfide regulates salt tolerance in rice by maintaining Na⁺/K⁺ balance, mineral homeostasis and oxidative metabolism under excessive salt stress. *Frontiers in Plant Science*, **6**(1055), 1–14.
- Munir N., Aftab F. (2011) Enhancement of salt tolerance in sugarcane by ascorbic acid pretreatment. *African Journal of Biotechnology*, **10**(80), 18362–18370.
- Munns R., Tester M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 651–81.
- Murad A.M., Molinari H.B.C., Magalhães B.S., Franco A.C., Takahashi F.S.C., Oliveira-Júnior N. G., Franco O. L., Quirino B. F. (2014) Physiological and proteomic analyses of *Saccharum* spp. grown under salt stress. *PLoS ONE*, **9**(6), 1–12.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473–497.
- Nahar K., Hasanuzzaman M., Alam M.M., Fujita M. (2015) Roles of exogenous glutathione in antioxidant defense system and methylglyoxal detoxification during salt stress in mung bean. *Biologia Plantarum*, **59**(4), 745–756.

- Nakano Y., Asada K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, **22**, 867–880.
- Oliveira A.R., Braga M.B. (2011) Florescimento e acamamento de cultivares de cana-de-açúcar submetidas a diferentes lâminas de irrigação. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Semiárido, Petrolina.
- Parihar P., Singh S., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 4056–4075.
- Passaia G., Margis-Pinheiro M. (2015) Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells. *Plant Science*, **234**, 22–26.
- Pastor V., Balmer A., Gamir J., Flors V. Mauch-Mani B. (2014) Preparing to fight back: generation and storage of *priming* compounds. *Plant Physiology*, **5**, 1–12.
- Patade V.Y., Bhargava S., Suprasanna P. (2009) Halopriming imparts tolerance to salt and PEG induced drought stress in sugarcane. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **134**, 24–28.
- Patade V.Y. Kumari M., Ahmed Z. (2011) Seed *priming* mediated germination improvement and tolerance to subsequent exposure to cold and salt stress in Capsicum. *Research Journal of Seed Science*, **4**(3), 125–136.
- Patade V.Y., Bhargava S., Suprasanna P. (2012) Halopriming mediated salt and iso-osmotic PEG stress tolerance and, gene expression profiling in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Molecular Biology Reports*, **39**, 9563–9572.
- Patade V.Y., Bhargava S., Suprasanna P. (2015) Better osmotic adjustment mediates salt and PEG stress tolerance in primed plants of contrasting cultivars of sugarcane. *Sugar Tech*, **17**(4), 348-355.
- Quan L-J., Zhang B., Shi W-W., Li H-Y. (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**(1), 2–18.
- Ramesh P. (2000) Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **185**, 83–89.
- Ranade-Malvi U. (2011) Interaction of micronutrients with major nutrients with special reference to potassium. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, **24**(1), 106–109.
- Rivas R., Oliveira M.T., Santos M.G. (2013) Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, **63**, 200–208.

- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidativo defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, **2012**, 1–26.
- Shtereva L.A., Vassilevska-Ivanova R.D., Karceva T.V. (2015) Effect of salt stress on some sweet corn (*Zea mays* L. var. *saccharata*) genotypes. *Archives of Biological Science*, **67**(3), 993–1000.
- Slaughter A., Daniel X., Flors V., Luna E., Hohn B., Mauch-Mani B. (2012) Descendants of primed *Arabidopsis* plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiology*, **158**, 835–843.
- Tavakkoli E., Rengasamy P., McDonald G.K. (2010) High concentrations of Na⁺ and Cl⁻ ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, **61**(15), 4449–4459.
- Tricker P.J. (2015) Transgenerational inheritance or resetting of stress-induced epigenetic modifications: two sides of the same coin. *Frontiers in Plant Science*, **6**(699), 1–6.
- Tu Y., Jiang A., Gan L., Hossain M., Zhang J., Peng B., Xiong Y., Song Z., Cai D., Xu W., Zhang J., He Y. (2014) Genome duplication improves rice root resistance to salt stress. *Rice*, **7**(15), 1–13.
- Wakeel A., Farooq M., Qadir M., Schubert S. (2011) Potassium substitution by sodium in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **30**, 401–413.
- Wang X., Hou C., Liu J., He W., Nan W., Gong H., Bi Y. (2013) Hydrogen peroxide is involved in the regulation of rice (*Oryza sativa* L.) tolerance to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, **35**, 89–900.
- Willadino L., Camara T. (2010) Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. *Enciclopédia Biosfera*, **6**(11), 1–19.
- Willadino L., Oliveira Filho R.A.O., Silva Junior E.A.S., Gouveia Neto A., Camara T.R.C. (2011) Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. *Revista Ciência Agronômica*, **42**(2), 417–422.
- Yan K., Xu H., Cao W., Chen X. (2015) Salt *priming* improved salt tolerance in sweet sorghum by enhancing osmotic resistance and reducing root Na⁺ uptake. *Acta Physiologiae Plantarum*, **37**(203), 1–10.
- You J., Chan Z. (2015) ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 1–15.

Zeraik A.E., Souza F.S., Fatibelho-Filho O., Leite O.D. (2008) Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Química Nova*, **31**, 731–73.

Zhang L., Chen B., Zhang G., Li J., Wang Y., Ment Y., Zhou Z. (2013) Effect of soil salinity, soil drought, and their combined action on the biochemical characteristics of cotton roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, **35**, 3167–3179.

CAPÍTULO II

Pré-condicionamento *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) para tolerância ao estresse salino¹

¹ O Manuscrito que compõe o capítulo II foi submetido ao II INOVAGRI International Meeting e publicado na Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.



Pré-condicionamento *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) para tolerância ao estresse salino¹

Gemima M. de Melo², Marta R. Barbosa³, André L. de F. Dias⁴,
Lilia Willadino⁵ & Terezinha R. Camara⁶

¹ Trabalho selecionado do II INOVAGRI International Meeting, realizado de 13 a 16 de abril de 2014, Fortaleza - CE, Brasil

² UFRPE, Recife, PE. E-mail: gemimamelo@hotmail.com (Autor correspondente)

³ UFRPE, Recife, PE. E-mail: martaribeiro21@hotmail.com

⁴ CETENE, Recife, PE. E-mail: andre.dias@cetene.gov.br

⁵ UFRPE, Recife, PE. E-mail: willadino.lilia@gmail.com

⁶ UFRPE, Recife, PE. E-mail: teca.camara@gmail.com

Palavras-chave:

RB98710
priming *in vitro*
salinidade
cloreto de sódio

RESUMO

Avaliou-se a capacidade de adaptação à salinidade de mudas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 após pré-condicionamento (*priming*) *in vitro* com cloreto de sódio (NaCl). O experimento foi conduzido no período de maio a outubro de 2013. Plantas foram micropropagadas em biorreatores de imersão temporária, com tratamentos de *priming* caracterizados pela adição de 25 mM de NaCl, durante 0, 12, 24 e 36 horas. Concluídos os períodos de *priming*, as plantas foram cultivadas em meio de enraizamento sem NaCl, aclimatizadas e submetidas a tratamento salino gradativo: S0 = sem NaCl; S1 = regas com 20→40→60 mM de NaCl acrescido à solução nutritiva, durante 30 dias. Procedeu-se à supressão do NaCl e avaliaram-se as plantas 15 dias depois. As variáveis foram: matéria seca da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR), número de perfilhos, estimativa de clorofila (Chl), conteúdo hídrico relativo e dano de membrana. As plantas pré-condicionadas não reduziram a MSPA quando submetidas ao NaCl. O efeito do estresse salino sobre a MSR foi anulado nas plantas submetidas ao *priming* por 24 h. O *priming* favoreceu o perfilhamento das plantas dos tratamentos por 24 ou 36 h. A recuperação após o estresse, avaliado 15 dias após a supressão do NaCl, não diferiu entre plantas submetidas ou não ao *priming*. De acordo com os resultados, o *priming* utilizado na variedade RB98710, pode favorecer a tolerância à salinidade.

Key words:

RB98710
priming *in vitro*
salinity
sodium chloride

Preconditioning *in vitro* of sugarcane (*Saccharum* spp.) seedlings to salt stress tolerance

ABSTRACT

The capacity of adaptation to the salinity of seedlings of sugarcane variety RB98710 after *priming in vitro* with sodium chloride (NaCl) was evaluated. The experiment took place in the period May to October 2013. Plants were micropropagated in temporary immersion bioreactor with *priming* treatments characterized by the addition of 25 mM NaCl, for 0, 12, 24 and 36 hours. Over periods of *priming*, the plants were grown in rooting medium without NaCl, acclimatized and underwent gradual salt stress: S0 = no NaCl; waterings with S1 = 20 → 40 → 60 mM NaCl added to the nutrient solution for 30 days. Proceeded to the suppression of NaCl and plants were evaluated after 15 days for shoot (SDM) and root dry matter (RDM), tillers number, chlorophyll estimation (Chl), relative water content and membrane damage were evaluated. The preconditioned plants did not reduce the SDM when submitted to salt stress. The effect of salt stress on the RDM was null in the plants of the *priming* for 24 h. Preconditioning favored the tillering of the plants of the treatments 24 or 36 h. The recovery after the stress, assessed 15 days after the removal of NaCl did not differ between whether or not subject to *priming* plants. According to the results the *priming* used in the RB98710 variety may favor tolerance to salinity.

INTRODUÇÃO

O aumento das áreas degradadas pelo excesso de sais no solo é constante. Estima-se que o avanço da salinidade possa levar à perda de 30% das terras agricultáveis dentro dos próximos 25 anos e que até o ano 2050 esse prejuízo chegue a 50% (Ghosh et al., 2011).

O estresse salino é um dos principais fatores que reduz a produtividade das glicófitas e compromete os principais

processos metabólicos dos vegetais (Munns & Tester, 2008; Willadino & Camara, 2010). O excesso de cloreto de sódio (NaCl) provoca toxicidade, desequilíbrio osmótico e iônico em muitas espécies e, como consequência desses efeitos primários pode ocorrer um estresse secundário de caráter oxidativo (Munns & Tester, 2008; Pandolfi et al., 2012).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma glicófitas, com moderada sensibilidade ao estresse salino. No Nordeste, a Zona da Mata é a região que apresenta as melhores condições

climáticas para o desenvolvimento da agricultura canavieira, porém essa atividade vem se expandindo para regiões semiáridas (Oliveira & Braga, 2011) e o êxito dessa expansão depende, em parte, do plantio de variedades que tolerem as condições adversas do Semiárido e sejam capazes de manter uma boa produtividade.

A aplicação de métodos de pré-condicionamento (*priming*) é uma estratégia que pode promover a rustificação das plantas, proporcionando maior tolerância aos fatores de estresse abiótico. O *priming* consiste em uma exposição prévia a um fator de estresse biótico ou abiótico com o objetivo de deixar a planta mais tolerante quando exposta a um novo ciclo de estresse (Patade et al., 2009). Essa técnica é bastante difundida em sementes (*seed priming*) por promover atividades pré-metabólicas, proporcionando aumento da velocidade da taxa germinativa e maior uniformidade das plântulas cultivadas sob condições adversas (Nascimento, 2004; Atreya et al., 2009; Bakht et al., 2011). A aplicação de tratamentos de *priming* com NaCl em rebolos de cana-de-açúcar reduziu os efeitos inibitórios da salinidade na germinação e no crescimento das plântulas, em termos de produção de matéria fresca e seca (Patade et al., 2009).

Atualmente um sistema eficiente para produção de mudas de cana-de-açúcar de qualidade e em larga escala é a micropropagação, já estabelecida como rotina em muitos países. No Brasil, alguns laboratórios ou biofábricas produzem mudas micropropagadas de diversas espécies incluindo variedades elite de cana-de-açúcar. A eficiência deste sistema foi potencializada com a utilização de biorreatores de imersão temporária (BIT), os quais aumentam significativamente as taxas de crescimento e multiplicação e melhoram a qualidade das plantas produzidas (Gerald & Lee, 2011).

O presente estudo objetivou associar as técnicas de pré-condicionamento e de micropropagação em mudas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, durante a última etapa de multiplicação *in vitro* visando avaliar o efeito do pré-condicionamento com NaCl sobre a tolerância à salinidade das mudas cultivadas sob estresse salino após a aclimatização.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Biofábrica Governador Miguel Arraes, localizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), no período de maio a outubro de 2013.

Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 foram micropropagadas em biorreatores de imersão temporária (BIT), contendo um litro de meio de cultivo, em um ciclo de imersão constituído por oito imersões diárias de dois minutos cada. O meio de cultivo na fase de multiplicação foi composto pelos sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,1 g L⁻¹ de inositol; 0,2 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP); 0,1 mg L⁻¹ de cinetina (KIN); 0,05 g L⁻¹ de ácido cítrico e 0,05 g L⁻¹ de ácido ascórbico.

Durante a fase de multiplicação as plantas receberam tratamentos de pré-condicionamento (*priming*), caracterizados pela adição de 25 mM de NaCl ao meio de cultivo, durante

três diferentes períodos de imersão: 12, 24 e 36 h (*priming* 1, *priming* 2 e *priming* 3, respectivamente), além do tratamento controle (sem *priming*).

Após a fase de multiplicação foi suprimido o NaCl e as plantas passaram para a etapa de enraizamento em meio com composição similar ao meio de multiplicação, acrescido de 1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA), porém sem adição de BAP e da KIN.

Durante todo o período experimental *in vitro* as plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de 50 μmol m⁻² s⁻¹.

As plantas foram aclimatizadas em bandejas de polipropileno com 98 células, contendo o substrato comercial Carolina Soil[®]. As plantas permaneceram em estufa durante 30 dias quando, então, foram transferidas para sacos de polietileno contendo areia lavada e permaneceram nesta condição durante 10 dias. Durante o cultivo em areia lavada as plantas foram fertigadas diariamente com uma solução nutritiva composta por 0,7428 g L⁻¹ de Kristalon[®] e 0,84 g L⁻¹ de Calciit[®].

No estabelecimento dos tratamentos de estresse *ex vitro* as plantas receberam a solução de rega com metade da força iônica e acrescida de NaCl. O aumento na concentração salina na solução de rega ocorreu com um incremento de 20 mM de NaCl a cada 10 dias, de forma a criar um estresse salino gradativo, durante 30 dias. Foram adotados dois tratamentos: S0 = sem NaCl, com condutividade elétrica de 1,20 dS m⁻¹; S1 = 20 → 40 → 60 mM de NaCl, com condutividade elétrica de 3,49; 4,50 e 8,00 dS m⁻¹, respectivamente. Após 30 dias de tratamento salino foi suprimido o NaCl do S1 e as plantas foram mantidas por 15 dias com solução não salina, para avaliar a recuperação ao estresse.

De cada tratamento foram coletadas cinco repetições aos 30 dias de estresse e outras cinco após 45 dias para avaliações do efeito do NaCl e da recuperação ao estresse salino.

As variáveis analisadas foram: matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR), número de perfilhos (NP), estimativa do conteúdo de clorofila (índice SPAD - Chl), conteúdo hídrico relativo (CHR) e percentual de dano de membrana (%D).

O número de perfilhos foi contado ao término do experimento. As amostras de parte aérea e raiz foram secas em estufa de aeração à temperatura de 70 °C até peso constante para determinação da matéria seca.

A estimativa de clorofila foi obtida com clorofilômetro (SPAD-502 Plus, Sptcrum Technologies), com leituras em três pontos da primeira folha totalmente expandida, evitando a nervura central.

O conteúdo hídrico relativo (CHR) foi obtido a partir de cinco discos foliares com 5,0 mm de diâmetro, sem a nervura central. Os discos foram pesados para a determinação da massa fresca (MF) e acondicionados em placas de Petri com água destilada, durante 24 h. Posteriormente, foi realizada nova pesagem para obtenção da massa túrgida (MT) dos discos, que foram, então, mantidos a 40 °C por 24 h, para obtenção da massa seca (MS). O CHR foi calculado segundo metodologia de Barrs & Weatherley (1962), aplicando-se a Eq. 1:

Pré-condicionamento *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) para tolerância ao estresse salino

$$\text{CHR} = \frac{(\text{MF} - \text{MS})}{(\text{MT} - \text{MS})} \times 100\% \quad (1)$$

O percentual de dano de membrana (%D) foi estimado a partir do extravasamento de eletrólitos (adaptado de Azevedo et al., 2008). Discos foliares com 5,0 mm de diâmetro permaneceram, durante 24 h, imersos em 20 mL de água destilada em tubos de ensaio. Em seguida foi medida a condutividade elétrica livre (L1) e os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria por uma hora a 100 °C. Após o banho, ao atingirem a temperatura ambiente foi realizada a segunda leitura de condutividade elétrica, a condutividade elétrica total (L2). O %D foi estimado pela Eq. 2:

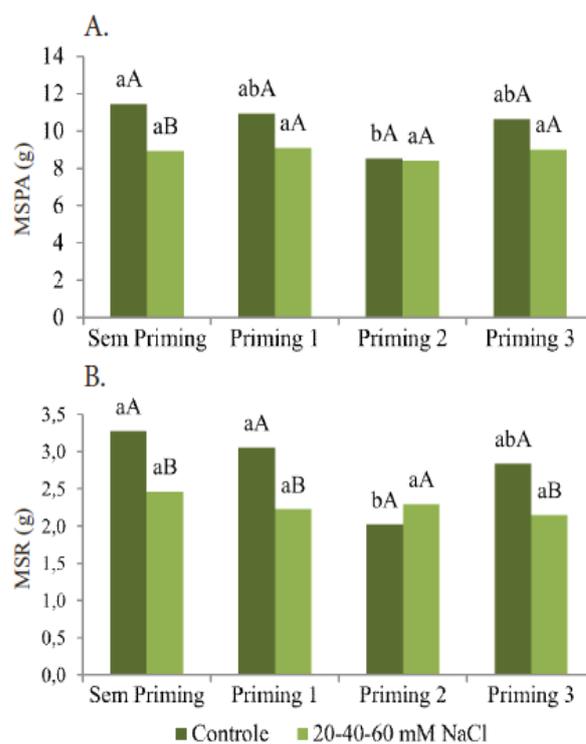
$$\%D = \frac{L1}{L2} \times 100 \quad (2)$$

O experimento foi realizado em um arranjo fatorial 4 x 2, constituído de quatro tratamentos de priming *in vitro* (0, 12, 24 e 36 h) e dois níveis salinos (S0 = sem NaCl (controle); S1 = 20 → 40 → 60 mM de NaCl), em delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram utilizadas quatro repetições durante a fase *in vitro* e dez repetições por tratamento na fase de estufa. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade, utilizando o software Assistat 7.7 beta (Assis & Silva, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas pré-condicionadas com o NaCl não apresentaram redução da massa seca da parte aérea (MSPA) quando submetidas ao estresse salino, ao contrário daquelas que não foram submetidas ao priming *in vitro* (Figura 1A). As plantas provenientes do priming *in vitro* por 24 h apresentaram maior massa seca radicular (MSR) sob tratamento salino quando comparadas ao controle. Nas plantas dos demais tratamentos houve redução da MSR sob rega salina (Figura 1B).

A redução da biomassa em plantas submetidas a estresse salino já foi bastante documentada, inclusive para cana-de-açúcar (Ashraf et al., 2010). Estudos recentes realizados com aplicação de pré-tratamento em rebolos de uma gema com 100 mM de NaCl registram aumento no comprimento e no peso fresco de brotos e raízes de variedades de cana-de-açúcar provenientes de rebolos submetidos a estresse iso-osmótico com 0,7 MPa, induzido com NaCl (150 mM) ou PEG-8000 (20%, p/v) (Patade et al., 2009). Outras gramíneas também responderam positivamente ao pré-condicionamento, como descrito para a cultivar Azam y de *Zea mays*, provenientes da germinação de sementes pré-condicionadas em NaCl a 6 dS m⁻¹. Essas plantas também apresentaram aumento significativo da matéria seca, quando comparadas com aquelas provenientes de sementes não pré-condicionadas (Bakht et al., 2011). De acordo com Levitt (1980), as plantas, em geral, não desenvolvem tolerância ao estresse a menos que sejam

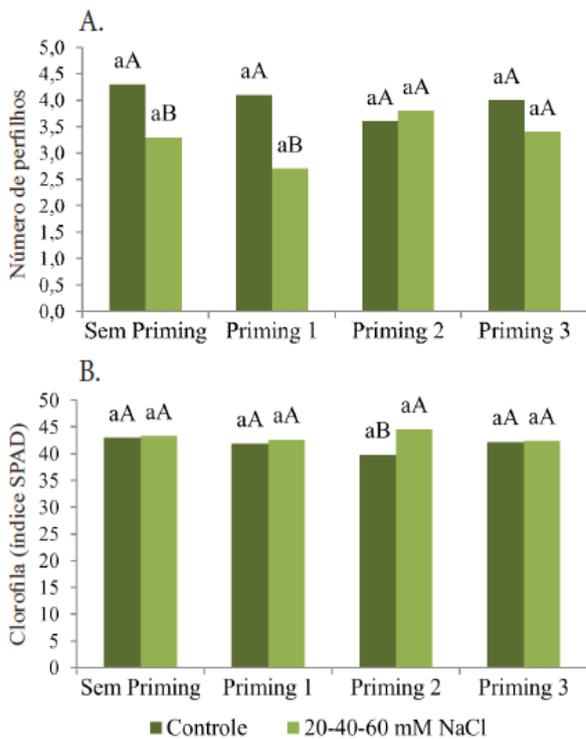


Médias seguidas de mesma letra minúscula entre tratamentos de priming e mesma letra maiúscula entre tratamentos salinos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade

Figura 1. Massa seca da parte aérea - MSPA (A) e massa seca da raiz - MSR (B) das plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, provenientes de aplicação de priming com 25 mM de cloreto de sódio (NaCl), durante 0 (sem priming), 12 (priming 1), 24 (priming 2) e 36 (priming 3) h, submetidas a tratamentos de estresse salino gradativo em estufa: S0 = controle sem NaCl; S1 = 20 → 40 → 60 mM de NaCl, durante 30 dias

submetidas a condições estressantes. Isto significa que elas precisam passar por um processo de rustificação para tolerar um novo ciclo de estresse (Rivas et al., 2013). A tolerância ao estresse depende não apenas da intensidade e duração da exposição ao agente estressor, mas também do número de eventos estressantes a que a planta foi submetida (Chaves et al., 2009). Experimentos com plântulas de *Arabidopsis* registram que o priming hiperosmótico estabelece uma memória somática de longo prazo acompanhada por mudanças específicas no epigenoma que compreendem diferenças no status da cromatina, na responsividade transcricional, bem como na fisiologia da planta inteira (Sani et al., 2013).

O pré-condicionamento *in vitro* por 12 h de exposição ao NaCl não foi suficiente para evitar a redução no perfilhamento quando essas plantas foram submetidas ao estresse salino *ex vitro*. Por outro lado, os tratamentos de priming com duração de 24 e 36 h preveniram o efeito deletério do NaCl sobre o perfilhamento das plantas submetidas ao estresse salino *ex vitro*, de maneira que o número de perfilhos não diferiu entre estressadas e controle (Figura 2A). A cana-de-açúcar apresenta quatro fases de crescimento características da cultura e entre



Médias seguidas de mesma letra minúscula entre tratamentos de priming e mesma letra maiúscula entre tratamentos salinos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade

Figura 2. Número de perfilhos (A) e estimativa de clorofila - Chl (B) pelo índice SPAD das plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, provenientes de aplicação de priming com 25 mM de cloreto de sódio (NaCl), durante 0 (sem priming), 12 (priming 1), 24 (priming 2) e 36 (priming 3) h, submetidas a tratamentos de estresse salino gradativo em estufa: S0 = controle sem NaCl; S1 = 20 → 40 → 60 mM de NaCl, durante 30 dias

elas a de perfilhamento começa em geral aos 40 dias após o plantio e pode durar até 120 dias. Esta é uma das fases mais exigentes em água e, juntamente com a fase de crescimento intenso do colmo, constitui a formação propriamente dita da cultura (Ramesh, 2000). O pré-condicionamento pode, portanto, ser uma alternativa importante para assegurar um bom perfilhamento em mudas de cana-de-açúcar sob estresse osmótico nesta fase de crescimento.

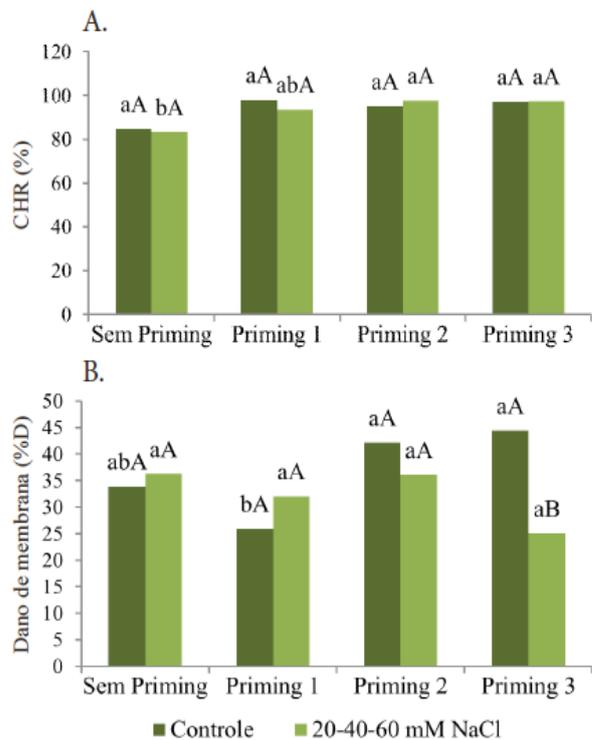
O tratamento de priming *in vitro* por 24 h induziu um aumento no teor de clorofila (índice SPAD) de plantas submetidas ao estresse salino (Figura 2B). A salinidade é capaz de reduzir o teor de pigmentos fotossintéticos em plantas sensíveis à salinidade e aumentar em plantas tolerantes ao ambiente salino. O efeito sobre o teor da clorofila depende da concentração do agente estressor, bem como da espécie vegetal (Jamil et al., 2007). Sob estresse hídrico variedades sensíveis de cana-de-açúcar apresentaram redução mais drástica no índice SPAD do que as variedades tolerantes à seca (Silva et al., 2007).

De acordo com alguns autores, o índice SPAD é uma medida sensível e de fácil obtenção que poderia ser utilizada para

comparar a tolerância ao estresse (O'Neill et al., 2006). No caso da variedade RB98710 o efeito sobre a clorofila foi visivelmente dependente da duração do priming *in vitro*, com o tratamento por 24 h favorecendo uma resposta de tolerância ao estresse salino pós-priming.

As plantas submetidas ao pré-condicionamento *in vitro* mantiveram o CHR quando expostas ao estresse salino *ex vitro* (Figura 3A). Entre as plantas estressadas, o menor valor de CHR foi observado nas plantas que não foram pré-condicionadas com NaCl *in vitro*. O período experimental coincidiu com a fase de perfilhamento das plantas, um período crítico de demanda hídrica. Silva et al. (2007) sugerem que medidas de relações hídricas em plantas sob estresse osmótico durante esta fase de crescimento podem ser úteis na identificação de tolerância à seca e que a manutenção do CHR é mais frequente em genótipos tolerantes.

Não se observou efeito significativo do priming sobre a porcentagem de dano de membrana nas plantas tratadas com estresse salino, entretanto, as plantas provenientes do tratamento *in vitro* por 36 h apresentaram menor %D quando submetidas ao estresse salino *ex vitro* do que as plantas do controle (Figura 3B). Os danos na membrana ocorrem em consequência da



Médias seguidas de mesma letra minúscula entre tratamentos de priming e mesma letra maiúscula entre tratamentos salinos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade

Figura 3. Conteúdo hídrico relativo - CHR (A) e dano de membrana (B) das plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, provenientes de aplicação de priming com 25 mM de cloreto de sódio (NaCl), durante 0 (sem priming), 12 (priming 1), 24 (priming 2) e 36 (priming 3) h, submetidas a estresse salino gradativo em estufa: S0 = controle sem NaCl; S1 = 20 → 40 → 60 mM de NaCl, durante 30 dias

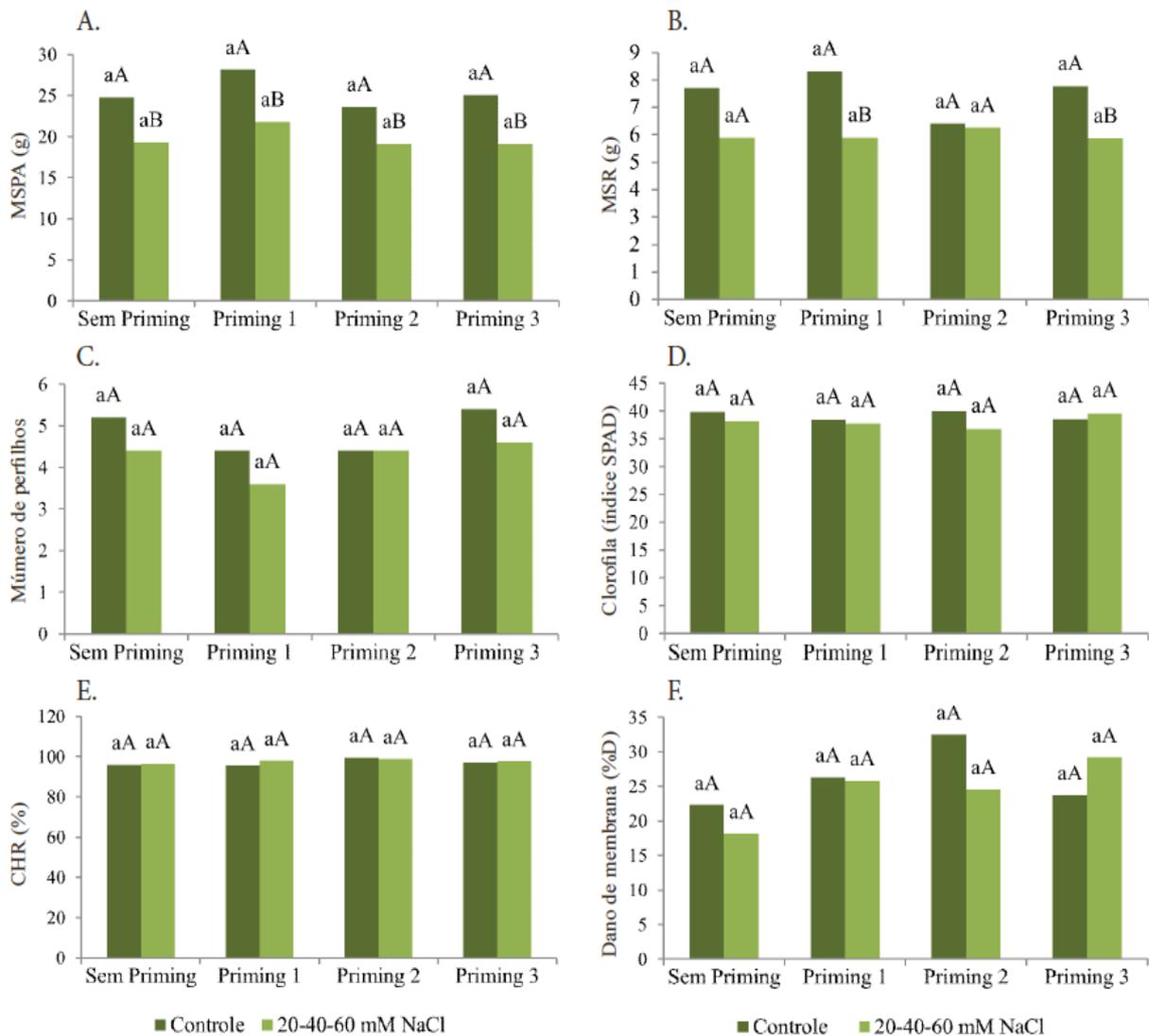
Pré-condicionamento *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) para tolerância ao estresse salino

peroxidação de lipídios provocada pelo excesso de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), em situações de estresse oxidativo (Silveira et al., 2005; Harrir & Mitller, 2009). Entre as plantas do tratamento controle *ex vitro* a menor %D foi registrada nas plantas pré-condicionadas *in vitro* por 12 h com NaCl. O priming parece equipar a planta com meios de prevenir o dano oxidativo mesmo na ausência de fatores de estresse, que normalmente provocam tais respostas (Sani et al., 2013).

Durante os 15 dias de avaliação da recuperação ao estresse, quando o NaCl foi suprimido, não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos de priming, para as diferentes variáveis avaliadas (Figura 4). Apenas a produção de matéria seca da parte aérea das plantas que passaram pelo estresse salino não se igualou a das plantas do tratamento controle após 15 dias de supressão do NaCl, seguramente devido ao pequeno tempo

de recuperação das plantas. Esta resposta foi independente dos tratamentos de priming *in vitro*.

Os resultados obtidos nesse experimento confirmam que as plantas que foram pré-condicionadas com o NaCl sofreram ajustes no seu metabolismo, o que foi importante para manter a homeostase durante a exposição ao estresse salino. A intensidade e a duração do priming proporcionaram respostas favoráveis, um resultado que corrobora com Lichtenthaler (2004), o qual define o eu-estresse como uma condição de estresse suave e estimulante, capaz de ativar o metabolismo celular e incrementar a atividade fisiológica da planta, comportando-se como fator positivo que impulsiona o crescimento vegetal. Os tratamentos condicionantes invocam a “memória celular” e, portanto, a intensidade e duração de tais tratamentos precisam ser cuidadosamente manipuladas para evitar qualquer impacto



Médias seguidas de mesma letra minúscula entre tratamentos de priming e mesma letra maiúscula entre tratamentos salinos, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

Figura 4. Massa seca da parte aérea - MSPA (A); massa seca da raiz - MSR (B); número de perfilhos (C); estimativa de clorofila - Chl, pelo índice SPAD (D); conteúdo hídrico relativo - CHR (E) e dano de membrana (F) das plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, provenientes de aplicação de priming com 25 mM de cloreto de sódio (NaCl), durante 0 (sem priming), 12 (priming 1), 24 (priming 2) e 36 (priming 3) h, após 15 dias de supressão do NaCl (recuperação ao estresse)

negativo sobre a velocidade e adequação do sistema de defesa (Sani et al., 2013). Ainda de acordo com Sani et al., (2013), o priming com NaCl altera resposta da planta adulta ao estresse salino e hídrico e causa pequenas mas significativas mudanças em histonas. Os autores registraram também que mais de 100 genes apresentaram diferenças persistentes, um dos quais codifica o transportador de Na HKT1 que é induzido mais fortemente nas plantas que receberam o priming do que nas que não receberam, quando expostas ao segundo ciclo de estresse salino.

Nesse contexto, conclui-se que o pré-condicionamento in vitro por 24 h com 25 mM de NaCl favoreceu os parâmetros de crescimento nas plantas da variedade RB98710 quando submetidas a 30 dias de estresse salino gradativo até 60 mM de NaCl e que o efeito do priming expressou-se mesmo após um período de 60 dias até a exposição ao novo ciclo de estresse, que embora induzido pelo mesmo agente estressor, foi imposto a uma concentração e por um tempo de exposição maior do que no tratamento de priming.

CONCLUSÃO

A aplicação do priming com cloreto de sódio, durante a fase de multiplicação da variedade RB98710 pode ser uma prática simples e capaz de favorecer a resistência dessa variedade à salinidade.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e a FACEPE pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa e ao CETENE pela infraestrutura.

LITERATURA CITADA

- Ashraf, M.; Rahmatullah; Ahmad, R.; Bhatti, A. S.; Afzal, M.; Sarwar, A.; Maqsood, M. A.; Kanwal, S. Amelioration of salt stress in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by supplying potassium and silicone in hydroponics. *Pedosphere*, v.20, p.153-162, 2010.
- Assis, E.; Silva, F. A. Z. Assistat 7.7 beta. Campina Grande: UFCG, 2013.
- Atreya, A.; Vartak, V.; Bhargava, S. Salt priming improve tolerance to dessication stress and to extreme salt stress in *Bruguiera cylindrica*. *International Journal of Integrative Biology*, v.6, p.68-73, 2009.
- Azevedo, I. G.; Oliveira, J. G.; Silva, M. G. da; Pereira, T.; Corrêa, S. F.; Vargas, H.; Façanha, A. R., P-type H⁺-ATPases activity, membrane integrity, and apoplastic pH during papaya fruit ripening. *Postharvest Biology and Tchnology*, v.48, p.242-247, 2008.
- Bakht, J.; Shafi, M.; Jamal, Y.; Sher, H. Response of maize (*Zea mays* L.) to seed priming with NaCl and salinity stress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v.9, p.252-261, 2011.
- Barrs, H. D.; Weatherley, P. E. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Science*, v.15, p.413-428, 1962.
- Chaves; M. M.; Flexas, J.; Pinheiro, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, v.103, p.551-560, 2009.
- Gerald, L. T. S.; Lee, L. L. Biofábrica de plantas: Por que biorreator? In: Gerald, L. T. S. Biofábrica de plantas: Produção industrial de plantas in vitro. São Paulo: Antiqua, 2011. Cap.1, p.14-31.
- Ghosh, N.; Adak, M. K.; Ghosh, P. D.; Gupta, S.; Sen Gupta, D. N.; Mandal, C. Differential responses of two rice varieties to salt stress. *Plant Biotechnology Report*, v.5, p.89-103, 2011.
- Harris, Y.; Mittler, R. The ROS Signaling Network of Cells. In: Del Rio, L. A.; Puppo, A. (ed) Reactive oxygen species in plants signaling. Berlin: Springer-Verlag, 2009. p.165-174.
- Levitt, J. Responses of plant to environmental stresses. v.1 New York: Academic Press, 1980. 698p.
- Lichtenthaler, H. K. El estrés y la medida del estrés en plantas. In: Reigosa, M. J.; Pedrol, N.; Sánchez, A. (ed) La ecofisiología vegetal - Una ciencia de síntesis. Madrid: Thomson, 2004. cap. 2, p.59-111.
- Jamil, M.; Rehman, S.; Lec, K. J.; Kim, J. M.; Kim, H. S.; Rha, E. S. Salinity reduced growth PS2 photochemistry and chlorophyll content in radish. *Scientia Agricola*, v.64, p.111-118, 2007.
- Munns, R.; Tester, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, v.59, p.651-81, 2008.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- Nascimento, W. M. Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2004. 12p. Circular Técnica, 33
- Oliveira, A.R. de; Braga, M.B. Florescimento e acamamento de cultivares de cana-de-açúcar submetidas a diferentes lâminas de irrigação. Petrolina: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Semiárido, 2011. 23p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 87.
- O'Neill, P. M.; Shanahan, J. F.; Schepers, J. S.; Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop Science*, v.4, p.681-687, 2006.
- Pandolfi, C.; Mancuso, S. Shabalab, S. Physiology of acclimation to salinity stress in pea (*Pisum sativum*). *Environmental and Experimental Botany*, v.84, p.44-51, 2012.
- Patade, V. Y.; Bhargava, S.; Suprasanna, P. Halopriming imparts tolerance to salt and PEG induced drought stress in sugarcane. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v.134, p.24-28, 2009.

Pré-condicionamento *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) para tolerância ao estresse salino

- Ramesh, P. Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. *Journal of Agronomy and Crop Science*, v. 185, p.83-89, 2000.
- Rivas, R.; Oliveira, M. T.; Santos, M. G. Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.63, p.200-208, 2013.
- Sani, E.; Herzyk, P.; Perrella, G.; Colot, V.; Amtmann, A. Hyperosmotic priming of *Arabidopsis* seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. *Genome Biology*, v.14, p.2-23, 2013.
- Silva, M. de A.; Jifon, J. L.; Silva, J. A. G. da; Sharma, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.19, p.193-201, 2007.
- Silveira, J. A. G.; Lima, J. P. M. S.; Cavalcanti, F. R.; Maia, J. M.; Viégas, R. A. Salt induced oxidative response in plants: damage or protection? In: Nogueira, R. J. M. C.; Araújo, E. DE L.; Willadino, L.; Cavalcante, U.M.T. *Estresses ambientais: Danos e benefícios em plantas*. Recife: MXM, 2005. p.106-117.
- Willadino, L.; Camara, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: Aspectos fisiológicos e bioquímicos. *Enciclopédia Biosfera*, v.6, p.1-23, 2010.

CAPÍTULO III

Efeito do estresse salino ou hídrico em plantas de cana-de-açúcar provenientes de halopriming em biorreatores de imersão temporária¹

¹ O Manuscrito que compõe o capítulo III será submetido ao periódico *Acta Physiologiae Plantarum* (Anexo)

Efeito do estresse salino ou hídrico em plantas de cana-de-açúcar provenientes de halopriming em biorreatores de imersão temporária

Gemima M. de Melo · Marta R. Barbosa · Arnóbio G. de Andrade · Terezinha R. Camara

Gemima M. de Melo*

Doutoranda Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE, Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/LCTV, Departamento de Química, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil. *Autor para correspondência: e-mail: gemimamelo@hotmail.com

Marta R. Barbosa

Doutoranda Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas. UFRPE, LCTV, Departamento de Química, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil.

Arnóbio G. de Andrade

Professor aposentado da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Terezinha R. Camara

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química, Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brasil.

Resumo

O presente estudo avaliou se o pré-condicionamento com o cloreto de sódio (NaCl), em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 pode proporcionar às plantas, uma resposta mais eficiente quando submetidas a novos eventos de estresse salino ou hídrico. Plantas foram micropropagadas em biorreatores de imersão temporária, contendo 25 mM de NaCl como agente pré-condicionante durante 0, 12 e 36 h (SP, P12 e P36, respectivamente) em meio de multiplicação. Posteriormente foram transferidas para meio de enraizamento, sem o NaCl, aclimatizadas e submetidas a 30 dias de estresse salino (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl) e estresse hídrico (Controle – 100 % da capacidade de pote (CP) e estresse hídrico 50 % e 25 % da CP). O aumento da concentração salina ocorreu a cada 10 dias, e a redução da CP a cada 15 dias, criando um estresse gradativo, em ambos, ao longo de 30 dias. O pré-condicionamento proporcionou ativação do sistema de

defesa antioxidativo, o que reduziu a peroxidação lipídica e o teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), porém não foi eficiente em manter o crescimento das plantas em condições de estresse salino. O estresse hídrico promoveu peroxidação lipídica, aumento no teor de H_2O_2 e também afetou o crescimento das plantas. O tratamento de priming não apresentou efeito pré-condicionante na variedade RB98710, o que desfavoreceu o seu desenvolvimento em condições de estresses salino e hídrico.

Palavras-chave *Saccharum* spp · Pré-condicionamento · Salinidade · Estresse oxidativo · Enzimas antioxidantes · Malondialdeído

Introdução

O ambiente consiste basicamente no equilíbrio entre as interações de fatores bióticos e abióticos, e muitas vezes perturbações bruscas nos fatores abióticos levam a alterar a homeostase dos organismos bióticos, criando como consequência, condições estressantes para a sobrevivência dos organismos vivos (Lokhande e Suprasanna 2012).

A escassez de água e o excesso de sais na solução do solo promovem redução no crescimento das plantas com comprometimento da produtividade. Isso ocorre devido à redução na capacidade da planta para absorver água, o que leva a uma diminuição da abertura estomática, limitação na absorção de dióxido de carbono (CO_2), com consequente redução da fotossíntese (Osakabe et al. 2014; Parihar et al. 2015).

Estresses abióticos como o salino e o hídrico provocam acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas espécies podem apresentar-se na forma de radical, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o hidroxila (OH^{\bullet}), o hidroperóxido (HO_2^{\bullet}) e os radicais alcoxila (RO^{\bullet}); na forma molecular, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou como uma molécula excitada, como o oxigênio singlete (1O_2) (Gill e Tuteja 2010). Quando não são rapidamente eliminadas, as ROS desencadeiam o estresse oxidativo, que pode danificar componentes celulares e provocar danos, como a perda da competência fisiológica e eventual morte celular (Mullineaux e Baker 2010). Nas células vegetais, a produção de ROS é rigorosamente regulada por vias de eliminação, que envolvem antioxidantes não enzimáticos e enzimas, como a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX) e a superóxido dismutase (SOD) (Choudhury et al. 2013).

Como forma de tentar reduzir as perdas provocadas pelos variados fatores de estresse, são utilizados métodos de pré-condicionamento nas plantas. Tais métodos baseiam-se na capacidade que as plantas superiores possuem, de produzir respostas a estímulos ambientais após uma exposição prévia, denominado “priming” ou “aclimatação” (Sani et al. 2013). O pré-

condicionamento é bastante utilizado em sementes (seed priming) por promover aumento nas taxas germinativas e no vigor das plantas (Tavili et al. 2010), tolerância à seca e ao estresse salino (Jisha e Puthur 2014). A utilização de tratamentos de priming em plantas é pouco documentada, porém já foram realizados tratamentos desse tipo em rebolos e em plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* (Melo et al. 2014; Patade et al. 2015). Entre as técnicas de pré-condicionamento utilizadas, destacam-se o hidropriming, o osmocondicionamento, o priming hormonal e o halopriming (Nawaz et al. 2013). O halopriming consiste na imersão do material vegetal em soluções salinas, com concentrações adequadas para promover um pré-condicionamento.

A cana-de-açúcar é uma planta monocotiledônea, alógama e perene, pertencente à família *Poaceae*, tribo *Andropogoneae* e gênero *Saccharum* (Silva et al. 2010). A Zona da Mata é a região do Nordeste brasileiro que apresenta as melhores condições climáticas para o desenvolvimento da cultura sem necessidade de irrigação, contudo o seu desenvolvimento vem se expandindo para regiões semiáridas, onde se desenvolve uma agricultura irrigada (Oliveira e Braga 2011). Nesse contexto, a variedade RB98710 destaca-se pela alta produtividade, alto teor de açúcar e seu cultivo deve ser em solos férteis com irrigação (Ridesa 2010).

O presente trabalho teve como objetivo analisar se o pré-condicionamento com o cloreto de sódio em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, cultivadas em sistema de biorreatores de imersão temporária permite às plantas uma resposta mais eficiente quando submetidas a novos eventos de estresse salino e hídrico.

Material e métodos

Local de desenvolvimento da pesquisa e condições de cultivo

O experimento foi desenvolvido na Biofábrica Governador Miguel Arraes, localizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), onde plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 foram micropropagadas em sistema de biorreatores de imersão temporária (BIT), contendo um litro de cultivo. O meio de cultivo na fase de multiplicação foi composto pelos sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog 1962), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose; 0,1 g L⁻¹ de inositol; 0,2 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP); 0,1 mg L⁻¹ de cinetina (KIN); 0,05 g L⁻¹ de ácido cítrico e 0,05 g L⁻¹ de ácido ascórbico.

Aplicação de priming in vitro com cloreto de sódio (NaCl)

Durante a fase de multiplicação, vinte plantas com cerca de 4 cm de altura (Fig. 1a) receberam tratamentos de pré-condicionamento (priming), caracterizados pela adição de 25 mM de NaCl ao meio de cultivo, durante dois diferentes períodos de imersão: 12 h e 36 h (P12 e P36, respectivamente), além do tratamento controle (SP). O ciclo de imersão dos biorreatores foi constituído por oito imersões diárias, com duração de dois minutos cada uma, em intervalos de três horas (Fig. 1b). As plantas permaneceram recebendo esse ciclo diário durante 21 dias.



Fig. 1 Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710; **a** plantas em fase de subcultivo. Barra 2 cm; **b** estabelecimento dos tratamentos de priming in vitro com 25 mM de NaCl, durante a fase de multiplicação em sistema de biorreatores de imersão temporária. Barra 10 cm

Posteriormente à fase de multiplicação, o NaCl foi suprimido para que as plantas fossem submetidas a uma etapa de enraizamento (Fig. 2) em meio com composição similar ao meio de multiplicação, contendo 1 mg L^{-1} de ácido naftalenoacético (ANA). Essa fase teve duração de 30 dias.

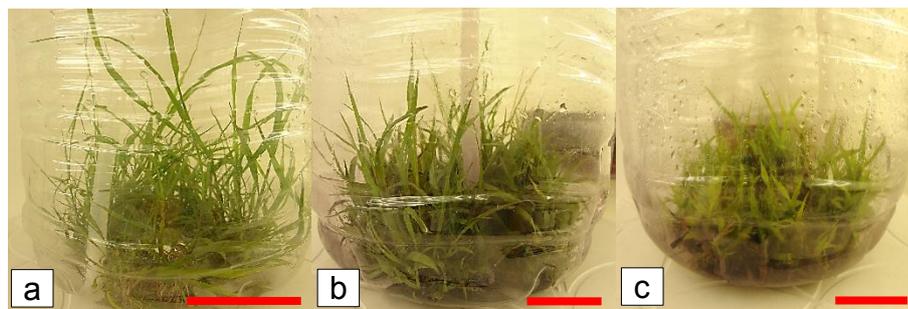


Fig. 2 Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 em sistema de biorreatores de imersão temporária, no estabelecimento da fase de enraizamento; **a** plantas provenientes do tratamento controle SP; **b** priming P12 = 12 h; **c** priming P36 = 36 h. Barra 5cm

Durante todo o período experimental *in vitro* as plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental desta etapa foi inteiramente casualizado, constituído por três tratamentos de *priming in vitro* (SP, P12 e P36), com quatro repetições, por tratamento.

Aclimatização das plantas

As plantas foram aclimatizadas em bandejas de polipropileno com 98 células, contendo aproximadamente 35 cm^3 de substrato comercial Carolina Soil® e permaneceram em estufa com sistema de nebulização, durante 30 dias (Fig. 3). Após a fase de aclimatização, as plantas foram transplantadas para sacos de polietileno com capacidade para 6 kg, contendo 5 kg de areia lavada, contendo uma camada de brita na superfície, com o intuito de reduzir a evaporação e evitar a proliferação de microalgas. Antes do transplante, as raízes das plantas foram lavadas com água corrente, para a retirada total do substrato. As plantas foram mantidas em estufa sem sistema de nebulização a uma temperatura média de 30 °C, durante 10 dias. Durante esse período, as plantas foram fertirrigadas diariamente com uma solução nutritiva composta por $0,7428 \text{ g L}^{-1}$ de Kristalon® e $0,8400 \text{ g L}^{-1}$ de Calcinit®.

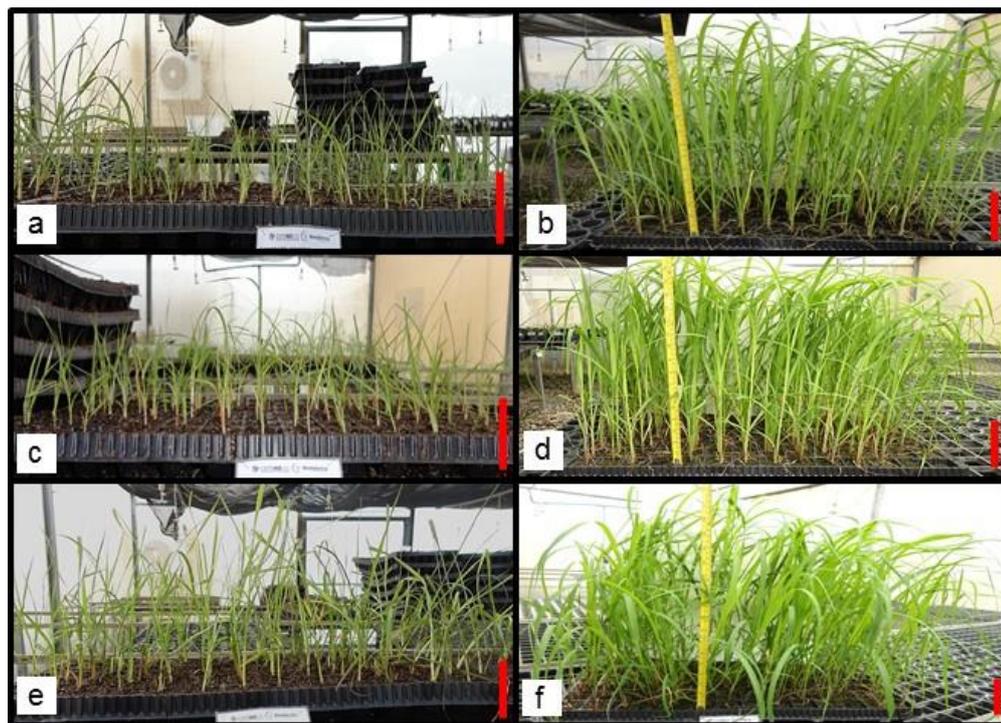


Fig. 3 Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, provenientes dos tratamentos de *priming in vitro*, na fase de estabelecimento e aos 30 dias de aclimatização, respectivamente. **a** e **b** plantas do tratamento controle SP; **c** e **d** plantas do *priming* P12 = 12 h; **e** e **f** plantas do *priming* P36 = 36 h. Barra 10 cm

Aplicação de estresse salino e hídrico

Após os 40 dias de aclimatização, as plantas foram submetidas a experimentos distintos de indução de estresse salino e hídrico. No estresse salino, as plantas foram fertirrigadas com solução nutritiva com metade da força iônica, acrescida de NaCl. O experimento de estresse salino foi constituído por um tratamento controle (S0), sem adição do NaCl, com condutividade elétrica (CE) de 1,20 dS m⁻¹ e dois tratamentos com aumento gradativo da concentração de NaCl: S60 = 20→40→60 mM de NaCl (CE de 3,49; 4,50 e 8,00 dS m⁻¹, respectivamente); S100 = 20→60→100 mM de NaCl (CE de 3,49; 8,00 e 11,28 dS m⁻¹, respectivamente). O aumento na concentração de NaCl ocorreu com um incremento de 20 mM (S60) ou de 40 mM (S100) a cada 10 dias, de forma a criar um estresse salino gradativo ao longo de 30 dias. O estresse hídrico foi constituído por dois tratamentos: um tratamento controle (100% da capacidade de pote – CP) e um de estresse hídrico gradual, no qual as plantas foram fertirrigadas com 50 % e 25 % da CP. A redução da CP foi realizada aos 15 dias, criando um estresse hídrico gradativo ao longo de 30 dias. A CP foi determinada previamente pelo método gravimétrico (Souza et al. 2000).

O delineamento experimental para o estresse salino foi inteiramente casualizado onde o estresse salino foi distribuído em arranjo fatorial 3 x 3, composto por três tratamentos de priming in vitro (SP, P12 e P36) e três níveis salinos (S0, S60 e S100) e o estresse hídrico foi distribuído em um arranjo fatorial 3 x 2, constituído pelos três tratamentos de priming in vitro e dois regimes hídricos (controle e estresse gradual). Foram utilizadas quatro repetições durante as fases in vitro e em estufa.

Avaliações biométricas e bioquímicas

No decorrer do período dos experimentos de estresse salino e hídrico (30 dias) foi analisado o diâmetro da parte aérea (ØPA). Após esse período, partes aéreas e raízes das plantas foram coletadas, acondicionadas em sacos de papel previamente identificados e levados à estufa de ventilação forçada à temperatura de 70 °C até peso constante. Em balança analítica, foram determinadas as biomassas secas das partes aéreas (BSPA) e das raízes (BSR).

As variáveis bioquímicas analisadas foram: atividade das enzimas SOD (EC 1.15.1.1), APX (EC 1.11.1.11) e CAT (EC 1.11.1.6).

Foram homogeneizadas em nitrogênio líquido 500 mg de folhas frescas, com 2 mL de tampão de extração composto por fosfato de potássio monobásico e bibásico, ambos a 1M (pH 7,5) e 20 % de polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g

a uma temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos (modificado de Zeraik et al. 2008). O sobrenadante foi armazenado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior determinação das proteínas solúveis totais e das atividades enzimáticas. A determinação do teor de proteínas solúveis seguiu o método descrito por Bradford (1976), no qual as soluções padrões (100 μL) e os extratos das amostras (100 μL) receberam 2 ml do reagente coomassie brilliant blue. Os padrões foram preparados com albumina de soro bovino (BSA) e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595 nm, sendo o conteúdo de proteína expresso em mg de proteína solúvel g^{-1} de matéria fresca.

A atividade da SOD foi determinada seguindo a metodologia de Giannopolitis e Reis (1977). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm e a atividade foi expressa em U SOD mg^{-1} proteína.

A análise da APX foi realizada segundo metodologia de Nakano e Asada (1981). A reação foi constituída por uma solução contendo 1335 μL de tampão fosfato de potássio monobásico a 50 mM (pH 6,0), 75 μL do extrato enzimático, 75 μL de ácido ascórbico a 10 mM e 15 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 100 mM. As leituras foram feitas no tempo zero e aos 60 segundos, em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade enzimática foi expressa em μmol Ascorbato mg^{-1} proteína min^{-1} e calculada usando o coeficiente de extinção molar de $2,8\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ de ascorbato.

A análise da atividade da CAT seguiu a metodologia proposta por Berris e Sizer (1952). A reação foi constituída por uma solução contendo 1390 μL do tampão fosfato de potássio monobásico 100 mM (pH 7,0), 50 μL do extrato enzimático e 60 μL de H_2O_2 (0,5 M). As leituras foram feitas no tempo zero e aos 60 segundos, a uma temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ em espectrofotômetro a 240 nm. A atividade enzimática foi determinada pela decomposição do H_2O_2 durante 1 min e expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{ mg}^{-1}$ proteína min^{-1} .

Para as análises bioquímicas foram utilizadas três repetições, de cada tratamento, com as quais foram realizadas leituras em triplicatas.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade, utilizando o programa de análises estatísticas Assistat 7.7 (Assis e Silva 2013).

Resultados

Biometria e biomassa

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados referentes às avaliações biométricas das plantas submetidas, durante 30 dias, aos tratamentos salino e hídrico e do controle (sem estresse), após pré-condicionamento *in vitro* com NaCl.

Os tratamentos salinos (Tabela 1) e o tratamento hídrico (Tabela 2) impuseram redução no crescimento caracterizada por queda na produção de biomassa seca da parte aérea e raízes, bem como no diâmetro da parte aérea. Não houve efeito dos tratamentos de *priming in vitro* sobre as variáveis biométricas e a interação entre os fatores não foi significativa.

A redução na BSPA e BSR das plantas da variedade RB98710 quando expostas ao estresse salino gradativo foram, em média, 18,87 % e 27,29%, respectivamente, enquanto que o crescimento em ØPA foi reduzido em 22,51%.

Tabela 1 Biomassa seca da parte aérea (BSPA), das raízes (BSR) e diâmetro da parte aérea (ØPA), aos 30 dias de estresse salino gradativo *ex vitro*: (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl), de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* com 25 mM de NaCl na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT)

Tratamentos salinos (mM NaCl)	BSPA (g)	BSR (g)	ØPA (mm)
S0 (controle)	11,00 a	3,06 a	9,24 a
S60	9,00 b	2,28 b	7,11 b
S100	8,85 b	2,17 b	7,21 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade

O estresse hídrico também promoveu reduções no crescimento da variedade RB98710 (Tabela 2). Quando submetidas ao estresse hídrico a produção de BSPA e a BSR das plantas caiu em 20,90% e 15,36%, respectivamente. A redução no ØPA foi de 17,31%. O *priming* não proporcionou efeito sobre as variáveis biométricas e a interação entre os fatores também não foi significativa.

Tabela 2 Biomassa seca da parte aérea (BSPA), das raízes (BSR) e diâmetro da parte aérea (ØPA), aos 30 dias de estresse hídrico gradativo (Controle = 100% da CP; estresse hídrico gradual = 50% da CP seguido de 25% da CP, durante 15 dias cada), de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de tratamentos de priming in vitro com 25 mM de NaCl na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT)

Tratamentos hídricos	BSPA (g)	BSR (g)	ØPA (mm)
Controle	11,00 a	3,06 a	9,24 a
Estresse hídrico	8,70 b	2,59 b	7,64 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade

Teores de MDA, H₂O₂ e atividade enzimática do sistema de defesa antioxidativo

As Tabelas 3 e 4 apresentam os teores de malondialdeído (MDA) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) aos 30 dias de tratamento com rega salina.

No que se refere ao teor de MDA, observou-se efeito significativo de ambos os fatores e da interação entre eles (Tabela 3). O estresse salino causou aumento no teor de MDA nas plantas que não passaram pelos tratamentos de pré-condicionamento in vitro com NaCl, mas não houve acúmulo nas plantas pré-condicionadas quando submetidas ao estresse salino. No mais alto nível de salinidade (S100) as plantas provenientes do tratamento P36 apresentaram menor concentração de MDA do que aquelas do SP (Tabela 3).

Tabela 3 Teores de malondialdeído (MDA) em folhas de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de tratamentos de priming in vitro com 25 mM de NaCl (SP = sem priming; P12 = 12h; P36 = 36h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl)

Priming in vitro	MDA (nmol g ⁻¹ matéria fresca)		
	S0	S60	S100
SP	1,40 bB	2,28 aA	2,88 aA
P12	2,30 aA	2,24 aA	2,41 abA
P36	1,76 abA	1,94 aA	2,02 bA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade (minúscula entre tratamentos de priming in vitro e maiúscula entre tratamentos de estresse salino gradativo)

O tratamento de estresse salino mais severo (S100) induziu aumento na concentração de H₂O₂. Este acúmulo de H₂O₂ foi menor nas plantas pré-condicionadas do que nas plantas do SP (Tabela 4). A interação entre os fatores de priming e salinidade não foi significativa.

Tabela 4 Efeitos isolados dos tratamentos de priming in vitro com 25 mM de NaCl na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (SP, P12 e P36) e dos tratamentos salinos (S0, S60 e S100) sobre o teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas de cana-de-açúcar da variedade RB98710, aos 30 dias

Priming in vitro	H₂O₂ (μmol g⁻¹ matéria fresca)
SP	1,21 a
P12	0,98 b
P36	0,63 c
Tratamentos salinos (mM NaCl)	H₂O₂ (μmol g⁻¹ matéria fresca)
S0 (controle)	0,88 b
S60	0,86 b
S100	1,07 a

Médias seguidas de mesma letra, dentro de cada fator (priming; salinidade) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade

O efeito do estresse hídrico evidenciou-se também pelo acúmulo de MDA e de H₂O₂. Entre os tratamentos de priming, o maior teor de MDA foi registrado nas plantas do P12, enquanto que o teor de H₂O₂ foi menor nas plantas do P36 (Tabela 5).

O teor de MDA duplicou (100%) nas plantas provenientes do tratamento SP quando submetidas ao estresse hídrico, enquanto que naquelas do P36 este acúmulo foi inferior a 40% do teor medido nas plantas não estressadas (controle). Deve-se destacar também que a concentração de MDA nas plantas pré-condicionadas in vitro com NaCl por 12 horas (P12), foi maior do que nos demais tratamentos de priming, com ou sem suspensão de rega ex vitro (Tabela 5).

Tabela 5 Teores de malondialdeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de tratamentos de priming in vitro com 25 mM de NaCl (SP = sem priming; P12 = 12h; P36 = 36h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse hídrico gradativo (Controle = 100% da CP; estresse hídrico gradual = 50% da CP seguido de 25% da CP, durante 15 dias cada)

Priming in vitro	MDA (nmol g⁻¹ matéria fresca)		H₂O₂ (μmol g⁻¹ matéria fresca)	
	Controle	Estresse hídrico	Controle	Estresse hídrico
SP	1,40 bB	2,80 bA	1,20 aB	1,65 aA
P12	2,30 aB	3,38 aA	0,86 abB	1,46 abA
P36	1,76 bB	2,41 bA	0,59 bB	1,02 bA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade (minúscula entre tratamentos de priming in vitro e maiúscula entre tratamentos de estresse salino gradativo)

O estresse salino promoveu aumento na atividade enzimática da SOD, APX e CAT (Tabela 6). Aumento na atividade da SOD foi verificado nos tratamentos SP e P12 quando submetidos ao estresse salino, porém o P12, apresentou os menores valores na atividade dessa enzima quando submetido ao tratamento controle ou a 60 mM de NaCl (Tabela 6). Entre os tratamentos de priming, o P36 obteve a maior atividade da SOD, contudo a sua atividade não apresentou alterações devido ao estresse salino (Tabela 6). O tratamento SP foi o que apresentou uma maior atividade da APX, já a CAT, a maior atividade foi verificada nos tratamentos P12 e P36, tanto no controle como no mais alto nível de salinidade (S100) (Tabela 6).

Tabela 6 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em folhas de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de priming in vitro com 25 mM de NaCl (SP = sem priming; P12 = 12 h; P36 = 36 h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse salino gradativo (S0 = controle; S60 = 20→40→60 mM de NaCl; S100 = 20→60→100 mM de NaCl)

Priming in vitro	SOD (U SOD mg ⁻¹ proteína)			APX (μm AsA mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)			CAT (μm H ₂ O ₂ mg ⁻¹ proteína min ⁻¹)		
	S0	S60	S100	S0	S60	S100	S0	S60	S100
SP	10,63 bB	20,11 bA	19,06 bA	10.548 aB	17.345 aA	17.138 aA	88,67 bB	139,33 aA	138,67 bA
P12	7,55 cC	14,30 cB	20,74 bA	6.046 bA	7.528 cA	7.259 bA	143,33 aB	156,67 aAB	174,00 aA
P36	25,56 aA	24,34 aA	26,89 aA	9.098 aA	11.562 bA	9.475 bA	159,67 aA	162,00 aA	167,33 aA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade (minúscula entre tratamentos de priming in vitro e maiúscula entre tratamentos de estresse salino gradativo)

No que se refere às enzimas do sistema de defesa antioxidativo, observaram-se distintas respostas ao estresse hídrico (Tabela 7). O estresse hídrico não proporcionou aumento na atividade da SOD nas plantas do tratamento P36, mas os seus valores foram superiores aos das plantas do SP e P12, com ou sem suspensão de rega. A SOD apresentou aumento da atividade nas plantas dos tratamentos SP e P12 quando submetidas ao estresse hídrico. A APX, por sua vez, não teve sua atividade alterada pelo estresse hídrico, mas as plantas do P12 apresentaram os mais baixos valores de atividade dessa enzima. No regime de rega plena, as plantas do SP mostraram baixa atividade da CAT, mas praticamente duplicaram esse valor quando submetidas ao estresse hídrico. Nas plantas do P36 a atividade da CAT também aumentou em condição de estresse, está foi superior à atividade das plantas do SP e P12 (Tabela 7).

Tabela 7 Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em folhas de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710 provenientes de tratamentos de *priming in vitro* com 25 mM de NaCl (SP = sem *priming*; P12 = 12h; P36 = 36h) na fase de multiplicação em biorreatores de imersão temporária (BIT), aos 30 dias de estresse hídrico gradativo (Controle = 100% da CP; estresse hídrico gradual = 50% da CP seguido de 25% da CP, durante 15 dias cada)

Priming in vitro	SOD (U SOD mg⁻¹ proteína)		APX (µm H₂O₂ mg⁻¹ proteína min⁻¹)		CAT (µm H₂O₂ mg⁻¹ proteína min⁻¹)	
	Controle	Estresse hídrico	Controle	Estresse hídrico	Controle	Estresse hídrico
SP	10,63 bB	17,92 bA	10.548 aA	12.725 aA	88,67 bB	163,33 bA
P12	7,55 bB	14,53 bA	6.046 bA	6.156 bA	143,33 aA	164,00 bA
P36	25,56 aA	28,75 aA	9.098 abA	9.966 aA	159,67 aB	229,00 aA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade (minúscula entre tratamentos de *priming in vitro* e maiúscula entre tratamentos de estresse salino gradativo)

Discussão

Biometria e biomassa

As respostas das plantas aos estresses hídrico e salino têm muito em comum (Munns 2002). A diminuição do crescimento em decorrência desses fatores de estresse já foi amplamente registrada na literatura (Osakabe et al. 2014; Parihar et al. 2015).

No que se refere à cana-de-açúcar, sabe-se que se trata de uma típica glicófito e que pode ter seu crescimento reduzido ou paralisado, apresentando queda de rendimento de até 50% frente a seu potencial produtivo quando submetida a estresse salino (Rao e Shaw 1985). A

salinidade reduz a produção de biomassa de cana-de-açúcar (Ashraf et al. 2010), bem como o comprimento de parte aérea e raiz, volume de raiz e área foliar, conforme registrado em genótipos submetidos a 150 e 200 mM de NaCl em cultivo hidropônico durante 50 dias (Anitha et al. 2015).

Distintas variáveis biométricas podem ser consideradas na avaliação do crescimento das plantas e podem apresentar maior ou menor sensibilidade ao fator imposto. Quando submetida ao estresse salino durante 30 dias, a variedade RB98710 apresentou reduções mais expressivas na BSR e no ØPA, da ordem de 27% e 22%, respectivamente, enquanto que a BSPA foi reduzida em menos de 19%.

Em geral, no início do estresse o crescimento da parte aérea é, frequentemente, mais afetado que o do sistema radicular. Numa escala temporal, o efeito da salinidade sobre o crescimento após as primeiras horas é claramente devido à diminuição da disponibilidade hídrica, sem embargo, na escala de dias ou semanas, o controle do crescimento é provavelmente regulado mais pela ação hormonal do que pelo status hídrico (Munns 2002). No 30º dia de exposição ao estresse salino, o sistema radicular foi o mais afetado (Tabela 1). A parte aérea, por sua vez foi a mais afetada sob condições de estresse hídrico, apresentado uma redução de 20 % enquanto que a BSR reduziu em apenas 15%, frente às plantas do tratamento controle (Tabela 2).

Alguns trabalhos têm avaliado os efeitos do estresse hídrico em cana-de-açúcar e demonstrado que a taxa de crescimento é o primeiro processo afetado pela redução da disponibilidade hídrica (Koonjah et al. 2006; Inmam-Bamber et al. 2008). A queda no acúmulo de biomassa e no crescimento em ØPA nas plantas submetidas à salinidade e à redução da disponibilidade de água evidenciam a sensibilidade desse processo fisiológico na variedade estudada.

Os tratamentos de pré-condicionamento *in vitro* com NaCl não tiveram efeito significativo sobre o crescimento das plantas quando submetidas, durante 30 dias, a estresse salino ou hídrico. Tem-se observado resultados contrastantes em resposta ao halopriming em plantas submetidas a estresse salino ou hídrico. As variações nas respostas mostram-se dependente das variáveis de crescimento avaliadas, da intensidade e/ou duração do tratamento pré-condicionante (Goswami et al. 2013), do tipo de estresse imposto após o priming (Goswami et al. 2013; Patade et al. 2015), dos genótipos estudados (Patade et al. 2009; 2012), bem como da época de avaliação (Maswada e El-Kader 2016).

O efeito do priming em sementes de trigo sobre a biomassa seca de parte aérea e raiz das plantas não foi evidenciado aos 30 dias após o plantio (fase de perfilhamento), mas somente aos 60 e 90 dias, correspondente às fases de crescimento de caule e floração, respectivamente

(Maswada e El-Kader 2016). A fase fenológica e o tempo decorrido desde a aplicação do *priming* foram condicionantes dos dados obtidos para as cultivares de trigo do trabalho citado. A ausência do efeito do *priming in vitro* nas avaliações de biomassa e ØPA nas plantas da variedade RB98710 de cana-de-açúcar também pode ser reflexo da época de avaliação realizada, e por ter sido pontual e não ao longo do período experimental. A teoria da Síndrome Geral de Adaptação (GAS – General Adaptation Syndrome), proposta em 1936 por Seyle, abrange as respostas não específicas que ocorrem em todo o organismo ao longo do período a que está submetido ao agente estressor (Fonder 2013). Avaliações ao longo dos 30 dias de exposição ao estresse ou o prolongamento do período experimental com avaliações periódicas poderiam mostrar diferenças aos pré-tratamentos condicionantes aplicados *in vitro*.

Teores de MDA, H₂O₂ e atividade enzimática do sistema de defesa antioxidativo

Assim como o estresse hídrico, o estresse salino também promove uma redução do potencial osmótico, devido a elevada concentração de soluto na solução do solo (Willadino e Camara 2010). Ambos tendem a promover aumento na geração de espécies reativas de oxigênio, caracterizando o estresse oxidativo (Gill e Tuteja 2010). A quantificação de MDA é comumente utilizada para analisar a peroxidação lipídica de plantas sob estresse (Cia et al. 2012; Maswada e El-Kader 2016), visto que o seu aumento confirma um alto nível de estresse oxidativo (Zengin 2013). Plantas de *Triticum aestivum* L. apresentaram teores de MDA inferiores ao controle quando suas sementes foram submetidas a diferentes tratamentos *priming* (Maswada & El-Kader 2016). Esses resultados estão de acordo com os obtidos na variedade RB98710, na qual o nível de peroxidação lipídica, demonstrado através do teor de MDA teve um aumento nas plantas que não foram submetidas ao tratamento de *priming in vitro* (tratamento controle). Por outro lado, esse aumento não foi observado nas plantas pré-condicionadas (P12 e P36), quando submetidas aos dois níveis de estresse salino (Tabela 3), o que evidencia ausência de peroxidação lipídica das membranas celulares. O baixo teor de MDA nas plantas do tratamento P36 (Tabela 3) em relação ao controle, no nível salino mais alto (S100) pode ser explicado pelo baixo teor de H₂O₂ no mesmo tratamento de *priming* (Tabela 4). De forma oposta o alto teor de MDA do tratamento SP, durante o estresse salino (Tabela 3) também pode ser justificado pelo alto teor de H₂O₂ no mesmo tratamento (Tabela 4). Já foi demonstrado que o H₂O₂ não atua na peroxidação de lipídios de membrana, porém a reação dessa ROS com o radical $\cdot\text{O}_2^-$, na presença de catalisadores metálicos como o ferro (Fe²⁺ e Fe³⁺), tem como produto o radical OH \cdot , este é capaz de reagir com átomos de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados dos lipídios, promovendo danos às membranas celulares (Gill e Tuteja

2010). Portanto, controlar os níveis de H_2O_2 e assim evitar a formação do radical OH^\bullet é essencial. Uma vez que, não se conhece nenhum mecanismo enzimático que possa promover a eliminação dessa ROS altamente reativa (Vranová et al. 2002).

A geração de ROS via estresses abióticos como exemplo, a escassez de água é bastante regular, contudo quando o equilíbrio é perturbado, eventos como a peroxidação lipídica, degradação do sistema de defesa antioxidativo e alterações na expressão de genes são desencadeados (Choudhury et al. 2013). O estresse hídrico promoveu aumento no teor de MDA e H_2O_2 , independente do tratamento de priming (Tabela 5). Porém, o tratamento P36 apresentou um menor teor de MDA e H_2O_2 , independentemente de estar ou não sob estresse hídrico (Tabela 5). Diferentes condições de estresse hídrico também promoveram aumento na peroxidação lipídica, estimada pelo conteúdo de MDA, bem como no teor de H_2O_2 em variedades sensíveis (SP90-3414 e SP90-1638) e tolerantes (SP83-2847 e SP83-5073) de cana-de-açúcar (Cia et al. 2012). O pré-condicionamento em sementes de *Oryza sativa* L., com ácido salicílico, não conseguiu manter os níveis de H_2O_2 , quando as plantas foram submetidas ao estresse hídrico, assim como o MDA, o que proporcionou uma alta peroxidação lipídica (Farooq et al. 2009).

Segundo alguns autores, a alta atividade de enzimas antioxidantes demonstra eficiência no controle do estresse oxidativo, porém também é relatado que altas atividades evidenciam sintomas de estresse oxidativo ou dano (Abogadallah 2010; Barakat et al. 2013). Diante disso é primordial que a interpretação da atividade das enzimas envolvidas no controle das ROS seja baseada nas respostas globais da planta, o que irá proporcionar uma correlação correta entre a atividade enzimática e a adaptação da planta ao estresse (Abogadallah 2010). Foi verificado que as plantas que não foram submetidas ao pré-condicionamento *in vitro* (SP) apresentaram aumento na atividade da SOD, APX e CAT, quando submetidas ao estresse salino, porém a atuação conjunta dessas enzimas não foi suficiente para controlar o teor de H_2O_2 e evitar o aumento da peroxidação lipídica (Tabela 3). Esses resultados corroboram com os obtidos em plantas de *Triticum aestivum* L. submetidas a estresse salino, as quais apresentaram aumento na atividade enzimática e na peroxidação lipídica, quando comparada as pré-condicionadas com ácido salicílico (Abedini e Daie-Hassani 2015). A SOD é considerada a primeira enzima na linha de defesa contra as ROS (Barbosa et al 2014). Ela catalisa a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$, gerando H_2O_2 e oxigênio molecular (O_2), o que previne a formação de radicais OH^\bullet (Dinakar et al. 2012). O H_2O_2 é capaz de atravessar membranas e dependendo da sua concentração pode agir duplamente. Quando em altas concentrações pode provocar estresse oxidativo e em baixas concentrações age como um segundo mensageiro, promovendo sinalização de respostas de aclimatação ao estresse (Moller et al. 2007; Quan et al. 2008). O aumento na atividade de enzimas que catalisam a decomposição do H_2O_2 desempenha um importante papel na adaptação

das plantas sob condições de salinidade, evitando o acúmulo dessa ROS a níveis tóxicos (Miller et al. 2010), o que pode ser observado nas plantas pré-condicionadas durante 36h (P36). Apesar desse tratamento apresentar a maior atividade da SOD, a produção de H_2O_2 , por essa via foi controlada pelo sistema de defesa antioxidativo (Tabela 6). Essa sintonia entre o baixo teor de H_2O_2 e atividade das enzimas demonstra que o sistema de defesa antioxidativo atuou de forma positiva e evitou a peroxidação lipídica no tratamento P36, quando o mesmo foi submetido ao estresse salino (Tabela 3). Durante o intervalo de tempo em que ocorre a percepção do *priming* e a futura exposição ao novo estresse, a planta precisa gerar e armazenar informações que permitirão uma resposta mais rápida e ou mais precisa ao estresse (Pastor et al. 2014). Várias pesquisas demonstram que tratamentos de pré-condicionamento conseguiram ativar o sistema de defesa antioxidativo e promover a aclimação das plantas ao estresse salino, em variedades de *Oryza sativa* L. (Carvalho et al. 2011), *Saccharum officinarum* L. (Patade et al. 2012), dentre outras. A exposição a níveis de estresse demasiadamente fracos, podem não promover uma capacidade de defesa adequada, em contrapartida estresses extremos induzem as plantas a um maior grau de condicionamento ou rustificação (Larcher 2004). Os mecanismos que regem as respostas ao estresse parecem ser mais complicados do que simples cascatas de sinalização, a suposição é que as plantas possam armazenar respostas de estresses bióticos e abióticos, o que é geralmente definido como “stress imprint”, este pode provocar modificações genéticas ou bioquímicas que auxiliam na resposta a um futuro ciclo de estresse (Jiménez-Arias et al. 2015). Portanto é imprescindível que haja um ajuste entre a concentração de agente estressante e o tempo de exposição ao estresse, para que a planta consiga “memorizar” o estresse e responder de forma efetiva.

Geralmente, a alta atividade de enzimas como a SOD é correlacionada com o aumento do estresse oxidativo (Santos et al. 2015) e durante situações de estresse hídrico, o aumento da sua atividade foi verificado em espécies como *Sorghum bicolor* L. (Zhang et al. 2015) e *Saccharum* spp. (Santos e Silva 2015), o que corrobora com os resultados obtidos no presente experimento. O aumento na atividade da SOD, devido ao estresse hídrico (Tabela 7) possivelmente contribuiu para o acúmulo no teor de H_2O_2 , nas plantas dos tratamentos SP e P12 (Tabela 5). O H_2O_2 pode ser produzido via glicolato oxidase, xantina oxidase (XOD) e através da β -oxidação de ácidos graxos, no entanto, ele também é um produto da atividade da SOD (Neill et al. 2002; Sharma et al. 2012). Frente ao controle dessa espécie reativa estão a CAT e a APX, ambas participam de um conjunto de enzimas que promovem a eliminação do H_2O_2 (Das et al. 2015).

O estresse hídrico afeta as plantas em vários níveis de organização e na membrana ele promove deslocamento de proteínas, o que contribui para a perda da integridade seletiva e a redução da atividade de enzimas (Mahaja e Tuteja 2005), provocando um desequilíbrio no

sistema redox e consequentemente o estresse oxidativo (Dinakar et al. 2012). O estresse oxidativo é bem reportado em diferentes variedades da espécie *Saccharum* (Boaretto et al. 2014; Santos et al. 2015) e também pôde ser constatado na variedade RB98710 avaliada neste experimento. Os resultados das atividades da APX e da CAT nos tratamentos SP e P12 (Tabela 7) demonstraram que o estresse hídrico provavelmente promoveu um desequilíbrio no sistema redox, o que impossibilitou uma ação mais efetiva dessas enzimas, ocasionou aumento no teor de H₂O₂ e um maior nível de peroxidação lipídica (Tabela 5). O tratamento P36, quando comparado aos demais tratamentos de priming apresentou uma maior atividade da CAT (Tabela 7), o que proporcionou um menor teor de H₂O₂ nas plantas pré-condicionadas durante 36 h (Tabela 5). Porém o sistema de defesa antioxidativo não conseguiu evitar o aumento da peroxidação lipídica das plantas do tratamento P36, quando submetidas ao estresse hídrico (Tabela 5). A utilização do NaCl como agente pré-condicionante ao estresse hídrico, não foi efetiva no controle dos níveis de peroxidação lipídica da variedade RB98710. Isso pode ser possível porque, a salinidade além de promover um efeito osmótico nas plantas, ela também produz um efeito iônico (Willadino e Camara 2010). Por outro lado, a utilização de agentes de pré-condicionamento que submetam o órgão vegetal a apenas um potencial osmótico baixo, como o polietilenoglicol (PEG) têm apresentado respostas positivas na ativação do sistema de defesa antioxidativo, promovendo o controle da peroxidação lipídica, bem como o melhor desenvolvimento da planta em condição de estresse (Yuan-Yuan et al. 2010; Zhang et al. 2015). Isso reforça a ideia de que as respostas promovidas pelo priming são dependentes de vários fatores (Goswami et al. 2013; Patade et al 2015).

Os tratamentos de priming proporcionaram uma melhor ativação do sistema de defesa antioxidativo quando as plantas foram submetidas ao estresse salino, evitando a peroxidação lipídica. Contudo, durante os 30 dias de estresses salino e hídrico, o priming não promoveu efeito pré-condicionante, que favorecesse a manutenção do crescimento das plantas em condições de estresse. Baseado nesses resultados é possível afirmar, que a concentração de 25 mM de NaCl e os tempos de pré-condicionamento (12 e 36 h) utilizados nas plantas da variedade RB98710, não foram eficientes para promover um efeito pré-condicionante aos estresses salino e hídrico.

Contribuição dos autores

Gemima M. de Melo e Marta R. Barbosa foram responsáveis pela execução e análise do experimento. Em conjunto com Arnóbio G. Andrade e Terezinha R. Camara foi realizada a redação do manuscrito. O manuscrito foi aprovado por todos os autores e os mesmos afirmam não haver conflitos de interesses.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia/FACEPE pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa de doutorado e ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste/CETENE pela infraestrutura.

Referências

- Abedini M, Daie-Hassani B (2015) Salicylic acid affects wheat cultivars antioxidant system under saline and non-saline condition. *Russian Journal of Plant Physiology* 62(5): 604-610
- Abogadallah GM (2010) Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling e Behavior* 5(4): 369-374
- Anitha R, Mary PCN, Savery MAJR, Sritharan N, Purushothaman RS (2015) Differential responses of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genotypes under salt stress condition. *Plant Archives* 15(2): 1055-1060
- Ashraf M, Rahmatullah, Ahmad R, Bhatti AS, Afzal M, Sarwar A, Maqsood MA, Kanwal S (2010) Amelioration of salt stress in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) by supplying potassium and silicon in hydroponics. *Pedosphere* 20(2): 153-162
- Assis E, Silva FAZ (2013). Assistat 7.7 beta. DEAG-CTRN-UFCG, Campina Grande.
- Barakat N, Laudadio V, Cazzato E, Tufarelli V (2013) Antioxidant potential and oxidative stress markers in wheat (*Triticum aestivum*) treated with phytohormones under salt-stress condition. *International Journal of Agriculture & Biology* 15(5):843-849
- Barbosa MR, Silva MMA, Willadino L, Ulisses C, Camara TR. (2014) Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural* 44(3):453-460
- Berris LSJR, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry* 195(1): 133-140

- Boaretto LF, Carvalho G, Borgo L, Creste S, Landell MGA, Mazzafera P, Azevedo RA (2014) Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry* 74:165–175
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254
- Carvalho FEL, Lobo AKM, Bonifacio A, Martins MO, Lima Neto MC, Silveira JAG (2011) Aclimação ao estresse salino em plantas de arroz induzida pelo pré-tratamento com H₂O₂. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 15(4):416–423
- Choudhury S, Panda P, Sahoo L, Panda SK (2013) Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* 8(4): 1-6. doi: doi.org/10.4161/psb.23681
- Cia MC, Guimarães ACR, Medici LO, Chabregas SM, Azevedo RA (2012) Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. *Annals of Applied Biology* 161:313–324
- Das P, Nutan KK, Singla-Pareek S, Pareek A (2015) Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles. *Frontiers in Environmental Science* 2(70): 1–11. doi: 10.3389/fenvs.2014.00070
- Dinakar C, Djilianov D, Bartels D (2012) Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science* 182:29–41
- Farooq M, Basra SMA, Wahid A, Ahmad N, Saleem BA (2009) Improving the drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by exogenous application of salicylic acid. *Journal Agronomy & Crop Science* 195:237–246
- Giannopolitis CN, Reis SK (1977) Superoxide dismutases. *Plant Physiology* 59:309–314
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909–930
- Goswami A, Banerjee R, Raha S (2013) Drought resistance in rice seedlings conferred by seed priming: role of the anti-oxidant defense mechanisms. *Protoplasma* 250: 1115–1129. doi: 10.1007/s00709-013-0487-x
- Inmam-Bamber NG, Bonnet GD, Spillman MF, Hewitt ML, Jackson J (2008) Increasing sucrose accumulation in sugarcane by manipulating leaf extension and photosynthesis with irrigation. *Australian Journal of Agricultural Research* 59: 13–26
- Jiménez-Arias D, Pérez JA, Luis JC, Martín-Rodríguez VM, Valdés-González F, Borges AA (2015) Treating seeds in menadione sodium bisulphite primes salt tolerance in *Arabidopsis* by inducing an earlier plant adaptation. *Environmental and Experimental Botany* 109:23–30

- Jisha KC, Puthur JT (2014) Halopriming of seeds imparts tolerance to NaCl and PEG induced stress in *Vigna radiata* (L.) Wilczek varieties. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 20(3):303–312
- Koonjah SS, Walker S, Singels A, Van Antwerpen R, Nayamuth AR (2006) A quantitative study of water stress effect on sugarcane photosynthesis. *Proceedings of the South African Sugar Technologists Association* 80: 148–158
- Larcher W. *Ecofisiologia vegetal*. Rima, São Carlos
- Lokhande VH, Suprasanna P (2012) Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance. In: W P, Prasad MNV (ed). *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change*, pp 29–56
- Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry* 444:139–158. doi: 10.1016/j.abb.2005.10.018
- Maswada HF, Abd El-Kader NIK (2016) Redox halopriming: a promising strategy for inducing salt tolerance in bread wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* 202: 37–50
- Melo GM, Barbosa MR, Dias ALF, Willadino L, Camara TR (2014) Pré-condicionamento in vitro de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) para tolerância ao estresse salino. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 18:27–33
- Miller JD, Gilbert RA, Odero DC (2010) Sugarcane botany: a brief view. University of Florida
- Moller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58:459–481
- Mullineaux PM, Baker NR (2010) Oxidative stress: antagonistic signaling for acclimation or cell death? *Plant Physiology* 154: 521–525
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239–250
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22:867–880
- Nawaz J, Hussain M, Jabbar A, Nadeem GA, Sajid M, Subtain, M, Shabbir I (2013) Seed priming a technique. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 6(20):1373–1381
- Neill S, Desikan R, Hancock J (2002) Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 5:388–395

- Oliveira AR, Braga MB (2011) Florescimento e acamamento de cultivares de cana-de-açúcar submetidas a diferentes lâminas de irrigação. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Semiárido, Petrolina
- Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP (2014) Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant science* 5(86): 1–8. doi: 10.3389/fpls.2014.00086
- Parihar P, Singh S, Sing R, Sing VP, Prasad SM (2015) Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22(6):4056–4075. doi: 10.1007/s11356-014-3739-1
- Pastor V, Balmer A, Gamir J, Flors V, Mauch-Mani B (2014) Preparing to fight back: generation and storage of priming compounds. *Frontiers in Plant Science* 5:1–12
- Patade VY, Bhargava S, Suprasanna P (2009) Halopriming imparts tolerance to salt and PEG induced drought stress in sugarcane. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 134:24–28.
- Patade VY, Bhargava S, Suprasanna P (2012) Halopriming mediated salt and iso-osmotic PEG stress tolerance and, gene expression profiling in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Molecular Biology Reports* 39:9563–9572
- Patade VY, Bhargava S, Suprasanna P (2015). Better osmotic adjustment mediates salt and PEG stress tolerance in primed plants of contrasting cultivars of sugarcane. *Sugar Tech* 17(4): 348–355. doi: 10.1007/s12355-014-0350-1
- Quan L-J, Zhang B, Shi W-W, Li H-Y (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(1): 2–18
- Rao, SM, Shaw MAE (1985) A review of research on sugarcane soils of Jamaica. *Proceedings of the 1985 meeting West Indies Sugar Technologists* 2: 343–55.
- Ridesa (2010) Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. *Catalogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar*. Curitiba. 136p.
- Sani E, Herzyk P, Perrella G, Colot V, Amtmann A (2013) Hyperosmotic priming of *Arabidopsis* seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. *Genome Biology* 14: 2–23. doi: 10.1186/gb-2013-14-6-r59
- Santos CM, Silva MA (2015) Physiological and biochemical responses of sugarcane to oxidative stress induced by water deficit and paraquat. *Acta Physiologiae Plantarum* 37(172): 1–14. doi: 10.1007/s11738-015-1935-3
- Santos CM, Silva MA, Lima GPP, Bortolheiro FPAP, Brunelli MC, Holanda LA, Oliver R (2015) Physiological changes associated with antioxidant enzymes in response to sugarcane tolerance to water deficit and rehydration. *Sugar Tech* 17(3): 291–304

- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* doi:10.1155/2012/217037
- Silva MAS, Santos CM, Arantes MT, Pincelli RP (2010) Fenologia da cana-de-açúcar. In: Cruciol CAC, Silva MA, Rossetto R, Soratto RP (ed) *Ecofisiologia da cana-de-açúcar*, 1ed. Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, Botucatu, pp 8–21
- Souza CC, Oliveira FA, Silva IF, Amorim Neto MS (2000) Avaliação de métodos de determinação de água disponível e manejo da irrigação em terra roxa sob cultivo de algodoeiro herbáceo. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 4(3): 338–342
- Tavili A, Zare S, Moosavi SA, Enayati A (2010) Effects of priming techniques on seed germination and early growth characteristics of *Bromus tomentellus* L. and *Bromus inermis* L. *Notulae Scientia Biologicae* 2(1): 104–108
- Vranová E, Inzé D, Breusegem FV (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53(372):1227–1236
- Willadino L, Camara T (2010) Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. *Enciclopédia Biosfera* 6(11): 1–19
- Yuan-Yuan S, Yong-Jian S, Ming-Tian W, Xu-yi L, Xiang G, Rong H, Jun M (2010) effects of seed priming on germination and seedling growth under water stress in rice. *Acta Agronomica Sinica* 36(11): 1931-1940. doi: 10.1016/S1875-2780(09)60085–7
- Zengin F. (2013) Physiological behavior of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings under metal stress. *Biological Research* 46:79–85
- Zeraik AE, Souza FS, Fatibelho-Filho O, Leite OD (2008) Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Química Nova* 31:731–73
- Zhang F, Yu J, Johnston CR, Wang Y, Zhu K, Lu F, Zhang Z, Zou J (2015) Seed priming with polyethylene glycol induces physiological changes in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) seedlings under suboptimal soil moisture environments. *Plos One*. doi:10.1371/journal.pone.0140620

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ∞ Plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, pré-condicionadas durante a fase de multiplicação em sistema de biorreatores de imersão temporária apresentam tolerância ao estresse salino, quando são expostas a um novo ciclo de 30 dias de estresse;
- ∞ A aplicação de *priming in vitro* com 100 mM de cloreto de sódio, durante 24 horas favorece o pré-condicionamento de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, o que proporciona modulação do seu equilíbrio redox, quando as mesmas são submetidas a um novo ciclo de estresse salino, com duração de 30 dias;
- ∞ O tempo de exposição e a concentração do agente pré-condicionante são fatores que interferem no efeito do *priming in vitro*;
- ∞ A aplicação de halopríming com 25 mM de cloreto de sódio, durante a fase de multiplicação em sistema de biorreatores de imersão temporária, não promoveu efeito pré-condicionante ao estresse salino e hídrico, nas plantas de cana-de-açúcar da variedade RB98710;
- ∞ A ausência do efeito pré-condicionante na variedade RB98710 reforça o conceito da variabilidade genotípica e a necessidade de ajustes de protocolos de pré-condicionamento por genótipos;
- ∞ O pré-condicionamento de plantas de cana-de-açúcar em sistema de biorreatores de imersão temporária é uma técnica simples, de baixo custo e capaz de promover tolerância. Porém, ela necessita de análises adicionais para avaliar o seu efeito durante o desenvolvimento da planta em condições de campo.

ANEXOS

NORMATIZAÇÃO DOS PERIÓDICOS

NORMAS DO PERIÓDICO PLANT BIOLOGY

Instructions for authors

Supporting Information: Authors are encouraged to provide additional materials as Supporting Information that will be accessible online. Please identify the Supporting Information as such and include appropriate figure and table captions at the end of the manuscript.

Editorial Policy

Plant Biology publishes research results from all fields of plant science. Manuscripts must be of general interest, not only addressed to a specialized readership. The journal encourages publications with an interdisciplinary approach.

Plant Biology accepts

1. Problem-oriented original research papers (maximum 9000 words)
2. Problem-oriented short research papers (maximum five typeset pages)
3. Concise review articles
4. Acute views, i.e., comments on actual problems and provocative opinion articles. Purely descriptive papers will not be accepted. The Editors welcome contributions from all over the world.

Effective with the 2015 volume, this journal will be published in an online-only format. Print subscription and single issue sales are available from Wiley's Print-on-Demand Partner. To order online click through to the ordering portal from the journal's subscribe and renew page on Wiley Online Library.

Submission of Manuscripts

Please submit your manuscript online at [ScholarOne Manuscripts](#).

To submit a manuscript through ScholarOne Manuscripts, please follow these instructions:

1. If you do not yet have an account, go to <http://mc.manuscriptcentral.com/plabio> and click on 'Create Account'. You will then be sent a password by e-mail. If you already have an account, enter your user ID and password and click on 'Log In'. (Note: if necessary you can change your password under 'Edit My Account'.)

On the welcome page, click on 'Corresponding Author Center'.

3. You then reach the 'Author Center Dashboard', click on the star icon for manuscript submission.

4. Follow the steps 1-7 until manuscript submission is completed. The main document including title, abstract, key words (MS Word file), tables (MS Word files) and figures (*.eps, *.tif or *.jpg files) are loaded onto the system as individual files. The text should be written double spaced and with line numbering. (Note: you may also interrupt the online submission and continue at a later time.) Authors are encouraged to provide additional information as Supporting Information that will be accessible online.

5. Fast-Track Publication: *Plant Biology* offers special handling of manuscripts that have been rejected from very high-level journals. Authors are encouraged to enclose the original manuscript, the reviews plus the comments from the editor, and the revised manuscript of previously reviewed manuscripts to expedite their handling as your manuscript may be accepted based on the previous reviews. Please also include a letter with a point by point response to the concerns raised by the reviewer(s). You will receive a final decision from the Managing Editor within a few days of submitting manuscripts with reviews.

6. Authors should address the following points in their cover letter. 1. What are the aims and hypothesis of their paper?; 2. What new achievements or innovations do they present?; 3. What is the general significance of their paper and why is it timely?

7. Submission of your manuscript will be confirmed by an e-mail that will give you the 'Manuscript ID Number'. Please refer to this number in all correspondence with the editorial office. With your submission, you guarantee that all co-authors agree with the submission of the manuscript.

Should you encounter difficulties submitting a manuscript to ScholarOne Manuscripts, please contact the editorial office by e-mail at annette.schlierenkamp@ctp.uni-freiburg.de or by telephone ++49(0)761/203-8300. Help is also available on the introductory page of ScholarOne Manuscripts in the form of an 'Online User's Guide'. To access the guide, click on 'Get Help Now' in the top right-hand corner.

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online. Authors can check the status of their articles online

and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Conditions for Publication

Research papers may be submitted that have not been published previously, even as a summary. Concise presentation is required. Although the non-specialist reader should be kept in mind when abstracts, introductions and discussions are written, lengthy review type introductions and speculative discussions should be avoided. Experimental methods should be explained in detail except for standard procedures. Diffuse and repetitive style should be avoided. Illustrations and tables should be limited to the truly essential material.

Plant Biology preferentially publishes **short research papers** (five typeset pages maximum) that will be reviewed with high priority.

Concise review articles that synthesize the state of the art in an original way are highly desirable for this journal.

Acute views contributions should contain brief comments on an actual problem (2-3 typeset pages).

CrossCheck for plagiarism: All submissions will be run through CrossCheck to identify any plagiarism. If an author is found to have plagiarized all or parts of his or work, the author's institute will be notified of the breach of scientific conduct.

New: Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscripts professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at

http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Length of Papers

Papers should not exceed 8 printed pages or 9,000 words. One typeset page in the journal (without figures and tables, with about 3 subheads and paragraphs) usually contains roughly 6200 characters. The number of figures plus tables should not exceed 9. Appendices will be published as Supporting Information rather than in the main text.

References: About 40 to 50 references usually fill one printed page.

Page Charges: Original research papers longer than the guidelines given above when in proof are subject to a page charge at a rate of €125 per page above the 8-page limit (first 8 pages are free of charge). An invoice will be sent to authors for these charges upon publication of their article in an issue. Invited and review articles are excluded from this rule.

Arrangement

Research papers

Title page: The first page of each paper should indicate: The title, the authors' names and affiliations, a short title for use as running head, the name, address, e-mail address, phone and fax number of the corresponding author, and 3 to 7 keywords.

Abbreviation: List with abbreviations where appropriate.

Abstract: The abstract must be usable as a stand-alone document and must not exceed 250 words. For all papers submitted from 2016 onwards, a structured abstract is required using four bullet points to indicate (1) the research conducted including its rationale, (2) central methods applied, (3) key results, and (4) main conclusions including key points of discussion. It should not contain citations of other papers. For reviews, bullet points do not apply.

The following sections cover the usual contents: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References (see below), Tables (see below), Figure legends (see below), Illustrations (see below).

In Materials and Methods, Results and Discussion subheadings are possible. If an author chooses to combine sections Results and Discussion, an additional section Conclusions can be added, but this must be brief.

Concise review articles

Choose subheadings as appropriate but do not use a numbering system. Title page, Key words, Abstract and other items as for full length papers.

Tables

Tables must be serially numbered in Arabic numerals and each must carry a brief descriptive heading. Tables reproduced from other publications must state their precise source. Only signs that can be typeset should be used in the tables and legends. Please provide Tables in Word and include them at the end of the manuscript after the References, each on a separate page. Refrain from using both tables and graphs to demonstrate the same results.

Figures and Graphics

Electronic artwork

It is essential that all artwork is provided in electronic format. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Post-script (EPS) format and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image Format (TIFF). Detailed information on our digital illustration standards is available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Please do not embed any tables and/or figures in the text document.

If you should encounter difficulties upon submitting figures and graphics, please contact the editorial office by e-mail under annette.schlierenkamp@ctp.uni-freiburg.de or by telephone under ++ 49/(0)761/203-8300.

References

The list of references must include all (but no additional) references quoted. Arrange references alphabetically according to author name, not chronologically. The name of the journals containing the cited papers should be given in full. Town/city and country names should be provided for non-journal refs.

Each article reference should be given as in the following example:

Alfano J.R., Collmer A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defence. *Annual Review Phytopathology*, **42**, 385–414.

Books or other non-serial publications which are quoted in the references must be cited as follows:

Gage J.D., Tyler P.A. (1991) *Deep-sea Biology: A Natural History of Organisms at the Deep-sea Floor*. Cambridge University Press, Cambridge, UK: 504 pp.

Lester R.N., Hasan S.M.Z. (1991) Origin and domestication of the brinjal eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum*, in Africa and Asia. In: Hawkes J.G., Lester R.N., Nee M., Estrada N. (Eds), *Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew; London, UK: 369-387.

Articles not yet published may only be cited if they have definitely been accepted for publication. They must be denoted by the expression 'in press'.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

Units

Plant Biology will follow the system of SI units (Système International d'Unités). Within a given paper chosen units must be uniform.

Abbreviation

Note that common abbreviations can be used without explanation. Others must be explained. In case of doubt always give an explanation. Use FW = fresh weight and DW = dry weight.

Scientific Names

Scientific names should be cited in their complete form when first mentioned with genus - species - authority - cultivar (cv.) or subspecies (ssp.) where appropriate. Latin names should be underlined or typed in *italics*. Subsequently the generic names should be abbreviated, but avoid confusion: e.g. use *A. comosus* if the only genus with a first letter A in your paper is *Ananas*; but use unambiguous abbreviations if you have more than one genus with the same first letter, e.g. *Ananas comosus*, *Aechmea nudicaulis* = *A. comosus*, *Ae. nudicaulis*, etc. Common names of organisms must be accompanied by the correct scientific name when first mentioned. For rare or exotic genera it may be useful to give the name of the family and/or higher taxon in brackets when first mentioned.

Copyright

Authors will be required to assign copyright of their paper to the German Botanical Society, Royal Botanical Society of the Netherlands and Blackwell Publishing. Copyright assignment is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright should tick

relevant box on the form). The publishers will not refuse any reasonable request by authors for permission to reproduce their contributions to the journal.

Reprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. The corresponding author will be asked to provide up to seven email addresses for early distribution of a PDF offprint by the publisher. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for the printed offprints to take up to 8 weeks to arrive after publication of the journal. For further information please contact C.O.S. Printers PTe Ltd, 9 Kian Teck Crescent, Singapore 628875; Fax: +65 6265 9074; E-mail: offprint@cosprinters.com.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, the Publisher will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible after the final decision about publication.

Production

You will receive a proof of your article approximately 4 weeks after acceptance. The proof will contain instructions on how to return corrections and answers to the queries listed at the end of the proof.

Last update: October 2014

**NORMAS DA REVISTA BRASILEIRA DE ENGENHARIA AGRÍCOLA E
AMBIENTAL**

As normas do Periódico Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental podem ser visualizadas através do endereço eletrônico:

< <http://www.agriambi.com.br/INSTRUcoes-AOS-AUTORES.pdf> >

NORMAS DO PERIÓDICO ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM

Instructions for Authors

TYPES OF PAPERS

The journal publishes 4 types of papers

- Research Papers

The word count for the main text (including Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and Acknowledgements) should not exceed 6500 words. Manuscripts exceeding this limit will be returned to the author without review.

- Reviews

Please contact the Reviews Editor before submitting a manuscript.

- Short Communications

Please combine the Results and Discussion section.

1-2 figures/tables are allowed. The maximum word count for Short Communications is 3000 words.

- Opinion Papers

The journal does not publish protocols or technical notes.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

LANGUAGE

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to ask a native speaker to help you or arrange for your manuscript to be checked by a professional language editor prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

- Edanz Editing Global

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

Authors are expected to provide a short description of the contributions made by each listed author. It will be published in a separate section in front of the Acknowledgments.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- The text of a research paper should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest, and References.
- Materials and Methods must include statement of Human and Animal Rights.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

- Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- Genus and species names should be in italics.
- Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics.* Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics, 3rd edn.* Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure.* Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 2 kB\)](#)

TABLES

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

- In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that
- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

CONFLICT OF INTEREST

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas
Springer

publishes in:

- [Edanz English editing for scientists](#)

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

- [Edanz English editing for scientists](#)

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- [Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.