

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

***PRIMING INVITRO EM VARIEDADES DE CANA-DE-
AÇÚCAR (RB966928 e RB867515).***

RAFAELA PEREIRA DUARTE

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2017**

PRIMING INVITRO EM VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR
(RB966928 e RB867515)

RAFAELA PEREIRA DUARTE

Orientador: PROF. DR. RODRIGO KELSON SILVA REZENDE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Dourados
Mato Grosso Do Sul
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

D812p	Duarte, Rafaela Pereira. Priming in vitro em variedades de cana-de-açúcar (RB966928 e RB867515)./ Rafaela Pereira Duarte. – Dourados, MS : UFGD, 2017. 33f. Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Kelson Silva Rezende. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados. 1. Estresse salino . 2. Micropropagação. 3. <i>Saccharum officinarum</i> L. I. Título.
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

***PRIMING IN VITRO EM VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR (RB966928 e
RB867515)***

por

Rafaela Pereira Duarte

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande.

Aprovada em: ____/____/____

Dr.^a Fernanda Pinto
Universidade Federal da Grande
Dourados

Eng. Agrônomo Maílson Vieira Jesus
Universidade Federal da Grande
Dourados

Prof. Dr. Rodrigo Kelson Silva
Rezende
Orientador – UFGD/FCA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me iluminar e sempre suprir todas as minhas necessidades.

Ao meu orientador, professor Dr. Rodrigo Kelson Silva Rezende, pela orientação, confiança e oportunidade de trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Ederson Marcelo Klein, pela amizade, dedicação e auxílio durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À Dr.^a Fernanda Pinto, por toda a paciência, carinho e disponibilidade para sanar minhas dúvidas quando preciso.

Aos meus colegas de laboratório, em especial Ana Maria, Mariany, Izaias, Maílson e Everton. Muito obrigada por todo o auxílio para que o trabalho fosse concluído, e principalmente, agradeço pela amizade e por todos os momentos que compartilhamos dentro e fora do laboratório.

À minha família e amigos, em especial minha mãe Laiz e meu irmão Roberto que indiretamente fizeram toda a diferença por me dar todo apoio e amor necessário.

Agradeço aos meus amigos da graduação, Viviane, Joyce e Romário pela amizade, pelos grupos de estudos e companheirismo durante todo o curso.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de concluir meu curso de graduação em Biotecnologia.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 Cana-de-açúcar	13
3.2 Estresse Salino	14
3.3 Solos salinos	15
3.4 Pré-condicionamento (<i>priming</i>)	16
3.5 Micropropagação	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÕES	28
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

RESUMO

DUARTE, Rafaela Pereira. ***Priming in vitro* em variedades de cana-de-açúcar (RB966928 e RB867515)**. 2017. 33f. (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados - MS.

A cana-de-açúcar é uma cultura que assume lugar de destaque na economia mundial e no Brasil, e sendo uma glicófita apresenta sensibilidade a solos salinos em vários estágios de seu crescimento. A alta concentração de sal em solos agrícolas, principalmente aqueles que são irrigados, é motivo de grande preocupação, não só no Brasil, como no mundo. A aplicação de métodos de pré-condicionamento (*priming*) é uma estratégia que envolve uma exposição da planta a fatores de estresse bióticos ou abióticos, tornando-a mais resistente quando exposta a um novo ciclo de estresse. Com o objetivo de associar as técnicas de *priming* e de micropropagação, plantas de cana-de-açúcar das variedades RB966928 e RB867515, micropropagadas a partir de meristemas, receberam tratamentos de *priming* caracterizados pela adição separada de diferentes sais (NaCl e KCl) em diferentes concentrações (0,0; 12,5; 25,0 e 50,0mM) no meio MS. Concluídos os períodos de *priming*, as plantas foram cultivadas em meio de enraizamento sem adição de sais, aclimatizadas e submetidas a estresse salino *ex vitro* gradativo com regas de 20→40 e 60 mM de NaCl, durante 30 dias. Após o estresse *ex vitro*, as plantas foram avaliadas sob as variáveis: matéria seca da parte aérea (MSPA) e radicular (MSR), número de perfilhos, e índice de clorofila SPAD. Observou-se resposta distinta das variedades RB966928 e RB867515 quando submetidas aos tratamentos de *priming* com diferentes concentrações de NaCl e KCl. As mudanças nas concentrações dos tratamentos de *priming* apresentaram efeito significativo sob o índice de clorofila, sendo que os dois sais (NaCl e KCl) e as duas variedades (RB966928 e RB867515) geraram respostas distintas. A exposição ao agente agressor em tempo maior que 24 horas pode ser mais efetivo na geração de um estresse capaz de ativar o metabolismo celular e incrementar a atividade fisiológica da planta. Recomenda-se estudos com o aumento da duração dos tratamentos de *priming* e estudo mais detalhados da cultura ao longo do seu ciclo produtivo.

Palavras-chave: Estresse salino, micropropagação, *Saccharum officinarum* L.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resumo da análise de variância do número de perfilhos (NP), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), e índice SPAD de plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino sob diferentes tipos e concentrações de sais.....	23
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Plantas de cana-de-açúcar submetidas aos tratamentos de <i>priming in vitro</i>	21
FIGURA 2. Plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino <i>ex vitro</i>	21
FIGURA 3. Estimativa de clorofila pelo índice SPAD de plantas de cana-de-açúcar RB966928 e RB867515, provenientes da aplicação de <i>priming</i> com 0,0; 12,5; 25,0 e 50,0 mM de A) NaCl e B) KCl, submetidas a tratamento de estresse salino em casa de vegetação.....	24
FIGURA 4. A) Matéria seca da parte aérea - MSPA; B) Matéria seca da raiz – MSR e C) índice SPAD de plantas de cana-de-açúcar RB867515 e RB966928, provenientes da aplicação de <i>priming</i> e submetidas a estresse salino em casa de vegetação.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

AIB -ácido indolbutírico

KCl -cloreto de potássio

KIN-cinetina

MS - meio de cultura de Murashige e Skoog

MSPA -matéria seca da parte aérea

MSR -matéria seca da raiz

NaCl -cloreto de sódio

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma das principais culturas do mundo, cultivada em mais de 100 países. O Brasil não é somente o maior produtor de cana do mundo, mas também o primeiro na produção de açúcar e o segundo na produção de etanol, atraindo, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como opção energética. Estima-se que na safra 2016/17, a área colhida no Brasil de cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira seja de 9.1 milhões hectares (CONAB, 2016).

Uma das maiores limitações na produtividade de culturas é a salinidade dos solos, devido ao seu efeito negativo no crescimento das plantas, no equilíbrio de íons e nas relações hídricas (MUNNS e TESTER, 2008). A alta concentração de sal em solos agrícolas, principalmente aqueles que são irrigados, é motivo de grande preocupação, não só no Brasil, como no mundo. No Brasil, o problema da salinidade é maior nas regiões áridas e semiáridas, uma vez que estas apresentam naturalmente alta concentração de sais (RIBEIRO et al., 2003). O uso dos solos salinos se faz cada vez mais necessário, pelo fato do crescimento da população mundial e extensão das áreas urbanas (MUNNS, 2005).

Por ser uma glicófita, a cana-de-açúcar apresenta sensibilidade a solos salinos em vários estádios de seu crescimento, com o seu rendimento reduzido para 50% ou menos do seu verdadeiro potencial. Além disso, a cana diminui seu rendimento de sacarose, através do efeito sobre a biomassa e qualidade do suco (SUPRASANNA et al., 2011). Como os métodos de melhoramento genético em cana-de-açúcar apresentam alguns problemas que vão desde a influência do ambiente, longo período de tempo para se conseguir os resultados e até o risco da mistura varietal, a micropropagação surge como forma de aperfeiçoar esses processos (ELDESSOKY et al., 2014).

A micropropagação é uma alternativa ao processo convencional de propagação vegetativa através de colmos, que pode proporcionar altas taxas de multiplicação de cana-de-açúcar com inúmeras vantagens em relação à multiplicação em campo (MALHOTRA, 1995). Sob condições controladas, essa técnica apresenta métodos eficientes que levam a uniformidade na produção, gerando mudas de qualidade fisiológica e de sanidade, além de produzir grande quantidade de mudas, em tempo e espaço reduzidos (GERALD, 2011).

Para sustentar a produção de cana-de-açúcar e melhorar sua produtividade, métodos convencionais e biotecnológicos precisam ser integrados para serem solucionadas algumas restrições como: tolerância a estresses bióticos e abióticos, gestão de nutriente, e melhora na recuperação de açúcar (SUPRASANNA et al., 2011). Certas moléculas, fatores ambientais, micro-organismos ou suas partes, podem pré-sensibilizar o metabolismo celular de plantas, de modo que após a exposição a esses fatores (*priming*) as plantas são capazes de responder mais rapidamente, e a um grau mais elevado do que as plantas que não foram expostas e, portanto, lidar melhor com as limitações (CONRATH, 2009).

A aplicação de métodos de pré-condicionamento (*priming*) é uma forma de proporcionar maior tolerância aos fatores de estresse abiótico, dentre eles o estresse salino, por promover um processo de rustificação das plantas. A utilização de *priming* com cloreto de sódio (NaCl) em rebolos de cana-de-açúcar diminui os efeitos inibitórios da salinidade na germinação e no crescimento das plântulas (PATADE et al., 2011). Além disso, a associação das técnicas de *priming* e de micropropagação também se mostrou eficiente, sendo uma prática simples e capaz de favorecer a resistência em plantas de cana-de-açúcar (MELO et al., 2014).

2. OBJETIVOS

- Utilizar a técnica de *priming in vitro* em plantas de cana-de-açúcar das variedades RB966928 e RB867515 micropropagadas em meio semissólido;
- Aplicar diferentes concentrações de *priming* com NaCl e KCl, separadamente;
- Cultivar as plantas sob estresse salino após a aclimatização para avaliar a resposta dos diferentes tratamentos de *priming*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma Magnoliophyta, da ordem Cyperales, família Poaceae, do gênero *Saccharum*, com algumas espécies conhecidas e, entre estas, diversas cultivares. A cultura é cultivada em diversos países, tendo o Brasil como o maior cenário produtivo, seguido por Índia, China e Tailândia (CONAB, 2016).

A produção de cana-de-açúcar, estimada para a safra 2016/17, é de 694,54 milhões de toneladas, com expectativa de crescimento de 4,4% em relação à safra anterior. Esta grande produção é decorrente das grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis à cultura, tornando o Brasil um país promissor para sua exportação (CONAB, 2016). A cana-de-açúcar é de grande importância para o agronegócio brasileiro, devido ao seu acúmulo de sacarose, que é um carboidrato largamente utilizado como matéria prima para a produção de produtos alimentícios e biocombustível, destacando-se o açúcar e o álcool (GUERZONI et al., 2014).

Atualmente, a agroindústria canavieira mostra-se muito favorável devido ao esgotamento das jazidas petrolíferas e ao elevado preço do petróleo. Além disso, há maior conscientização das pessoas em relação ao meio ambiente sobre os efeitos indesejáveis da utilização de combustíveis fósseis no balanço de carbono na atmosfera e aos efeitos desastrosos do aquecimento da superfície terrestre. Nesse contexto, a cana-de-açúcar é considerada uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis devido ao grande potencial na produção de etanol e aos respectivos subprodutos (CONAB, 2016).

Considerando o metabolismo C4 da cana-de-açúcar, o plantio em locais com condições de alta temperatura, radiação solar e com disponibilidade hídrica são favoráveis e proporcionam elevadas taxas de produtividade (SILVA et al., 2011; ANTUNES et al., 2016). Porém, regiões que possuem condições climáticas com valores elevados de temperatura do ar e de radiação solar, geralmente, sofrem com a escassez de água e solos salinos (GHAFOOR, 2004).

Devido ao aumento do cultivo de cana-de-açúcar ao longo dos anos, sua expansão se dá, muitas vezes, em condições que não são propícias ao seu cultivo, o que demanda o desenvolvimento de tecnologias e meios de se cultivar em diversos tipos de ambientes. Entre estes ambientes, salientam-se aqueles que causam estresses abióticos

nas plantas, como o estresse por temperatura, o estresse hídrico e o estresse salino (CHICONATO, 2016).

3.2 Estresse Salino

Estresse em plantas é o resultado de qualquer condição adversa que afete de maneira desfavorável o metabolismo, o crescimento e o desenvolvimento da planta (LICHTENTHALER, 2004). Essa condição pode ser desencadeada por fatores bióticos (resultantes da ação de micro-organismos) e abióticos (resultantes do excesso ou déficit de algum fator físico ou químico do meio ambiente), podendo ocorrer de forma isolada ou concomitantemente (TAIZ e ZEIGER, 2013).

O estresse salino ocorre devido à elevada concentração de sais na solução do solo ou qualquer outro ambiente de cultivo e é um dos maiores problemas abióticos que afetam negativamente a produção de culturas, se tornando uma questão importante na agricultura global. A maioria das espécies vegetais cultivadas são atingidas por altas concentrações de sais nos solos, prejudicando as plantas pelos desequilíbrios fisiológicos e podendo reduzir a produtividade das culturas em todos os estádios de desenvolvimento (MUNNS, 2002).

A salinidade causa um grande desequilíbrio nutricional nas plantas, decorrente principalmente da redução na absorção de nutrientes essenciais à planta. Isto ocorre, pois maior será a energia gasta para absorver e transportar elementos vitais, além de ocorrer alterações estruturais na membrana e inibição da atividade de várias enzimas do metabolismo (ARAGÃO et al., 2010).

A resposta das plantas à salinidade acontece em duas fases distintas. A primeira fase é chamada fase osmótica e começa imediatamente após o contato com a salinidade. Nesta fase, a absorção de água pela planta é comprometida devido a um desequilíbrio osmótico causado pelo excesso de sal nos solos. Dessa forma, a velocidade de crescimento das folhas e a formação de gemas e brotos laterais são reduzidas. A segunda fase, que ocorre lentamente, é a fase iônica, quando o sal atinge a parte aérea da planta em altas concentrações causando toxicidade e, neste caso, se a velocidade da toxicidade e morte foliar for maior que a produção de novas folhas a fotossíntese é prejudicada e, conseqüentemente, a produção de carboidratos, o que ocasionará a redução do crescimento e produtividade (MUNNS e TESTER, 2008).

O NaCl é considerado tóxico para a célula devido ao desequilíbrio iônico que ocorre pela desordenada entrada de Na^+ e Cl^- em detrimento de outros íons, além da toxidez por Na^+ que pode acarretar. O excesso desse sal também ocasiona deficiência de minerais e estresses osmótico e oxidativo (ZHU, 2002). A absorção desordenada de Na^+ e Cl^- dificulta a absorção de outros cátions como K^+ e Ca^{2+} causando desequilíbrio nutricional (WANG e HAN, 2007).

Em relação ao cloreto de potássio (KCl), os íons K^+ e Cl^- permeiam a membrana de forma independente, sendo o transporte de K^+ realizado através de canais específicos para este íon, gerando um potencial de membrana mais negativo. Caso haja uma troca excessiva destes íons através da membrana, é passível de ocorrer alteração no pH citossólico por conta deste processo, e dessa forma, afetar a respiração (TAIZ e ZEIGER, 2004).

A cana-de-açúcar está dentro do grupo de plantas denominadas glicófitas. Este grupo é sensível ou hipersensível à salinidade, ou está mais adaptado a ambientes não salinos. Altas concentrações de sal no solo afetam negativamente a germinação, crescimento, rendimento e bem como seu teor de sacarose (AKHTAR et al., 2003). Sengar et al. (2013) relataram perdas de até 40% na produtividade de cana-de-açúcar na Índia devido a salinidade de solos.

Estudos explicam que o estresse salino tem grande impacto na produção da cana-de-açúcar devido à redução da brotação, da matéria seca, tanto da parte aérea como das raízes, da área foliar, da evapotranspiração, além de outras alterações, como o teor de clorofila e de carotenóides (SANTANA et al., 2007; WILLADINO et al., 2011; PATADE et al., 2011; SIMÕES et al., 2016).

3.3 Solos salinos

Um solo é definido como salino quando a condutividade elétrica do extrato de saturação excede de 4 dSm^{-1} , equivalente a 40 mM de NaCl. Essa definição de salinidade deriva do valor de condutividade elétrica que reduz consideravelmente a produção da maioria das culturas (MUNNS e GILLIHAM, 2015). A formação de solos salinos resulta da acumulação de Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ nos horizontes do solo, ressaltando que os principais sais encontrados são: cloretos e sulfatos (RIBEIRO, 2010).

Solos naturalmente salinos são muito comuns em regiões áridas e semiáridas de regiões do México, Cuba, Peru, nordeste do Brasil e sudeste da Argentina (AQUASTAT, 1997). Mundialmente, estima-se que cerca de 1 bilhão de hectares de solo são atingidos pela salinidade. Esses problemas de salinidade são encontrados em todos os climas e são consequências de fatores naturais (primários) e de processos induzidos pelo homem (secundários) (FAO, 2015).

A maior parte dos solos salinos surgiu de causas naturais, devido ao acúmulo de sais durante longos períodos do tempo em zonas áridas e semiáridas. Esses solos naturalmente salinos ocorrem em locais onde a precipitação é insuficiente para lixiviar os sais e o excesso de íons de sódio para fora da rizosfera. (QUEIROZ et. al., 1997). Nenhuma prática agrícola ou de engenharia pode tratar essa forma de salinidade, e o melhoramento genético promove a única forma de aumentar a produtividade nessas áreas (SHABALA e MUNNS, 2012).

Além da salinidade natural, os sais também podem ser acumulados aos solos através de atividades humanas, ocorrendo devido à irrigação, desmatamento e resíduos industriais. A irrigação é uma ameaça induzida pelo homem, muito comum, onde a qualidade da água utilizada e a falta de drenagem induzem a salinização (FAO, 2015). A salinização induzida por irrigação é um importante processo de degradação que afeta o rendimento de culturas na região semiárida brasileira. Mundialmente, estima-se que os solos salinos afetam 20% de toda área irrigada (QADIR et al., 2014)

É muito improvável que a irrigação seja abandonada como uma prática insustentável no futuro próximo. Pelo contrário, a escassez de áreas agrícolas apropriadas e a necessidade de superar o desafio de alimentar 9 bilhões de pessoas em 2050 irá aumentar a proporção de áreas irrigadas. Assim, a salinidade continuará sendo uma das ameaças principais para a produção global de alimentos no século 21 (SHABALA e MUNNS, 2012).

3.4 Pré-condicionamento (*priming*)

Na natureza, as plantas constantemente se adaptam às mudanças nas condições ambientais. A taxa e o grau desta adaptação determinam a localização geográfica e o papel que uma determinada espécie vegetal desempenha em ecossistemas naturais ou manejados. Na produção de plantas comerciais, grandes esforços de melhoramento têm

sido feitos para desenvolver variedades capazes de lidar com o estresse relacionado ao clima, tipo de solo e pressão de pragas e doenças sob diferentes sistemas de cultivo (NOWAK eSHULAEV, 2003).

A utilização do método de pré-condicionamento (*priming*) se mostra promissor na obtenção de plantas com maior tolerância aos fatores de estresse biótico e abiótico. Esta técnica envolve uma exposição prévia a um fator de estresse, tornando a planta mais resistente quando submetida novamente ao agente estressor (PATADE et al., 2009).

A aplicação de *priming* é mais difundida em sementes, induzindo o metabolismo celular primário, gerando maior taxa de germinação de forma rápida uniforme e com maior vigor (ASHRAF e FOOLAD, 2005; ATREYA et al., 2009; BAKHT et al., 2011). Diferente do *priming* utilizado em sementes, que induz o metabolismo celular primário, o pré-condicionamento em cultura de tecidos se baseia em uma indução de adaptação nas plantas, determinado pela resposta do metabolismo secundário (CONRATH et al., 2002).

Em estudos com rebolo de cana-de-açúcar, a aplicação do *priming* reduziu os efeitos inibitórios da salinidade na germinação e no crescimento das plântulas, em termos de produção de matéria fresca e seca. Mostrando-se uma tecnologia simples, de baixo custo e fácil de usar, podendo ser eficaz para o cultivo econômico bem sucedido de cana-de-açúcar e outras culturas sensíveis ao estresse salino ou de seca (PATADE et al., 2009). A associação das técnicas de *priming* e de micropropagação também se mostrou capaz de favorecer a resistência de plantas cana-de-açúcar ao estresse salino, o método assegurou um bom perfilhamento das plantas e induziu o aumento do teor de clorofila (MELO et al., 2014).

A intensidade e duração do *priming* precisam ser cuidadosamente manipuladas, pois a condição de estresse deve ser suave e estimulante, ativando o metabolismo celular e incrementando a atividade fisiológica da planta. Deve ser um fator positivo que impulsiona o crescimento vegetal. Por outro lado, dependendo da intensidade ou duração, o estresse pode afetar negativamente o metabolismo, o crescimento e o desenvolvimento vegetal (LICHTENTHALER, 2004), e dessa forma comprometer a velocidade e a adequação do sistema de defesa (SANI et al., 2013).

3.5 Micropropagação

A micropropagação tem como objetivo gerar plantas idênticas à mãe (clones) a partir de uma única célula vegetal somática ou de um pequeno pedaço de tecido vegetal (explante). A técnica recebe nome de micropropagação devido ao tamanho dos explantes utilizados. Todo o processo é possível, pois os explantes são mantidos em meio de cultura sobre condições assépticas com controle de intensidade de fluxo de fótons, fotoperíodo, temperatura, dentre outros (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Existem várias metodologias de micropropagação, sendo que a técnica tradicional baseia-se no cultivo em pequenos frascos com número reduzido de plântulas por frasco e, na maior parte das vezes, faz o uso de meio nutritivo semissólido. Mesmo sendo um protocolo eficiente, novos sistemas de micropropagação já foram desenvolvidos para potencialização de benefícios, tornando a técnica mais simples e menos dispendiosa. Entre os sistemas surgidos, encontram-se os biorreatores, os quais aumentam significativamente as taxas de crescimento, multiplicação e melhoram a qualidade das plantas produzidas. Todos os sistemas apresentam suas vantagens e desvantagens, desse modo, cabe ao profissional escolher a melhor metodologia, levando-se em consideração a espécie a ser trabalhada e os recursos disponíveis (GERALD, 2011).

A técnica da micropropagação é eficiente para a propagação de mudas de cana-de-açúcar, uma vez que é possível produzir mudas de qualidade, em larga escala em tempo e espaço reduzido. À vista disso, o método se torna uma alternativa ao processo convencional de propagação vegetativa por meio de colmos (CIDADE et al., 2006).

Dentro do melhoramento genético em cana-de-açúcar, a micropropagação traz diversos benefícios devido à otimização dos processos. Os métodos convencionais apresentam diversas dificuldades como: influência do ambiente, que possui fatores incontroláveis; o longo período de tempo para se conseguir os resultados, podendo levar até 15 anos ou mais e o risco da mistura varietal, obtendo materiais desuniformes (ELDESSOKY et al., 2014).

Compostos são adicionados ao meio de cultura para interferir de alguma forma no crescimento e desenvolvimento vegetal. Atualmente, utiliza-se o cloreto de sódio (NaCl) para simular a salinização e assim tentar pré-selecionar genótipos de cana-de-açúcar *in vitro* que sejam tolerantes (MUNNS e TESTER, 2008; GANDONOU, 2011).

Os estudos sobre estresses abióticos em plantas realizados em condições *in vitro* oferecem muitas vantagens práticas em relação ao campo, como total controle do início e nível do estresse, baixa variabilidade e simplicidade do processo (LAWLOR, 2013). Diante de todas as vantagens da micropropagação, a utilização da técnica de *priming in vitro* pode ser aprimorada e gerar resultados satisfatórios (MELO et al., 2014).

4.MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no período de janeiro de 2016 a agosto de 2016 no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pertencente ao Centro de Biotecnologia e Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar do Mato Grosso do Sul, localizado na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

Para obtenção das plantas utilizadas no estresse *in vitro*, seguiu-se o protocolo de extração de meristema já estabelecido por Dutra et al. (2011). Plantas das variedades RB966928 e RB867515 propagadas vegetativamente em casa de vegetação, com um mês de idade, foram utilizadas para obtenção dos palmitos (folhas jovens). Os palmitos com aproximadamente 5 cm de comprimento foram submetidos à desinfestação com imersão em álcool 70% (v/v) por 2 minutos, em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 20 minutos e realizada tríplice lavagem (10 minutos cada) com água destilada autoclavada. Com o auxílio de microscópio estereoscópio, realizou-se a extração de meristemas em placas de Petri, contendo solução de ácido ascórbico (50 mg L^{-1}), para evitar-se a oxidação do material.

Os meristemas foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de cinetina (KIN). Os explantes foram mantidos no escuro por cinco dias e posteriormente sob $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas. Aos 15 dias, realizou-se uma troca de meio de cultivo de mesma formulação devido à oxidação fenólica, permanecendo por mais 15 dias até o desenvolvimento do explante.

Visando a multiplicação das plantas, duas repicagens foram realizadas, em média a cada 30 dias, utilizando-se a mesma formulação de meio. Após a fase de multiplicação, realizou-se o tratamento de pré-condicionamento (*priming*) por 24 horas. As plantas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS semissólido caracterizados pela adição separada de diferentes sais (NaCl e KCl) em diferentes concentrações (0,0; 12,5; 25,0 e 50,0 mM) (Figura 1).

Depois de passarem pelos tratamentos de estresse salino, as plantas foram submetidas ao processo de enraizamento, utilizando-se meio MS suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido indolbutírico (AIB).

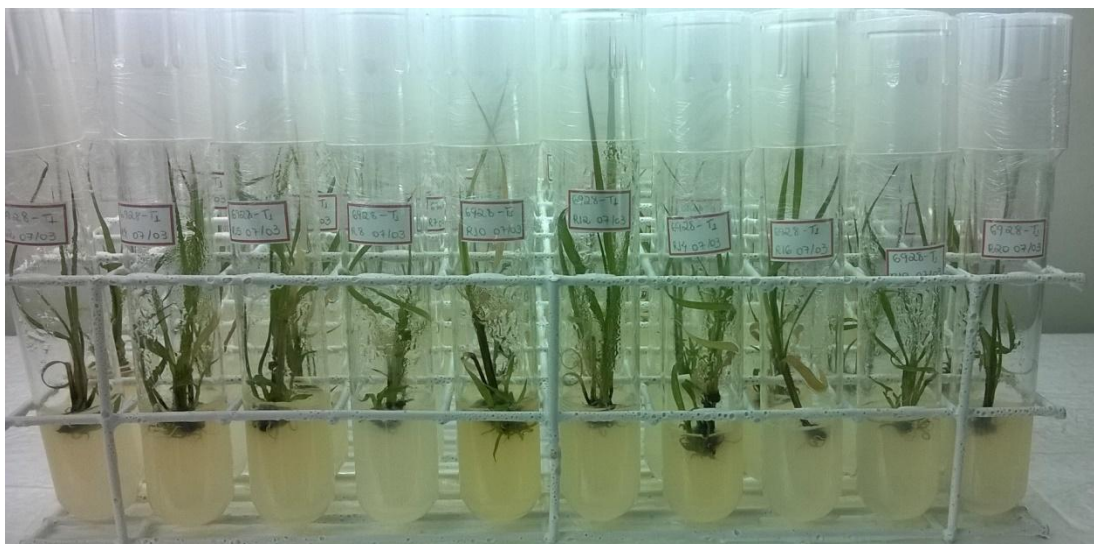


FIGURA 1. Plantas de cana-de-açúcar submetidas aos tratamentos de *priming in vitro*.

Para avaliação da resposta ao *priming in vitro*, as plantas foram levadas para casa de vegetação e aclimatizadas em sacos plásticos de 30 mL, contendo o substrato comercial Bioplant[®]. Após 30 dias, realizou-se o estresse *ex vitro* utilizando-se solução de rega acrescida de NaCl ou KCl. As plantas que receberam tratamento de *priming* com NaCl foram tratadas com solução de rega contendo NaCl e as plantas com tratamento de *priming* de KCl receberam solução de rega contendo KCl (Figura 2). A concentração salina nas soluções de rega foi iniciada com 20 mM de sal e a cada 10 dias ocorreu um incremento de 20 mM, de forma a criar um estresse salino gradativo até 60 mM, durante 30 dias.



FIGURA 2. Plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino *ex vitro*.

As variáveis analisadas foram: matéria seca da parte aérea e da raiz, número de perfilhos e estimativa do conteúdo de clorofila. A estimativa de clorofila foi obtida com clorofilômetro (SPAD-502 Plus, Konica Minolta), com leituras em três pontos da primeira folha totalmente expandida, evitando a nervura central. 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.

O experimento foi realizado em um arranjo fatorial 2 x 2 x 4, constituído de duas variedades (RB966928 e RB867515), dois sais (NaCl e KCl) e quatro concentrações de sais (0,0; 12,5; 25,0 e 50,0 mM), em delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram utilizados 20 repetições durante todo o experimento. Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância revelou uma interação tripla entre variedades, sais e concentrações de sais para a variável índice de clorofila SPAD (Tabela 1).

TABELA 1. Resumo da análise de variância do número de perfilhos (NP), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), e índice SPAD de plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino sob diferentes tipos e concentrações de sais.

Fonte de variação	GL	Quadrados Médios			
		NP	MSPA	MSR	Índice SPAD
Variedades	1	1	0,0724*	0,0631**	16,7077*
Sais	1	1	0,0034	0,0019	2,8477
Concentrações	3	2,02083	0,0182	0,0100	0,9505
Variedades*Sais	1	0,0625	0,0291	0,0019	0,9264
Variedades*Concentrações	3	0,54167	0,0167	0,0047	5,2477
Sais*Concentrações	3	1,04167	0,0024	0,0038	5,6780
Variedades*Sais*Concentrações	3	1,02083	0,0050	0,0015	38,9967**
Erro	48	3	0,0129	0,0057	137,7325
C.V. (%)		68,43	28,36	28,78	10,5
Média Geral		2,53125	0,4011	0,2612	16,1359

** significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F; * significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

Procedendo-se a decomposição da interação tripla, o desdobramento das concentrações de sais dentro de cada sal e variedade mostrou-se significativo. Para explicar a interação tripla o modelo quadrático de regressão foi o que melhor se ajustou aos dados (Figura 3). A interação demonstrou que o índice de clorofila SPAD foi afetado com a mudança nas concentrações de *dopriming* e que os dois sais (NaCl e KCl) e as duas variedades (RB966928 e RB867515) apresentaram respostas distintas.

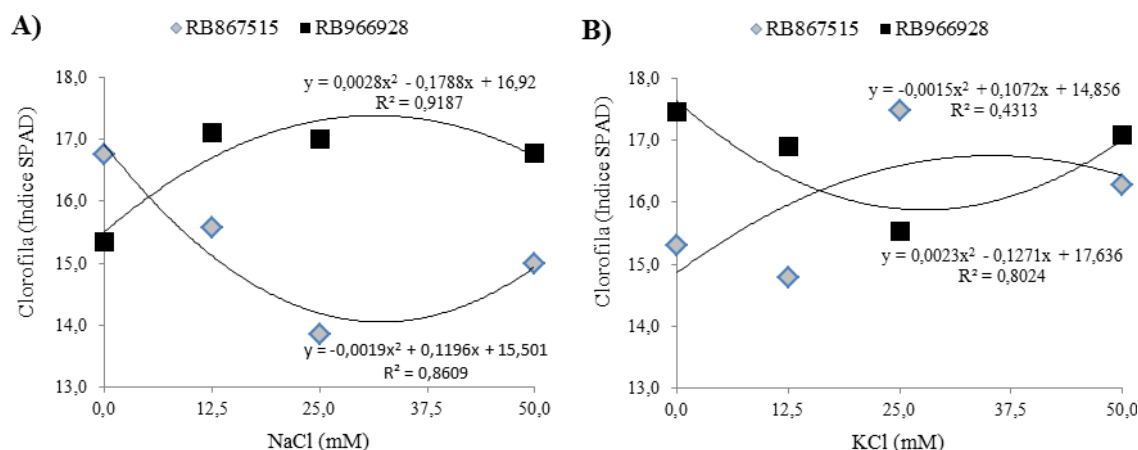


FIGURA 3. Estimativa de clorofila pelo índice SPAD de plantas de cana-de-açúcar RB966928 e RB867515, provenientes da aplicação de *priming* com 0,0; 12,5; 25,0 e 50,0mM de A) NaCl e B) KCl, submetidas a tratamento de estresse salino em casa de vegetação.

Em relação ao NaCl pode-se observar que cada variedade respondeu de forma diferente (Figura 3A). Sengar et al. (2013) já demonstraram que cada cultivar de cana-de-açúcar pode responder diferentemente ao estresse salino. Para a variedade RB966928 observa-se que o índice de clorofila aumentou com o incremento dos níveis de tratamento de *priming* até um limite ótimo de 31,47 mM, havendo redução a partir desse limite. Lichtenthaler (2004) explica que a intensidade do *priming* deve ser cuidadosamente manipulada, para que não ocorra resposta negativa no metabolismo, crescimento e desenvolvimento vegetal, e sim uma condição de estresse suave e estimulante.

Em relação à variedade RB867515 submetida ao tratamento de *priming* com NaCl, observa-se que a adição e o aumento da concentração de *priming* levaram a uma redução no índice de clorofila. Mesmo a concentração de 50,0mM induzindo um aumento deste nível e indicando uma adaptação da planta, o índice de clorofila ainda foi menor que o controle (Figura 3A). Willadino et al. (2011) também demonstraram que a variedade RB867515 apresenta maior redução no teor de clorofila e mesmo assim melhor adaptação às condições de salinidade quando comparada a outras variedades. Essa resposta é um mecanismo de defesa da planta para melhor adaptar-se ao estresse salino.

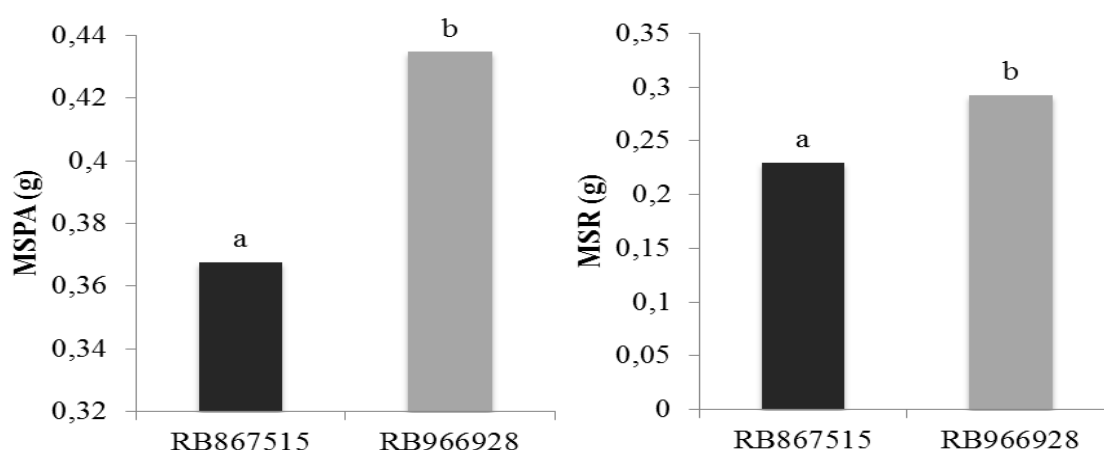
Para o estresse com KCl as duas variedades também responderam de forma distinta (Figura 3B). Com a adição e o aumento da concentração do *priming*, as plantas RB966928 apresentaram uma diminuição no índice de clorofila até a concentração de

25,0 mM, sendo que com a concentração de 50,0 mM a planta apresentou um aumento no índice de clorofila. Para as plantas RB867515, mesmo com o ajuste pouco satisfatório da linha de tendência, é possível observar que a concentração de 25,0 mM induziu um aumento no teor de clorofila.

Vários estudos já comprovaram que o teor de pigmentos fotossintéticos é afetado em plantas sensíveis a salinidade, sendo que o efeito sobre o teor da clorofila depende da concentração do agente estressor, bem como da espécie vegetal (JAMIL et al., 2007). Diante disso, o índice de clorofila SPAD se torna uma maneira simples de comparar a resposta de plantas à salinidade.

Estudos com outras espécies de plantas como: gergelim, ervilha e soja, mostram que a diminuição nos teores de clorofila em plantas sob estresse salino ocorre pelo aumento na degradação dessas pela clorofilase, pois a presença de sais em excesso estimula a atividade da clorofilase, que degrada moléculas de clorofila. Além disso, a planta em estresse salino apresenta diminuição da síntese desses pigmentos (RAO e RAO, 1981; MAJUMDAR et al., 1991).

Para as variáveis: matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca da raiz (MSR) houve diferença significativa apenas entre as variedades (Tabela 1). A variedade RB966928 apresentou maior MSPA e MSR em relação à variedade RB867515, não importando o tratamento utilizado (Figura 4). Estudos mostram que o baixo crescimento é uma característica adaptativa da planta que cresce em condições de estresse, pois possibilita alocar seus recursos de maneira a não prejudicar seu total desenvolvimento (ZHU, 2002).



*Médias seguidas de letras diferentes não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de probabilidade.

FIGURA 4. A) Matéria seca da parte aérea - MSPA; B) Matéria seca da raiz – MSR e C) índice SPAD de plantas de cana-de-açúcar (RB867515 e RB966928) provenientes da aplicação de *priming* e submetidas a estresse salino em casa de vegetação.

O estresse salino provoca o estresse oxidativo, o qual pode resultar em severos danos para os vegetais. O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na relação entre compostos antioxidantes e compostos pró-oxidantes. Dessa forma, a maioria dos estudos descreve que essa alteração pode ser avaliada baseando-se na dosagem da atividade de enzimas antioxidantes (MILLER et al., 2010). Sob esses parâmetros, Moraes (2013) demonstrou que a variedade RB867515 apresenta maior tolerância a diferentes tipos de estresse (salino, hídrico e por temperatura), isolados ou combinados, quando comparada a outras variedades testadas (RB966928, RB98710, RB 855453, RB99395e RB855156). Carvalho (2015) também chegou a resultados similares, demonstrando que a variedade RB867515 mostra-se mais tolerante à salinidade quando comparada as variedades RB962962 e RB92579.

Mesmo com a variação observada no índice de clorofila, os outros parâmetros (número de perfilhos, MSPA e MSR) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos de *priming* e também não foram significativos dentro das interações (Tabela 1). De acordo com Munns (2002), o sintoma da salinidade mais aparente é a redução no crescimento das plantas. Dessa forma, os tratamentos de *priming* tiveram efeito sobre a clorofila, mas este efeito não foi o suficiente para afetar a planta em seu desenvolvimento. Segundo Levitt (1980), as plantas precisam passar por condições estressantes para desenvolverem tolerância ao estresse. Rivas et al. (2013) complementam que para as plantas tolerarem um novo ciclo de estresse é necessário ocorrer um processo de rustificação.

Melo et al. (2014) obtiveram resultados contrastantes, onde *opriming invitro* caracterizado por 25,0 mM de NaCl durante 24 horas foi o suficiente para prevenir o efeito deletério do sal sobre o perfilhamento e a redução de biomassa de plantas de cana-de-açúcar submetidas ao estresse salino *ex vitro*. A diferença nos resultados podem ter ocorrido devido à utilização de metodologias e de variedades de cana-de-açúcar distintas, visto que Melo et al. (2014) utilizaram plantas da variedade RB98710 micropropagadas em biorreator de imersão temporária e o presente trabalho fez o uso de metodologia tradicional, baseada em meio de cultivo semissólido.

Os biorreatores de imersão temporária fazem uso de meio nutritivo líquido, permitindo a renovação do ar e nutrientes durante o cultivo, resultando, desta forma, em maior crescimento e multiplicação das plantas quando comparado com o cultivo em meio semissólido (RIBEIRO e BASTOS, 2008). Além disso, nos biorreatores a maior área de contato das plantas com o meio de cultura aumenta, consideravelmente, a sua

absorção, uma vez que os íons podem ser absorvidos pelas folhas, caules e raízes. Em tese, as plantas absorvem mais íons no sistema de imersão do que no tradicional (MURCH et al., 2004).

Para aumentar a eficiência do *priming* condições de micropropagação em meio semissólido deve-se realizar mais estudos em relação a intensidade e duração dos tratamentos. A exposição ao agente agressor em tempo maior que 24 horas pode ser mais efetivo na geração de um estresse capaz de ativar o metabolismo celular e incrementar a atividade fisiológica da planta.

Para *priming* também aplicado em cana-de-açúcar, mas em rebolos cultivados em casa-de-vegetação, a concentração e o tempo dos tratamentos com NaCl foram superiores aos utilizados em plantas micropropagadas em biorreator de imersão temporária. Patadeet al. (2009) utilizaram como tratamento 150 mM de NaCl durante 8 dias e obtiveram resultados satisfatórios, onde a aplicação do *priming* reduziu os efeitos inibitórios da salinidade na germinação e no crescimento das plântulas, em termos de produção de matéria fresca e seca.

Todas as avaliações do experimento foram realizadas apenas na fase inicial de crescimento vegetativo das plantas. Como a cana-de-açúcar é uma cultura de ciclo longo, recomenda-se um estudo mais detalhado da cultura ao longo do seu ciclo produtivo para melhor avaliação dos tratamentos de *priming* e do potencial genético de cada variedade de cana-de-açúcar.

6. CONCLUSÕES

As variedades RB966928 e RB867515 responderam de forma distinta aos tratamentos de *priming* com diferentes concentrações de NaCl e KCl.

As mudanças nas concentrações dos tratamentos de *priming* apresentaram efeito significativo sobre o índice de clorofila, sendo que os dois sais (NaCl e KCl) e as duas variedades (RB966928 e RB867515) geraram respostas distintas.

Recomenda-se estudos com o aumento da duração dos tratamentos de *priming* e estudo mais detalhado da cultura ao longo do seu ciclo produtivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, S.; WAHID, A.; RASUL, E. Emergence, growth and nutrient composition of sugarcane sprouts under NaCl salinity. **Biology of Plants**, v. 46, n. 1, p.113-116, 2003.
- ANTUNES, W.R.; SCHÖFFEL, E.R.; SILVA, S.D. dos A. e; EICHOLZ, E.; HÄRTER, A. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de clones de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.2, p.142-148, 2016.
- AQUASTAT. **Tablas resumen para America Latina y el Caribe**.FAO. 1997. Disponível em: <http://www.fao.org/GEO-2-199>. Acesso em: 15 jan. 2017.
- ARAGÃO, R. M.; SILVEIRA, J. A. G.; NASCIMENTO SILVA, E.; LOBO, A. K. M.; DUTRA, A. T. B. Absorção, fluxo no xilema e assimilação do nitrato em feijão-caupi submetido à salinidade. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, p. 100- 106, 2010.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, R. M. Pre-sowing seed treatment- a shotgun approach to improve germination, plant growth and crop yield under saline and non-saline conditions. **Advances in Agronomy**, v.88, p.223–271, 2005.
- 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.
- 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.
- CARVALHO, M. F. **Tolerância de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) ao estresse salino**. 57f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2015.
- CHICONATO, D. A. **Estresse salino em plantas jovens de cana-de-açúcar: respostas bioquímicas e fisiológicas**. 102 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2016.
- CIDADE, A. O.; GARCIA, R. O.; DUARTE, A. C.; MARTINS, G.; MANSUR, E. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.385-391, 2006.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2016/2017. Terceiro levantamento, Dezembro, 2016**. Brasília-DF, 2016.
- CONRATH, U.; PIETERSE, C. M. J.; MAUCH-MANI, B. *Priming* in plant–pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, v.7, p.210–216, 2002.
- CONRATH, U. *Priming* of induced plant defense responses. **Advances in botanical research**, v. 51, p. 361–395, 2009.

DUTRA, L. F.; DONINI, L. P.; SILVA, S. D. A.; SILVA, N. D. G.; THIEL, F.B.; VITÓRIA, J. M.; ZACARIAS, F. M. **Protocolo de Micropropagação de Cana-de-açúcar**. Circular Técnica, nº 128, ISSN 1516-8832, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2011.

ELDESSOKY, D. S.; ISMAIL, R. M.; HADI-ABDEL, A.; ABDALLAH N. Establishment of regeneration and transformation system of sugarcane cultivar GT54-9 (C9). **GM Crops**, London, v. 2, p. 126-134, 2014.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Status of the world's soil resources**. Rome, 2015.

FERREIRA, D. F. **SISVAR (Sistema para análise de variância)**. Lavras: Universidade Federal de Lavras (Departamento de Ciências Exatas DEX), 2000. (CD-ROM).

GANDONOU, C. B.; AHANHANZO, C.; AGBANGLA, C.; ERRABII, T.; IDAOMAR, M.; ABRINI, J.; SKALI, S. N. NaCleffecton in vitrosugarcane bud emergency. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p.539-544, 2011.

GERALD, L. T. S. **Biofábrica de plantas: Produção industrial de plantas in vitro**. São Paulo: Antiqua, p.14-31, 2011.

GHAFOOR, A.; QADIR, M.; MURTAZA, G. **Salt Affected Soils: Principle of Management**. Lahore, Pakistan: Allied Book Centre, 2004.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. **Micropropagação**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa- SPI/Embrapa-CNPq, 1998.

GUERZONI, J. T. S.; BELINTANI, N. G.; MOREIRA, R. M. P.; HOSHINO, A. A.; DOMINGUES, D. S.; BESPALHOK FILHO, J. C.; VIEIRA, L. G. E. Stress-induced D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene confer tolerance to salt stress in transgenic sugarcane. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, p.309-2319, 2014.

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 Agrícola**, v.64, p.111- 118, 2007.

LAWLOR, D. W. Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 83-108, 2013.

LEVITT, J. **Responses of plant to environmental stresses**. v.1 New York: Academic Press, 1980.

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, cap. 2, p. 59-111, 2004.

MAJUMDAR, S.; GHOSH, S.; GLICK, B. R.; DUMBROFF, E. B. Activities of chlorophyllase, phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose 1,5 biphosphate carboxylase in the primary leaves of soybean during senescence and drought. **Physiol Plant**, v.81, p. 473–480, 1991.

MALHOTRA, S. D. Biotechnology and sugarcane. **International Sugar Journal**, v.97, p.160-163, 1995.

MELO, G. M. de; BARBOSA, M. R.; DIAS, A. L. F.; WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Pré-condicionamento *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp .) para tolerância ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**.v.18, p.27–33, 2014.

MILLER, G.; SUZUKI, H.; CIFTCI-YILMAZ,; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, v.33, p.453-465, 2010.

MORAIS, M. B. **Ação combinada de fatores abióticos de estresse em variedades de cana-de-açúcar: variáveis fisiológicas e bioquímicas**. 77f. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2013.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell & Environment**, v.25, p. 239-250, 2002.

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

MUNNS, R.; GILLIHAM, M. Salinity tolerance of crops – what is the cost?. **New Phytologist**, v. 208, p. 668-673, 2015.

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

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MURCH, S. J.; LIU, C., ROMERO, R. M., SAXENA, P. K. *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.78, p.63-68, 2004.

NOWAK, J.; SHULAEV, V. *Priming* for transplant stress resistance *in vitro* propagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v 39, p 107-124, 2003.

PATADE, V. Y.; BHARGAVA, S.; SUPRASANNA, P. Salt and drought tolerance of 4 sugarcane under iso-osmotic salt and water stress: growth, osmolytes accumulation, 5 and antioxidant defense. **Journal of Plant Interactions**, Berlin, v. 6, p. 275-282, 2011.

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.

QADIR, M.; QUILLEROU, E.; NANGIA, V. Economics of salt-induced land degradation and restoration. **Natural Resources Forum**, v. 38, p.282–295, 2014.

QUEIROZ, J.E.; MEDEIROS, J.F. de. **Manejo e controle da salinidade na agricultura irrigada**. Campina Grande: UFPB, cap. 5, p.137-69, 1997.

RAO, G. G.; RAO, G. R. Pigment composition and chlorophyllase activity in pigeon pea (*Cajanus indicus* Spreng.) and Gingelly (*Sesamum indicum* L.) under salinity. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.19, p.768-770, 1981.

RIBEIRO, J. M.; BASTOS, D. C. **Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008.

RIBEIRO, M. R. Origem e Classificação dos Solos Afetados por Sais. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. (Eds.). **Manejo da Salinidade na Agricultura: Estudos Básicos e Aplicados**. Fortaleza, INCTSal. p.11-19, 2010.

RIBEIRO, M. R.; FREIRE, F. J.; MONTENEGRO, A. A. A. Solos halomórficos no Brasil: Ocorrência, gênese, classificação, uso e manejo sustentável. In: CURI, N.; MARQUES, J. J.; GUILHERME, L. R. G.; LIMA, J. M.; LOPES, A. S.; ALVAREZ, V. H. (eds.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.3, p.165-208, 2003.

RIVAS, R.; OLIVEIRA, M. T.; SANTOS, M. G. Three cycles of water deficit from seed to young plants of Moringa oleífera 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.

SANTANA, M.J. de, CARVALHO, J. de A., SOUZA, K.J. de, SOUSA, A.M.G. de, VASCONCELOS, C.L.; ANDRADE, L.A. de B. 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**, v.31, p.1470-1476, 2007.

SENGAR, K.; SENGAR, R.S.; SINGH, A. Biotechnological and genomic analysis for salinity tolerance in sugarcane. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research**, v. 4, p. 407-414, 2013.

SHABALA, S.; MUNNS, R. Salinity Stress: Physiological Constraints and Adaptive Mechanisms. In: SHABALA, S., **Plant Stress Physiology**. 1 ed, vol. 1. United Kingdom: CABI. p. 59-93, 2012.

SILVA, T. G. F.; MOURA, M. S. B.; ZOLNIER, S.; SOARES, J. M.; VIEIRA, V. J. de S.; GOMES JÚNIOR, W. F. Demanda hídrica e eficiência do uso de água da cana-de-açúcar irrigada no semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p. 1257-1265, 2011.

SIMÕES, W.L.; CALGARO, M.; COELHO, D.S.; SANTOS, D.B. dos; SOUZA, M.A. Growth of sugar cane varieties under salinity. **Revista Ceres**, v.63, p.265-271, 2016.

SUPRASANNA, P.; PATADE, V. Y.; DESAI, N. S.; DEVARUMATH, R. M.; KAWAR, P. G.; PAGARIYA, M. C.; GANAPATHI, A.; MANICKAVASAGAM, M.; BABU, K. H. Biotechnological developments in sugarcane improvement: an overview. **Sugar Tech**, v. 13, p. 322–335, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4^a ed. Artmed, Porto Alegre, 820p., 2004.

WANG, X. S.; HAN, J. G. Effects of NaCl and silicon on ion distribution in the roots, shoots and leaves of two alfalfa cultivars with different salt tolerance. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 53, p. 278-285, 2007.

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

ZHU, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 247-273, 2002.