



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

RAFAEL REBES ZILLIANI

**ANÁLISE FISIOLÓGICA DE VARIANTES SOMACLONAIAS E DA MEMÓRIA
TRANSGERACIONAL EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS À
DEFICIÊNCIA HÍDRICA**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

RAFAEL REBES ZILLIANI

**ANÁLISE FISIOLÓGICA DE VARIANTES SOMACLONAIAS E DA MEMÓRIA
TRANSGERACIONAL EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS À
DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

Tese de Doutorado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor - Área de Concentração: Produção Vegetal

Orientador: Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

633.61
Z69a

Zilliani, Rafael Rebes.

Análise fisiológica transgeracional de cana-de-açúcar sob deficiência hídrica / Rafael Rebes Zilliani – Presidente Prudente, 2019.

94f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientador: Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

1. Déficit Hídrico. 2. Plasticidade Fenotípica. 3. *Saccharum spp.*

Catálogo na fonte: Michele Mologni CRB8-6204

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ANÁLISE FISIOLÓGICA DE VARIANTES SOMACLONAIS E DA MEMÓRIA TRANSGERACIONAL EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA"

AUTOR(A): RAFAEL REBES ZILLIANI

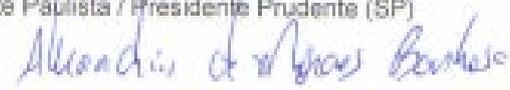
ORIENTADOR(A): LUIZ GONZAGA ESTEVES VIEIRA

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Alessandra Ferreira Ribas 

UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Alexandrius de Moraes Barbosa 

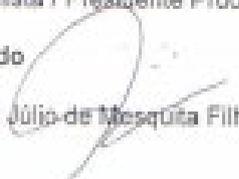
UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Danilo da Cruz Centeno 

Universidade Federal do ABC / São Bernardo dos Campos (SP)

Luiz Gonzaga Esteves Vieira 

UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

Paulo Alexandre Monteiro de Figueiredo 

UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / Dracena (SP)

Data da realização: 20 de maio de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu bom Deus e as pessoas que estão sempre ao meu lado, transmitindo os melhores sentimentos de fé, amor, alegria, determinação, paciência e coragem, tornando os meus dias mais felizes e jamais deixando desistir dos meus sonhos.

Aos meus estimados pais, Sergio e Roseli, a minha amada esposa, Isamara e ao meu querido irmão, Victor. Sem a presença, confiança e incentivo de vocês eu não chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS

O Agradecimento inicial sempre será a Deus, pois sem suas infinitas bençãos, nada seria possível.

Aos meus pais, Sergio e Roseli, que são formadores do meu caráter e valores, obrigado por estarem sempre presentes na minha vida de forma indispensável.

Agradeço a minha esposa de forma especial por estar ao meu lado todos esses anos, com incondicional amor, cumplicidade e incentivo. Obrigado por ser minha referência de alegria, honestidade e determinação.

Ao professor e orientador, Prof. Luiz Gonzaga E. Vieira (Santista), pelo imenso suporte e colaboração, com atenção especial ao meu intercâmbio te agradeço pelo considerável apoio nesta experiência incrível.

Ao meu professor e co-orientador, Prof. Gustavo Maia Souza, pelo estímulo e inspiração nos momentos difíceis desta etapa.

Ao professor Danilo Centeno, pela oportunidade de adentrar a novos caminhos do conhecimento na realização deste estudo.

A professora Adriana Moro, pela confiança ao me acolher como membro de seu grupo de pesquisa.

Agradeço aos amigos Alexandrius, Kézia, Viviane, Gustavo e Bruna, pelo companheirismo e motivação diante das dificuldades enfrentadas e pelo auxílio na pesquisa desenvolvida.

Agradeço aos meus amigos de pesquisa do CEVOP, sempre dispostos a contribuir.

A profa. Sandy Sniman, por aceitar me receber como membro de seu time no South African Sugarcane Research Institute, sempre me tratando com muito carinho e zelo.

A CAPES pelo apoio financeiro ao conceder a Bolsa de estudos do Doutorado e Doutorado sanduiche permitindo a vivencia de uma experiência profissional ímpar.

A Unoeste pelo fornecimento de toda infraestrutura.

E finalmente, um agradecimento a todos que auxiliaram no desenvolvimento deste projeto.

MUITO OBRIGADO a todos!

"UBUNTU: sou o que sou pelo que nós somos, o meu progresso pessoal está ao serviço do progresso da minha comunidade e isso é o mais importante na vida. Se uma pessoa conseguir viver assim, terá atingido algo muito importante e admirável."

(Nelson Mandela)

RESUMO

Análise fisiológica de variantes somaclonais e da memória transgeracional em plantas de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica

O interesse global em fontes energéticas renováveis vem crescendo constantemente e com isso há o surgimento da busca por alternativas nas mais diversas áreas do conhecimento. A cana-de-açúcar destaca-se no cenário do agronegócio brasileiro e mundial pelo elevado potencial econômico de seus produtos. Entretanto, diversos fatores podem afetar sua produtividade e a busca pelo desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo se faz necessário. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho fisiológico de plantas clonais de cana-de-açúcar da variedade SP80-3280 submetidas à deficiência hídrica e como esse estresse pode influenciar as respostas fisiológicas de duas gerações clonais. Foram utilizadas plantas obtidas através do procedimento de cultura de tecidos *in vitro*, denominadas somaclones SP05, SP06, SP09 e SP10, e plantas obtidas por propagação vegetativa de toletes contendo uma única gema (Controle). O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação e dividido em duas etapas, na primeira foi utilizado delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x5, sendo dois regimes hídricos, 100% e 30% da reposição diária de água em relação à capacidade de campo e cinco plantas clonais distintas. Na segunda etapa utilizou-se o mesmo delineamento experimental, com as plantas provenientes de gemas dos colmos de plantas usadas no primeiro experimento. A parcela experimental foi constituída de vasos plásticos contendo 14,0 kg de solo com uma planta por vaso e para cada tratamento utilizou-se dez repetições. O déficit hídrico foi iniciado aos 120 dias após plantio e durante este período foram realizadas avaliações biométricas e fisiológicas nas plantas. Após 30 dias sob deficiência hídrica as plantas foram reidratadas e as avaliações realizadas novamente. Neste experimento, adotou-se o mesmo procedimento analítico e estatístico utilizado na primeira etapa experimental. No primeiro experimento, dos somaclones analisados, SP06, SP09 e SP10, apresentaram as melhores respostas fisiológicas, biométricas e maior acúmulo de biomassa quando comparadas às plantas controle não regeneradas *in vitro*, evidenciando o efeito de variação somaclonal. No segundo experimento, os genótipos que vivenciaram a situação de estresse hídrico na geração anterior apresentaram maior tolerância à deficiência hídrica quando expostas novamente a esse estresse, indicando a indução de mudanças fenotípicas adaptativas ("*stress memory*"), provavelmente através de mecanismos epigenéticos. A variação somaclonal mostrou-se uma boa ferramenta na obtenção de plantas mais tolerantes ao déficit hídrico. Assim, foi possível concluir que o déficit hídrico aplicado na primeira geração clonal de plantas de cana-de-açúcar atuou como um processo de preparo prévio ("*plant priming*"), aumentando o potencial adaptativo das plantas da geração subsequente.

Palavras-chave: Déficit Hídrico, Somaclones, *Plant Priming*, *Stress Memory*.

ABSTRACT

Physiological analysis of somaclonal variants and transgenerational memory in sugarcane under water déficit

The global interest in renewable energy sources is growing constantly and, consequently, the search for alternatives in the most diverse areas of knowledge. Sugarcane stands out in the Brazilian and global agribusiness scenario due to the high economic potential of its by-products. However, several factors can affect its productivity and the search for the development of new cultivation technologies is necessary. In this context, the objective of this study was to evaluate the physiological performance of clonal sugarcane plants subjected to water deficiency and how this stress can influence the physiological responses of two clonal generations. Spontaneous plants were used by *in vitro* tissue culture processing, named SP05, SP06, SP09 and SP10, and plants intercrossed by vegetative propagation of toletes containing a single bud (Control). The experiment was conducted in a greenhouse and divided into two stages. In the first, a completely randomized design was used in the 2x5 factorial design, represented by two water regimes of 100% and 30% of daily water replenishment in relation to the field capacity and five different plants. In the second stage, the same experimental design was used with the plants originated from stalks of plants used in the first experiment. The experimental plot consisted of plastic pots containing 14.0 kg of soil with one plant per pot of the cultivar SP803280, with ten replications per treatment. The water deficit started at 120 days after planting (DAP) and during this period biometric and physiological evaluations were performed in the plants. After 30 days under water deficiency the plants were rehydrated and the evaluations performed again. At 200 DAP the biomass evaluation was carried out. In this experiment, the same analytical procedures used in the first experimental stage were adopted. In the first test, SP06, SP09 and SP10 showed the best physiological, biometric and biomass accumulation responses when compared to non - regenerated plants *in vitro*. In the second test, the genotypes of the cultivar SP803280 that experienced the water stress situation in the previous generation showed a greater tolerance to water deficit when exposed to this second stress, indicating induction of phenotypic changes, probably through mechanisms epigenetics. The somaclonal variation proved to be a good tool in obtaining plants that are more tolerant to water deficit. Thus, it is possible to conclude that the water deficit applied in the first clonal generation of sugarcane plants acted as a plant priming process, increasing the adaptive potential of the plants in the subsequent generation.

Keywords: Drought stress, Photosynthesis, Phenotypic plasticity, *Saccharum* spp

LISTA DE SIGLAS

Amax	Assimilação máxima de CO ₂ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
Ci	Concentração intercelular de CO ₂ (ppm),
Gs	Condutância estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E	Transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
$-\Psi_{\text{PD}}$	Potencial de água foliar antes do amanhecer (MPa)
$-\Psi_{\text{MD}}$	Potencial de água foliar ao meio dia (MPa)
EEC	Extravasamento de membrana (%)
EUA	Eficiência do uso da água ($\mu\text{mol CO}_2 \mu\text{mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$)
$\Delta F/F_m'$	Eficiência efetiva do FSII
EIC	Eficiência intrínseca de carboxilação ($\mu\text{mol CO}_2 \text{L}^{-1}$)
EIUA	Eficiência intrínseca do uso da água A/g_s (mmol mol^{-1})
Fv/Fm	Eficiência máxima do FSII antes do amanhecer
Fv/Fm ₁₂	Eficiência máxima do FSII ao meio dia
ETR	Taxa de transporte de elétrons
AFT	Área foliar total por planta (cm^2)
MSF	Massa seca da folha (g)
MSR	Massa seca da raiz (g)
MSC	Massa seca do colmo (g)
MST	Massa seca total (g)
R/PA	Relação raiz parte aérea (g).
IPF	Índice de plasticidade fenotípica

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Cana-de-açúcar cv. SP80-3280.....	22
FIGURA 2 -	Somaclones da variedade SP80-3280 após propagação vegetativa por 60 dias em condições de casa-de-vegetação no IAPAR.....	33
FIGURA 3 -	Plantas dos somaclones SP05, SP06, SP09 e SP10 da variedade SP80-3280 com 70 dias após plantio mantidas em câmara de crescimento com ambiente controlado para uniformizar o desenvolvimento.....	34
FIGURA 4 -	Croqui experimental - Fluxograma explicativo da segunda etapa do experimento.....	57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Valores médios do potencial de água foliar às 05:00 h ($-\Psi_{PD}$) e às 12:00 h ($-\Psi_{MD}$) e extravasamento de eletrólitos celulares (EEC) para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores observados 8 e 30 dias após o início do déficit hídrico e 2 dias após reidratação das plantas.....	40
TABELA 2 -	Valores médios da eficiência quântica potencial antemanhã/meio dia e eficiência quântica efetiva do FSII (F_v/F_m , F_v/F_{m12} , $\Delta F/F_m'$ respectivamente), taxa de transporte de elétrons (ETR) para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores apresentados 8 dias após o início do déficit hídrico.....	41
TABELA 3 -	Valores médios de assimilação líquida de CO ₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO ₂ (Ci), para plantas submetida a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores apresentados 8 dias após o início do déficit hídrico.....	42
TABELA 4 -	Valores médios de assimilação líquida de CO ₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO ₂ (Ci) e potencial de água foliar às 12:00 h ($-\Psi_{MD}$) para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores apresentados 4 dias após a reidratação das plantas.....	43
TABELA 5 -	Valores médios dos parâmetros biométricos altura, diâmetro do colmo, número de folhas verdes e número de entrenós para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores observados 10, 20 e 30 dias após o início do déficit hídrico.....	45
TABELA 6 -	Valores médios dos parâmetros biométricos altura, diâmetro do colmo, número de folhas verdes e número de entrenós para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores observados 10, 20 e 30 dias após início do déficit hídrico.....	46
TABELA 7 -	Valores médios de massa seca foliar (MsF), massa seca da bainha (MsB), massa seca de raiz (MsR), e área foliar total (AFT) para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores observados 10, 20 e 30 dias após a reidratação das plantas.....	47

TABELA 8 -	Valores médios de assimilação líquida de CO ₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO ₂ (Ci), e potencial de água foliar às 12:00 h (-Ψ _{MD}) 3 dias após início do déficit hídrico em plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.....	62
TABELA 9 -	Valores médios de assimilação líquida de CO ₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO ₂ (Ci) 5 dias após início do déficit hídrico em plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.....	63
TABELA 10 -	Valores médios de assimilação líquida de CO ₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO ₂ (Ci), potencial de água foliar às 12:00 h (-Ψ _{MD}), eficiência quântica potencial meio dia, eficiência quântica efetiva do FSII (Fv/Fm ₁₂ , ΔF/Fm') e a taxa de transporte de elétrons (ETR), 7 dias após início do déficit hídrico em plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.....	64
TABELA 11 -	Valores médios de assimilação líquida de CO ₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO ₂ (Ci) e potencial de água foliar às 12:00 h (-Ψ _{MD}), 3 dias após reidratação das plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.....	66
TABELA 12 -	Valores médios de assimilação líquida de CO ₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO ₂ (Ci), 5 dias após reidratação das plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.....	67
TABELA 13 -	Valores médios de assimilação líquida de CO ₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO ₂ (Ci), e potencial de água foliar às 12:00 h (-Ψ _{MD}) 7 dias após reidratação das plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.....	68
TABELA 14 -	Valores médios de massa seca foliar (MS _F), massa seca do colmo (MS _C), massa seca de raiz (MS _R), massa seca total (MS _T), a razão entre raiz e parte aérea (R/PA) e área foliar total (AFT) das plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.....	70

TABELA 15 -	Índice de plasticidade fenotípica referente a assimilação líquida de CO ₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO ₂ (Ci), e potencial de água foliar às 12:00 h ($-\Psi_{MD}$), para a variedade SP80-3280 submetida a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. 3, 5, 7 dias após início do déficit hídrico e 1, 3, 5 dias após reidratação das plantas.....	72
TABELA 16 -	Índice de plasticidade fenotípica referente a massa seca foliar (MsF), massa seca do colmo (MsC), massa seca de raiz (MsR), massa seca total (MsT), a razão entre raiz e parte aérea (R/PA) e área foliar total (AFT) para a variedade SP80-3280 submetida a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Cana-de-açúcar	20
2.1.1	Cana-de-açúcar – Cultivar SP803280.....	22
2.2	Estresses Abióticos e Deficiência Hídrica	23
2.3	Variação somaclonal em Cana-de-açúcar	25
3	CAPÍTULO 1: Avaliação de variantes somaclonais de cana-de-açúcar para tolerância ao déficit hídrico	27
3.1	Introdução	29
3.2	Material e Métodos	31
3.2.1	Descrição do modelo experimental	34
3.2.2	Parâmetros avaliados.....	35
3.2.2.1	Estado hídrico das plantas	35
3.2.2.2	Extravasamento de membrana (EM).....	36
3.2.2.3	Medidas das variáveis fotossintéticas	36
3.2.2.4	Fluorescência da clorofila a	36
3.2.2.5	Medidas pontuais de recuperação	37
3.2.2.6	Avaliação biométrica e produção da biomassa total	37
3.2.3	Análise Estatística	38
3.3	Resultados	38
3.3.1	Parâmetros fisiológicos	38
3.3.2	Avaliações biométricas e biomassa.....	43
3.4	Discussão	47
3.5	Conclusão	51
4	CAPÍTULO 2: Resposta transgeracional ao déficit hídrico em cana-de-açúcar	52
4.1	Introdução	54
4.2	Material e Métodos	55
4.2.1	Descrição do modelo experimental	56
4.2.2	Parâmetros avaliados.....	57
4.2.2.1	Estado hídrico das plantas	57
4.2.2.2	Extravasamento de membrana (EM).....	58
4.2.2.3	Medidas das variáveis fotossintéticas	59
4.2.2.4	Fluorescência da clorofila a	59
4.2.2.5	Medidas pontuais de recuperação	59
4.2.2.6	Avaliação biométrica e produção da biomassa total	60
4.2.2.7	Índice de plasticidade fenotípica	60

4.2.3	Análise Estatística	61
4.3	Resultados	61
4.3.1	Parâmetros fisiológicos	61
4.3.2	Avaliações biométricas e biomassa.....	68
4.3.3	Índice de plasticidade fenotípica	70
4.4	Discussão	73
4.5	Conclusão	78
	REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

O enorme interesse global em fontes energéticas renováveis e a preocupação em relação à substituição de combustíveis fósseis vêm crescendo anualmente e com ela há o surgimento da busca por alternativas. Para tanto, dadas às condições edafoclimáticas favoráveis no Brasil, o país tem se destacado nas últimas décadas na questão de produção vegetal, crescendo assim o interesse de pesquisas em fontes renováveis a partir de matrizes vegetais. Neste contexto, destacam-se, entre outras, as gramíneas, com especial atenção à cana-de-açúcar.

Por se tratar de uma cultura semi-perene, a cana-de-açúcar está sujeita a exposições frequentes de variações ambientais que podem afetar diretamente seu desenvolvimento e produtividade (MARCHIORI *et al.*, 2017). Aplicações biotecnológicas têm sido utilizadas para contornar alguns desses desafios agrícolas, tais como as ferramentas de cultura *in vitro* e a embriogênese somática, que possui um papel chave nas estratégias de melhoramento genético de cana-de-açúcar (SNYMAN, 2004; KRISHNAN; MOHAN, 2017). Neste sentido, métodos de seleção *in vitro* para aumentar a chance de obter maior variação somaclonal têm sido utilizados para obter plantas melhoradas em diversas características produtivas, incluindo estresses ambientais (JAIN, 2005; SUPRASANNA; BAPAT 2006; SUPRASANNA *et al.*, 2007a; PATADE; SUPRASANNA, 2008; SUPRASANNA, 2011; SOBHAKUMARI, 2012).

As variações e perturbações ambientais ocorrem comumente em sistemas agrícolas, produzindo situações de estresse que reduzirão o desempenho das plantas (GENG, 2013). Portanto, em busca do alcance de altos potenciais produtivos em plantas cultivadas é importante considerar as condições climáticas do ambiente, pois as mesmas impactam diretamente no crescimento e desenvolvimento, ocasionando limitação do potencial genético das culturas. As plantas possuem um metabolismo extraordinariamente complexo e a compreensão do seu funcionamento representa um desafio devido à interação entre vários processos bioquímicos e a necessidade constante de se ajustar às mudanças no ambiente (LUNN, 2007; SWEETLOVE; FERNIE, 2013). Ao longo do tempo as plantas desenvolveram diversas respostas de aclimação a níveis molecular, bioquímico e fisiológico, visando enfrentar o estresse hídrico. Alguns estudos que comparam indivíduos submetidos a diferentes ambientes mostram que a maior parte das respostas

fenotípicas são mediadas através de modificações e interações genotípicas (SCHLICHTING; SMITH, 2002; JAENISCH; BIRD 2003), tais como alterações nos níveis de expressão de alguns genes através de modificações epigenéticas sensíveis a sinais ambientais (RICO *et al.*, 2014).

Situações estressantes promovidas por fatores abióticos e bióticos geram efeitos negativos em processos fisiológicos e bioquímicos que estão diretamente ligados ao crescimento e desenvolvimento das plantas. No entanto, estes processos, resultantes de condições estressantes, podem ser utilizados a favor da planta visando o aumento de tolerância e conseqüentemente melhores respostas minimizando os efeitos de sua exposição a condições ambientais não favoráveis (GENG; GAO; YANG, 2013). Possíveis respostas positivas de plantas a uma eventual exposição futura ao estresse também podem ser esperadas, considerando que estas podem se tornar mais resistente em função de uma aquisição de “memória”, resposta que reporta à aclimatação, denominada “priming” ou “hardening” (CRISP *et al.*, 2016).

A plasticidade fenotípica pode ser definida como uma habilidade individual de um organismo em gerar respostas frente a variações ambientais, ocasionando alterações de características buscando a aclimatação ou compensação das condições adversas e possui relação com variações na expressão de genes (VALLADARES *et al.*, 2006). Atualmente a plasticidade fenotípica atrai grande atenção em diferentes áreas de estudo, que demonstraram a importância dessa característica que não pertence somente a indivíduos que se adaptaram bem às novas condições a eles impostas, mas também podendo afetar o desempenho, sucesso reprodutivo e mecanismos de ação das próximas gerações (GENG; GAO; YANG, 2013). Portanto, o conhecimento adequado em relação aos mecanismos que estão envolvidos na tolerância a seca em plantas é de grande relevância na busca por cultivares que tenham melhor desempenho produtivo em condições de deficiência hídrica. (PASSIOURA, 1997; JAILLAIS; CHORY, 2010; KOOKE; KEURENTJES, 2012).

Nesse sentido faz necessário a busca pelo entendimento dos possíveis mecanismos envolvidos nesse processo de “aprendizagem” por parte das plantas e se essas informações armazenadas são transferidas para as gerações seguintes como forma de memória transgeracional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea tropical, monocotiledônea, perene e alógama que tem provável origem na Nova Guiné e foi introduzida no Brasil no início do século XVI (BARBOSA *et al.*, 2005; CAIEIRO *et al.*, 2010). As plantas de cana-de-açúcar pertencem à família *Poaceae* e ao gênero *Saccharum*. Seus cultivares são resultado de hibridações interespecíficas realizadas ao longo do tempo, sendo que nas constituições genéticas participam as espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule* (MATSUOKA *et al.*, 2005). As plantas da espécie *Saccharum officinarum* possuem grande importância no que diz respeito à contribuição genética presente nas atuais cultivares, mas existem outras espécies que devem ser citadas como contribuintes, principalmente *S. spontaneum*, *S. barberi* e *S. robustum*. Todas possuem características específicas e foram utilizadas em cruzamentos que resultaram em cultivares híbridos (MARTIN, 1991; MATSUOKA, 1999; BEAUCLAIR, 2008; CHANDEL *et al.*, 2009; CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011; RICAUD, 2012; SCARPARI; RICAUD, 2012). É uma cultura multiplicada através de propagação vegetativa a partir de toletes (colmos) ou mudas pré-brotadas (HITCHCOCK, 1923; DANIELS; ROACH, 1987; SETTA *et al.*, 2012).

A produção de cana-de-açúcar no Brasil tem aumentado gradualmente, devido aos incentivos à produção de combustíveis alternativos e novas fontes energéticas, tendo sua produção duplicada nos últimos 10 anos. As variedades modernas cultivadas de cana-de-açúcar se destacam pelo alto conteúdo de sacarose acumulado nos colmos. O carbono fixado nestas plantas é transportado na forma de sacarose das folhas para o colmo e armazenado em vacúolos das células do parênquima (UYS *et al.*, 2007). Assim, a cultura da cana-de-açúcar é uma fonte de recurso renovável e com alto potencial comercial de biomassa para bioeletricidade e etanol de segunda geração (KHATIWADA *et al.*, 2016; LISBOA *et al.*, 2017; MENANDRO *et al.*, 2017), além de possuir uma capacidade única de acumular altos níveis de açúcar no colmo, se tornando ótima matéria prima para produção de açúcar e etanol (FERREIRA *et al.*, 2017).

Desta forma, a cana-de-açúcar é uma cultura agrícola de grande relevância no cenário agroindustrial do Brasil, colocando o País como o principal produtor da cultura, pois desempenha papel de destaque quando se trata da produção de açúcar e álcool (ARRUDA, 2011). Ao comparar área plantada de cana-de-açúcar em todo o Brasil, que é aproximadamente 9 milhões de hectares, a cultura é menor apenas do que culturas da soja e milho. A cultura da cana-de-açúcar está presente nas regiões Sudeste, Nordeste, Centro-Oeste e em algumas áreas do Sul brasileiro, mas sua produção em termos econômicos se concentra no Centro-Sul (CONAB, 2018). O motivo do Brasil ser um dos principais produtores de cana-de-açúcar está atrelado à aptidão climática para seu cultivo, em especial na região sudeste, por possuir o verão quente e chuvoso, que promove ótimo desenvolvimento vegetativo e inverno frio e seco contribuindo para acúmulo de açúcares no colmo (JADOSKI *et al.*, 2010; TOPPA *et al.*, 2010; BONNETT, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015).

Também, a cana-de-açúcar se destaca atualmente como cultura de grande importância no mercado internacional pela atenção dada a um de seus produtos, o etanol, visto como uma alternativa viável à substituição dos combustíveis fósseis. Entretanto, a expansão de novas áreas agriculturáveis para o incremento da produção esbarra em questões ambientais, como desmatamento e diminuição da biodiversidade dos diferentes biomas brasileiros. Assim, o desenvolvimento de novas tecnologias voltadas para o aumento da produtividade, que não necessitem do aumento de área plantada, ou visem a redução de prejuízos em situações ambientais adversas torna-se imprescindível (ARRUDA, 2011; CONAB, 2018).

A cana pode ser considerada uma planta semi-perene, pois o desenvolvimento agrícola da cultura da cana é compreendido por ciclos, conhecidos por cana planta (primeira colheita após plantio) e cana soca (colheitas seguintes após rebrota do primeiro corte). Os ciclos de corte podem se estender de 5 a 7 anos com produtividades viáveis (CONAB, 2018; SOCICANA, 2015). Como possui metabolismo fotossintético do tipo C4, apresentando alta taxa fotossintética, mínimas taxas de fotorrespiração e elevada capacidade de fixação de CO₂, a cana-de-açúcar possui razoável eficiência no uso da água e adaptação em ambientes com condições adversas (CHEAVENGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011; CASAGRANDE; VASCONCELOS, 2008; MANHÃES *et al.*, 2015).

2.1.1 Cana-de-Açúcar – Cultivar SP80-3280

A cultivar denominada SP80-3280 (Figura 1) é uma das 15 variedades mais cultivadas em toda área plantada de cana do Brasil (RIDESA, 2012; CANAVIEIROS, 2018). Seu cultivo se dá com maior intensidade na região Centro-Sul do país. O seu ciclo de colheita é considerado médio/tardio e ocorre por volta de agosto a outubro; ademais, plantas dessa variedade demonstram resistência a vários tipos de doenças, mas apresentam susceptibilidade à broca. A cultivar SP80-3280 é considerada sensível ao déficit hídrico, apesar de suportar situações de menor precipitação, e apresenta também elevada exigência nutricional (IDEA, 2004; AGEITEC, 2005; RIDESA, 2012; STAB, 2012; SOCICANA, 2015).

Esta cultivar tornou-se uma das referências no Brasil no que diz respeito a estudos em biotecnologia, como modelo para a criação de cultivares transgênicos (CTNBio, 2018). Também foi o genótipo utilizado no SUCEST, o primeiro projeto brasileiro de sequenciamento (ESTs - expressed sequence tags) de cana-de-açúcar (VETTORE *et al.*, 2003; NCBI, 2018).

Figura 1- Cana-de-açúcar cv. SP80-3280



Fonte: STAB (2012).

2.2 Estresses Abióticos e Deficiência Hídrica

Os estresses para as plantas podem ser definidos como fatores/condições externos que perpetram interferências negativas ao metabolismo e desenvolvimento vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2017). O estresse denominado abiótico é proveniente de mudanças no ambiente, como disponibilidade hídrica, alterações no solo, luminosidade e de temperatura, entre outras. Os estresses abióticos afetam significativamente as culturas agrícolas, atingindo diretamente o metabolismo vegetal, através da influência em processos fisiológicos, bioquímicos, moleculares que resultaram em alterações de crescimento e menor acúmulo de biomassa (WANG *et al.*, 2003; BAILEY-SERRES *et al.*, 2012; AHUJA *et al.*, 2010).

O déficit hídrico pode ser considerado o fator ambiental mais estressante que afeta o crescimento e a produtividade das plantas cultivadas, incluindo a cana-de-açúcar (BRAY *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2003; INMAN-BAMBER; SMITH 2005; CIAIS *et al.*, 2005; RAMPINO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2008; JANGPROMMA *et al.*, 2010; BASNAYAKE *et al.*, 2012), sendo que o desenvolvimento de cultivares com maior eficiência do uso da água e com maior potencial de tolerância à seca é uma importante demanda dos principais países produtores de cana-de-açúcar (PRABU *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2017). O uso de técnicas que avaliem os efeitos morfológicos e fisiológicos do déficit hídrico de forma rápida e não destrutiva, podem ser de grande utilidade para a seleção de genótipos tolerantes à seca (O'NEILL *et al.*, 2006).

A cana-de-açúcar possui uma necessidade elevada de disponibilidade hídrica e seu desenvolvimento é muito afetado pelo déficit hídrico (LAKSHMANAN; ROBINSON, 2014). Diversos autores relataram que a produtividade de cana-de-açúcar é bastante reduzida em condições de estresse hídrico, afetando características morfológicas, tais como área foliar, número de folhas verdes, alongamento e diâmetro de colmos. Esta redução pode ser mais significativa quando ocorre durante os estágios iniciais de desenvolvimento (INMAN-BAMBER *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2009; PINCELLI; SILVA, 2012; ZHAO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014). Os impactos negativos resultantes da limitação hídrica podem se tornar ainda maiores devido à ocorrência de períodos de seca mais longos, com maior frequência e mais intensos (MATTA *et al.*, 2010). Portanto, as respostas podem variar de acordo com genótipo, duração e intensidade do estresse, bem como o

tecido ou estágio vegetativo afetado (BARTELS; SUNKAR, 2005; SMIT; SINGELS, 2006; GRAÇA *et al.*, 2010; INMAN-BAMBER *et al.*, 2012).

Os resultados negativos nos aspectos morfológicos são advindos da diminuição nas taxas fotossintéticas, que é o principal fator de redução do crescimento e produtividade em cana-de-açúcar em condições de déficit hídrico, com a diminuição na expansão foliar, fechamento estomático (ocasionando aumento de temperatura e redução da concentração interna foliar de CO₂) e mudança na alocação de carbono (SATO *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013; BARBOSA *et al.*, 2015). O aumento de biomassa em plantas com metabolismo C4 está mais correlacionado com o aumento da eficiência do uso da água (EUA) do que com a redução na fotorrespiração (VU *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2008). O uso eficiente da água faz com que a planta seja capaz de aumentar sua resistência à deficiência hídrica (VU; ALLEN, 2009).

O fechamento parcial dos poros estomáticos é uma das repostas iniciais ao déficit hídrico, considerando que a entrada de CO₂ e a saída do vapor de água compartilham uma via comum através dos estômatos em superfícies foliares; portanto, há uma relação intrínseca entre a transpiração e a assimilação. Há comprovações de que as reduções na taxa fotossintética durante estresse hídrico moderado têm associação direta a limitações difusivas e apenas em condições severas o aparato fotossintético pode ser prejudicado por limitações bioquímicas (CHAVES; OLIVEIRA, 2004; FLEXAS *et al.*, 2004).

As plantas são aptas a realizar ajustes fisiológicos em seu metabolismo em busca da manutenção da vida, diante de reduções no conteúdo interno de água (OBATA; FERNIE, 2012; SILVENTE *et al.*, 2012). Essas alterações envolvem uma coordenação estrita entre processos fisiológicos fundamentais, como fotossíntese, respiração e fotorrespiração. Além disso, pode ocorrer a produção de metabólitos específicos que atuam na proteção de estruturas celulares, tais como, açúcares, aminoácidos, amidas e outros metabólitos secundários. Isto acontece principalmente em situações de restrição hídrica e auxilia a planta manter sua homeostase diante de condições adversas (KRASENSKY; JONAK, 2012; SILVENTE *et al.*, 2012; BARNABY *et al.*, 2013).

Normalmente, a maior parte das informações encontradas na literatura tratam apenas do estresse hídrico como um evento que ocorre apenas uma única vez no ciclo vital de uma planta e isso é contrastante com a realidade em que a

planta convive experimentando situações recorrentes de estresse nas mais variadas formas (GALLE *et al.*, 2011). Diante disto, existe a dificuldade em extrapolar os dados obtidos em um único episódio de estresse hídrico para o que ocorre em condições de campo. Alguns trabalhos sugerem que a exposição contínua ao mesmo tipo de estresse pode resultar em uma performance melhor quando comparado a um único evento de estresse e também mostram que as plantas podem ser capazes de se aclimatar diante de situações de estresse recorrentes apresentando respostas melhores e mais rápidas (SCHEFFER *et al.*, 2001; BRUCE *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2015).

Nesse sentido, plantas que foram expostas previamente a alguma situação estressante podem desenvolver algum tipo diferente de aclimatação, chamado de “*stress memory*”, e há a possibilidade de que suas respostas defensivas sejam potencializadas quando expostas ao mesmo estresse novamente (BRUCE *et al.*, 2007; IWASAKI; PASZKOWSKI, 2014; FLETA-SORIANO; MUNNÉ-BOSCH, 2016). Evidências de aclimatação diferencial a diversos tipos de estresse, tais como seca, salinidade, alta e baixa temperatura foram relatadas (DING *et al.*, 2012; BYUN *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2016). Entretanto, ainda é frágil o entendimento sobre os processos que levam a planta a uma possível aclimatação em uma situação de deficiência hídrica.

2.3 Variação somaclonal em cana-de-açúcar

A obtenção de cultivares de cana-de-açúcar com características agronômicas melhoradas, tolerantes a estresses bióticos e abióticos, é muito importante, pois diversos fatores ambientais desfavoráveis podem afetar sua produtividade. Apesar de cultivares tolerantes aos diversos tipos de estresse terem sido selecionadas por programas tradicionais de melhoramento são necessários avanços tecnológicos nesse sentido a fim de acelerar o desenvolvimento de novos cultivares (SUPRASANNA, 2011).

Métodos de cultivo *in vitro* em cana-de-açúcar apresentaram grande impacto na pesquisa básica e na geração de tecnologia aplicada ao melhoramento de plantas. Dentre estes incluem-se a micropropagação de clones de elite, a produção de material de plantio livre de doenças, a produção de somaclones

agronomicamente melhores, a triagem e a seleção para tolerância a estresses bióticos e abióticos (SUPRASANNA, 2011; SNYMAN *et al.*, 2011). A regeneração de plantas de cana-de-açúcar *in vitro* pode ser feita a partir de tecidos de inflorescência imaturos (DESAI *et al.*, 2004a), camadas finas de folhas imaturas (LAKSHMANAN *et al.*, 2006) e segmentos foliares (MANICKAVASAGAM; GANAPATHI 1998; GILL *et al.* 2006; FRANKLIN *et al.*, 2006). Estudos são realizados atualmente a fim de refinar e melhorar a frequência de indução de calos, proliferação e regeneração de plantas usando diferentes meios, reguladores de crescimento e outros aditivos físicos ou químicos (DESAI *et al.*, 2004b; PATEL *et al.*, 2007; KAUR *et al.*, 2008; PATADE *et al.*, 2008; ALI *et al.*, 2008; KENGANAL *et al.*, 2008; PATADE; SUPRASANNA, 2008; SUPRASANNA *et al.*, 2008b; SUPRASANNA *et al.*, 2010a; KOCH *et al.*, 2010; SNYMAN *et al.*, 2011).

Na cana-de-açúcar, a cultura de tecidos induz considerável variabilidade fenotípica (BURNER; GRISHAN, 1995). Em células vegetais, a variabilidade genética ocorre naturalmente durante a cultura de tecidos e gera variação, a qual pode fornecer material importante, tanto para estudos genéticos quanto para a seleção *in vitro* de características agronômicas desejadas em plantas (SCOWCROFT *et al.*, 1983; MADDOCK; SEMPLE, 1986; TAGHIAN; EL-AREF, 1997; HOY *et al.*, 2003). Em razão disto, técnicas biotecnológicas incluindo variação somaclonal, mutagênese e seleção *in vitro* têm sido utilizadas para selecionar mutantes agronomicamente melhores (JAIN, 2005; SUPRASANNA; BAPAT 2006; SUPRASANNA *et al.*, 2007a; PATADE; SUPRASANNA, 2008).

A variação somaclonal, como uma importante ferramenta da cultura de tecidos *in vitro* para desenvolver melhores cultivares agrícolas, foi adotada na busca de plantas com maior qualidade e produtividade em cana-de-açúcar, sendo que esta espécie foi uma das primeiras onde a variação somaclonal foi relatada (HEINZ; MEE, 1969; LARKIN; SCOWCROFT, 1981).

3 CAPÍTULO 1: Avaliação de variantes somaclonais de cana-de-açúcar para a tolerância ao déficit hídrico

RESUMO

A indução de variabilidade para a tolerância à deficiência hídrica pode ser usada para a obtenção de genótipos mais eficientes e produtivos, sendo que plantas regeneradas a partir de cultura de tecidos podem exibir variações somaclonais em importantes características agrônômicas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho fisiológico de somaclones do cultivar de cana-de-açúcar SP80-3280 produzidos *in vitro* para a tolerância ao déficit hídrico em comparação com plantas-controle propagadas pelo método convencional. Para tanto, plantas de somaclones regenerados a partir de calos embriogênicos foram submetidas à deficiência hídrica, utilizando delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x5, sendo dois regimes hídricos, 100% e 30% da reposição diária de água evapotranspirada em relação à capacidade de campo, e cinco genótipos (somaclones SP05, SP06, SP09, SP10 e controle oriundo de propagação vegetativa de gemas axilares). A parcela experimental foi constituída de vasos plásticos contendo 14,0 kg de solo com uma planta por vaso, para cada tratamento utilizou-se dez repetições. O déficit hídrico foi iniciado aos 120 dias após plantio e durante este período foram realizadas avaliações biométricas e fisiológicas nas plantas. Após 30 dias sob deficiência hídrica as plantas foram reidratadas e reavaliadas. Dos somaclones analisados, SP06, SP09 e SP10 apresentaram as melhores respostas fisiológicas, biométricas e maior acúmulo de biomassa quando comparadas às plantas controle não regeneradas *in vitro*. Portanto, a variação somaclonal mostrou-se uma boa ferramenta para obter plantas mais tolerantes ao déficit hídrico, sendo que considerando os valores de biomassa, os somaclones SP09 e SP10 demonstraram melhor potencial agrônômico para serem testados em condições de campo para avaliar a utilização como cultivares.

Palavras-chave: Variação somaclonal, Deficiência Hídrica, Biotecnologia.

ABSTRACT

Induction of variability for tolerance to water deficiency can be used to obtain more efficient and productive genotypes. For this end, plants regenerated from tissue culture can produce somaclonal variations for important agronomic characteristics. Therefore, the objective of this work was to evaluate the physiological performance of somaclones of the sugarcane cultivar SP80-3280 produced *in vitro* for the tolerance to water deficit in comparison to control plants propagated by the conventional method. Plants of four somaclones regenerated from embryogenic callus were submitted to water deficit, using a completely randomized design in the 2x5 factorial scheme, with two water regimes, 100% and 30% of the daily replenishment of field capacity in relation to the evapotranspired water, and five genotypes (somaclones SP05, SP06, SP09 and SP10, and control plants propagated by axillary buds). The experiment was carried out in plastic pots containing 14.0 kg of soil with one plant per pot and ten replicates per treatment. The water deficit started 120 days after planting and biometric and physiological evaluations were performed during this period. After 30 days under water deficit the plants were rehydrated, when the physiological and biomass evaluations were performed again. The somaclones SP06, SP09 and SP10 presented the best physiological, biometric and biomass accumulation responses when compared to control plants. Therefore, somaclonal variation proved to be a good tool to obtain plants more tolerant to water deficit. Considering the biomass values, the SP09 and SP10 somaclones demonstrated better agronomic potential to be tested under field conditions to evaluate their use as cultivars.

Keywords: Somaclonal variation, Drought stress, Biotechnology.

3.1 Introdução

Células vegetais possuem a capacidade de totipotência na qual podem regenerar-se e através da diferenciação celular gerar uma nova planta. Essa habilidade de totipotência é muito utilizada para micropropagação através da indução de tecidos meristemáticos, utilizando reguladores de crescimento para regenerar e formar novas plantas (BAMBANG, 2017). A micropropagação de cana-de-açúcar a partir de tecidos do meristema apical é muito utilizada em programas de melhoramento, pois há economia no tempo de multiplicação das variedades e clones promissores e na facilitação da aquisição de grandes volumes de material (HENDRE *et al.*, 1983; KRISHNA *et al.*, 2008; EFTEKHARI *et al.*, 2012; MAHLANZA, 2018).

A produção de calos embriogênicos regenerados também é essencial dentro das estratégias biotecnológicas de melhoramento genético de cana-de-açúcar. Para o melhoramento *in vitro*, calos embriogênicos são expostos a agentes mutagênicos e mutantes com as características de interesse e são regenerados (PATADE; SUPRASANNA, 2008; MAHLANZA, *et al.*, 2013). Calos embriogênicos também são utilizados para transformação pela engenharia genética a partir da técnica de bombardeamento de partículas ou mediada por *Agrobacterium* (HEINZ, 1973; SREENIVASAN; SREENIVASAN, 1984; BOWER, 1992; SNYMAN, 2004; JALAJA *et al.*, 2008; LAL *et al.*, 2015; KRISHNAN; MOHAN, 2017; MAHLANZA, 2018).

Além destas vantagens dos sistemas de cultivo de tecidos vegetais acima descritas, a instabilidade (variabilidade) fenotípica observada em plantas regeneradas *in vitro* de algumas espécies, incluindo cana-de-açúcar (IRVINE *et al.*, 1984; BAILEY; BECHET, 1989; IRVINE, 1991; PEROS *et al.*, 1994; BURNER; GRISHAM, 1995; TAYLOR *et al.*, 1995; BAIRU *et al.*, 2011; CURRAIS *et al.*, 2013), pode proporcionar variação genética para programas de melhoramento de plantas. Fatores tais como fonte do explante, tempo de cultura, número de subcultivos, fitohormônios, genótipo, composição do meio de cultura, o nível de ploidia e mosaicismo genético são capazes de induzir variabilidade *in vitro* (SILVAROLLA, 1992). Larkin e Scowcroft (1981) aplicaram o termo variação somaclonal para descrever a ocorrência de variantes genéticas derivadas de procedimentos de variação originária da cultura de células e tecidos *in vitro*.

A variação somaclonal é uma das áreas de interesse para a obtenção de genótipos melhorados, principalmente em plantas com propagação vegetativa,

sendo que vários autores já apresentaram os aspectos implicados na maior ocorrência de variação somaclonal em algumas espécies e as aplicações específicas desta ferramenta (LARKIN; SCOWCROFT, 1981; LEE; PHILLIPS, 1988; BAJAJ, 1990; REUVENI *et al.*, 1993; KARP, 1994; KARP, 1995; KAEPLER *et al.*, 2000; JAIN, 2001; SAHIJRAM *et al.*, 2003). A regeneração de plantas produzidas através da técnica de cultura de secções de tecidos sem um meristema pré-formado ou derivado de calos e culturas celulares, como é o caso da embriogênese somática em cana-de-açúcar, é mais suscetível à variação somaclonal (PHILLIPS *et al.*, 1990; PHILLIPS *et al.*, 1994; KARP, 1995; BURNER; GRISHAM, 1995; DAMASCO *et al.*, 1996).

Atualmente, o termo variação somaclonal é universalmente usado em todas as formas variantes advindas da cultura de tecidos (BAIRU *et al.*, 2011), entretanto, outros nomes como variação protoclonal, gametoclinal ou mericlinal são utilizados pelos cientistas para descrever variantes provenientes do protoplasma e meristema (SHEPARD *et al.*, 1980; BAJAJ, 1990; KARP, 1994; CHEN *et al.*, 1998). Como este é um processo assexuado, que envolve somente divisão celular mitótica, teoricamente não deveria ser a causa de variação genética, sendo que o esperado seria a obtenção de plantas geneticamente uniformes a partir de multiplicação clonal (LARKIN, 1998).

A primeira observação e relato de variação somaclonal foi feito por Braun (1959), no crescimento de células vegetais *in vitro* e sua regeneração em uma planta completa. Entretanto, a partir dessas observações iniciais, a variação somaclonal tornou-se uma ferramenta útil no melhoramento de culturas agrícolas, oportunizando o desenvolvimento de novas variantes (BOUHARMONT, 1994; MEHTA; ANGRA, 2000; PREDIERI, 2001).

A indução de variação somaclonal também pode ser utilizada na manipulação genética das culturas com características poligênicas (BRAR; JAIN, 1998; JAIN, 2001), sendo interessante destacar que suas utilizações no melhoramento através da geração de novas variedades apresentam resistência a doenças e melhores características produtivas (KARP, 1995; UNAI *et al.*, 2004). Plantas selecionadas *in vitro* com uma melhoria significativa para a tolerância à seca foram relatadas para o milho (DOLGIKH *et al.*, 1994), sorgo (DUNCAN *et al.*, 1995), trigo (ALMANSOURI *et al.*, 2001), arroz (ADKINS *et al.*, 1995), e feijão (GULATI; JAIWAL, 1994).

Portanto, tendo em vista a potencial utilidade da variação somaclonal, esforços foram empregados para a utilização da embriogênese somática para induzir variantes somaclonais em cana-de-açúcar para obtenção de novos e melhores cultivares (KRISHNAMURTHI, 1994; BURNER, 1995; MENDOZA, 2000; HOY *et al.*, 2003; SOBHAKUMARI, 2012; KEVIN, 2002; SMIULLAH *et al.*, 2013). Nesta espécie, os calos embriogênicos somáticos são produzidos por indução de explantes foliares meristemático, geralmente em meio MS contendo (2,4-D) 2,4-ácido diclorofenoxiacético (LEE, 1987). A micropropagação de cana-de-açúcar realizada por regeneração de gemas apicais ou axilares é empregada a seguir para multiplicar os eventos de variação somaclonal, pois o protocolo de multiplicação de plantas a partir dessas gemas apresenta menor capacidade de gerar variantes somaclonais (MANICKAVASAGAM *et al.*, 2004; SUGIHARTO *et al.*, 2005).

Neste contexto, a utilização de variabilidade genética obtida por variação somaclonal, particularmente para a tolerância à deficiência hídrica, é um método valioso no melhoramento da cana-de-açúcar. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de encontrar plantas com maior tolerância a estresses abióticos em variantes clonais de cana-de-açúcar advindos de embriões somáticos cultivados *in vitro*. Para tanto, foram analisados os aspectos fisiológicos de plantas clonais de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica.

3.2 Material e Métodos

Os somaclones foram obtidos através de embriogênese somática usando como fontes de explantes tecido meristemático apical de plantas de cana-de-açúcar com dez meses de idade da variedade SP80-3280, cultivadas em campo na estação experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR, Londrina, PR). Segmentos de folhas imaturas foram desinfestados superficialmente com etanol 70% (3 vezes por 2 minutos) e hipoclorito de sódio a 50% da concentração comercial (2,5% p/p) por 20 minutos. A região meristemática foi cortada transversalmente em discos de 2-3 mm e transferidas para potes de vidro de 250 mL contendo 40mL de meio de indução MS (Murashige e Skoog) modificado por Bower *et al.* (1996), suplementado com 25 g/L de sacarose, 150 mg de ácido cítrico, 13 µM de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e solidificado com 3 g/L de phytigel (Sigma®)

(MANIERO, 2015). Após o procedimento de cultura de tecidos, as plantas regeneradas foram transferidas para casa-de-vegetação e mantidas em vasos de 20L contendo substrato vegetal (Bioplant[®]) sob condições ideais de irrigação e nutrição. Posteriormente, foi feita propagação vegetativa através do cultivo de gemas axilares de somaclones com melhor desenvolvimento vegetativo (SP05, SP06, SP09 e SP10), os quais foram enviados à UNOESTE (Universidade do Oeste Paulista) para as avaliações experimentais (Figura 2).

As plantas recebidas com 30 dias após plantio, foram transferidas para ambiente de contenção (câmara climatizada) para crescimento e desenvolvimento uniforme. Inicialmente, as plantas foram transplantadas para copos plásticos de 700mL contendo substrato vegetal (Bioplant[®]) e mantidas no mesmo ambiente controlado, com temperatura diurna de 30 °C, noturna 22 °C e fotoperíodo de 12h (Figura 3). Após atingirem 2 meses, foram transferidas para vasos de 12L com solo e cultivadas em casa-de-vegetação para as análises subsequentes. As plantas clonais de cada somaclone foram selecionadas para condução deste experimento por apresentarem homogeneidade em tamanho.

As plantas utilizadas como tratamento controle foram também obtidas no campo experimental do IAPAR a partir de propagação vegetativa de gemas axilares. Neste caso, foi realizado o *roguing* visando não utilizar plantas que apresentassem qualquer tipo de doença sistêmica aparente (NOGUEIRA, 2006). As plantas foram coletadas através de corte manual com facão desinfetado à fogo. Após o corte, os toletes foram despalhados manualmente e cortados com serra elétrica em toletes contendo apenas uma gema (aproximadamente 7 cm). No corte dos toletes o terço inferior e superior das plantas foram descartados, aproveitando somente o terço médio da cana. Os toletes selecionados foram submetidos ao tratamento térmico para o controle da doença bacteriana “raquitismo da soqueira” (*Leifsonia xyli*) em água a 52°C durante 30 minutos (SANGUINO *et al.*, 1988, 1996). Após o tratamento térmico as mudas foram resfriadas em temperatura ambiente durante 30 min e logo em seguida foi realizado o plantio, cultivo e seleção por tamanho, conforme especificado acima para as plantas dos somaclones.

As plantas foram mantidas em condições casa-de-vegetação durante todo o período experimental (6 meses) em vasos de 12L contendo 14 kg de solo tipo Argissolo Vermelho-Amarelo eutrófico. O solo foi corrigido 30 dias antes do plantio segundo as recomendações de Vitti (2008), a fim de atender necessidades

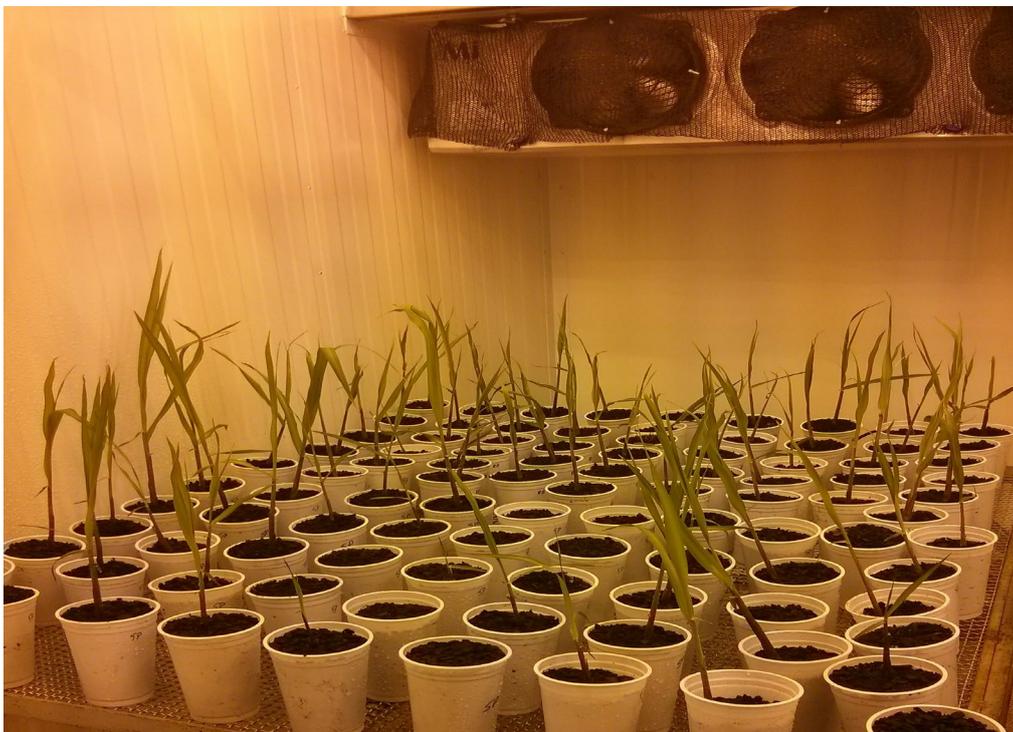
nutricionais da cultura apontadas em análise química previamente realizada. O ambiente foi monitorado diariamente por um sistema HOBO (modelo H08-004-02, EUA) de coleta automática de temperatura, luz e umidade. Durante este período foi realizado um acompanhamento biométrico quinzenal, sendo que os parâmetros fisiológicos foram avaliados durante o período de restrição hídrica e reidratação das plantas, conforme descrito a seguir.

Figura 2- Somaclones da variedade SP80-3280 após propagação vegetativa por 60 dias em condições de casa-de-vegetação no IAPAR.



Fonte: O autor.

Figura 3- Plantas dos somaclones SP05, SP06, SP09 e SP10 da variedade SP80-3280 com 70 dias após plantio mantidas em câmara de crescimento com ambiente controlado para uniformizar o desenvolvimento.



Fonte: O autor.

3.2.1 Descrição do modelo experimental

- **Experimento – Deficiência hídrica**

O experimento de déficit hídrico foi conduzido no Campus II da Universidade do Oeste Paulista em Presidente Prudente – SP.

As plantas foram submetidas a dois regimes hídricos, caracterizados por reposição de 100% (controle) e 30% (déficit) da evapotranspiração diária, através do método gravimétrico, sendo feita a reposição diária da água. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação e o experimento foi realizado em arranjo inteiramente casualizado com 10 repetições de cada tratamento. A parcela experimental foi constituída por apenas uma planta originada do perfilho primário, com desbaste permanente dos perfilhos secundários.

O regime de limitação hídrica foi iniciado 120 dias após brotação das mudas, com reposição hídrica realizada diariamente a partir de pesagens dos vasos e reposição da massa de água perdida conforme definido acima. As plantas com

restrição hídrica ficaram submetidas a este fator estressante por um período de 30 dias, em seguida foi reestabelecida a quantidade de água adequada (100%), a fim de analisar a capacidade de recuperação fisiológica das plantas.

Ao final do experimento, 30 dias após a reidratação, foi realizada a avaliação do rendimento de biomassa, analisando a massa seca total (*MST*), massa seca foliar (*MSF*), massa seca do colmo (*MSC*), massa seca da raiz (*MSR*) e a área foliar total por planta (*AFT*).

3.2.2 Parâmetros avaliados

3.2.2.1 Estado hídrico das plantas

O conteúdo relativo de água foliar (CRA) foi avaliado para determinar a porcentagem de água na folha (10cm de tecido foliar por planta de cada repetição). O CRA foi realizado 20 dias após o início do tratamento com déficit hídrico. As análises foram realizadas às 05:00h e às 12:00h. O CRA foi calculado segundo LARCHER (2000):

$$\text{CRA} = (\text{Mf} - \text{Ms}) / (\text{Msat} - \text{Ms}) \times 100 (\%)$$

Onde *Mf* corresponde à massa fresca de discos foliares pesados imediatamente após o seu destacamento, e *Msat* corresponde a massa de discos foliares sob saturação de água, após imersão em água destilada durante 12h, *Ms* corresponde a massa seca obtida após secagem dos discos foliares em estufa a 60°C até obtenção de massa constante.

Foi determinado o potencial de água foliar ($-\Psi$) às 05:00h (“predawn” $-\Psi_{PD}$) e às 12:00h (“midday” $-\Psi_{MD}$) quando as plantas estavam sob deficiência hídrica aos 8 e 30 dias após o início do déficit hídrico utilizando a câmara de Scholander. O potencial de água foliar medido com a câmara de pressão fornece uma medição de pressão hidrostática negativa que ocorre no xilema de uma planta intacta devido à evaporação de água a partir da transpiração (SCHOLANDER *et al.*, 1965; KIRKHAM, 2005).

3.2.2.2 Extravasamento de membrana (EM)

O extravasamento de eletrólitos celulares foi avaliado por condutividade elétrica de uma solução aquosa. Foram coletados 10 discos (6mm diâmetro) de folhas extraídos de cada repetição em todos os tratamentos durante o período de restrição hídrica e em seguida foram colocados em um recipiente plástico com 10 mL de água deionizada. Os recipientes com a solução foram tampados e mantidos à temperatura de 25° C por 24 h. Posteriormente, a condutividade do meio foi determinada (X_i) com o auxílio de um medidor portátil de condutividade elétrica (LTLutron, modelo CD-4301).

Em seguida, os discos na solução foram submetidos a banho-maria a 60 °C por 3h e a condutividade elétrica da solução foi avaliada novamente (X_f). O extravasamento de eletrólitos celulares foi expresso como a porcentagem de condutividade em relação à condutividade total após o aquecimento por 3h a 60 °C [$(X_i/X_f) \times 100$]. Essa técnica permite avaliar a integridade das membranas celulares visto que quanto menor a condutividade elétrica da solução, menor é a quantidade de eletrólitos que extravasam das membranas indicando seu grau de integridade. (SCOTTI CAMPOS; THU PHAM THI, 1997).

3.2.2.3 Medidas das variáveis fotossintéticas

Durante o período de déficit hídrico (120 DAP) foram realizadas medidas de resposta fotossintética (A, E, Gs, Ci). Para essas medidas foram utilizadas as folhas classificadas como +1, que são as primeiras folhas totalmente expandidas de cada planta, consideradas folhas adultas. Estes parâmetros foram analisados após a determinação do estado hídrico das plantas, a fim de que as medidas fossem realmente feitas somente quando as plantas estivessem sob déficit hídrico. Para esta avaliação utilizou-se o analisador de gás por infravermelho (Li-6400XTR, LiCor, EUA), sob irradiação de $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração de CO_2 de 400 ppm.

3.2.2.4 Fluorescência da clorofila a

A avaliação da atividade fotoquímica foi realizada no mesmo momentos das medidas fotossintéticas (120 DAP), por meio da análise de fluorescência da clorofila

a, utilizando um medidor ótico de fluorescência (FluorPen, FP100, Photo System Instruments). Os parâmetros determinados foram: eficiência quântica potencial (F_v/F_m) e efetiva (F_v'/F_m') do FSII às 05:00h e 12:00h. Calculou-se também a taxa de transporte de elétrons ($ETR = DFFF * \Delta F/F_m' * 0,5 * 0,84$) (BILGUER *et al.*, 1995). Os valores de F_m e F_v indicam, respectivamente, as fluorescências máxima e variável, determinadas após 30 min de adaptação ao escuro. F_m' e F_s são, respectivamente, a fluorescência máxima e no estado de equilíbrio dinâmico na presença de luz, e F_0' representa a fluorescência basal após a excitação do FSII. (BILGER; SCHREIBER; BOCK, 1995).

3.2.2.5 Medidas pontuais de recuperação

Após 30 dias do início do déficit hídrico foi realizada a reidratação das plantas de modo a elevar a capacidade de campo para 100%. Após a reidratação foram realizadas avaliações pontuais da fotossíntese (A) e da condutância estomática (G_s) no dia da reidratação, aos três e aos cinco dias após a reidratação. Para esta avaliação utilizou-se o analisador de gás por infravermelho (Li-6400XTR, LiCor, EUA), sob irradiação de $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração de CO_2 de 400 ppm.

3.2.2.6 Avaliação biométrica e produção da biomassa total

Após o transplante das mudas para os vasos de 14,0 kg em casa-de-vegetação, foram realizadas quinzenalmente avaliações biométricas da altura das plantas, diâmetro do colmo, número de folhas verdes e número de entrenós. A altura das plantas foi medida da base (solo) até a bainha da folha totalmente expandida (folha +1) e o diâmetro do colmo foi aferido no terço médio do colmo de cada planta. Ao final do experimento, foi realizado a coleta das plantas para a avaliação do rendimento de biomassa, analisando a massa seca total (MST), massa seca foliar (MSF), massa seca da bainha (MSB), massa seca da raiz (MSR) e a área foliar total por planta (AFT).

A área foliar total foi medida com um analisador portátil de área foliar (modelo LI-3000A, Li-Cor, USA). Para a quantificação de massa seca foliar (MSF), massa seca da bainha (MSB) e massa seca da raiz (MSR) as amostras foram

armazenadas em sacos de papel, identificados e mantidos em estufa sob uma temperatura constante de 70 °C, até obtenção de massa constante medida com uma balança de precisão.

3.2.3 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) e ao teste de comparação de médias Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software SISVAR® (versão 5.3).

3.3 Resultados

3.3.1 Parâmetros fisiológicos

O potencial de água foliar “predawn” ($-\Psi_{PD}$) e “midday” ($-\Psi_{MD}$), foram afetados diretamente pelo regime hídrico aplicado (déficit hídrico), sendo possível identificar uma redução significativa quando comparamos os tratamentos de 100% e 30% (Tabela 1), confirmando que as plantas estavam sob deficiência hídrica. Essa resposta foi semelhante para as plantas controle e para os somaclones (SP05, SP06, SP09, SP10). Não foi possível identificar diferenças significativas entre as plantas dentro de cada regime hídrico (100% e 30%), para ambos parâmetros de potencial de água foliar ($-\Psi_{PD}$) e ($-\Psi_{MD}$).

A porcentagem de extravasamento de eletrólitos celulares (EEC) não apresentou diferença significativa entre os clones dentro do regime hídrico de 100%, durante todo o período de experimento (Tabela 1). Em contrapartida, no regime hídrico de 30%, tratamento no qual as plantas estavam com limitação hídrica (estresse hídrico), houve diferenças significativas entre as plantas dos somaclones e as controle, sendo essa diferença ainda mais acentuada quando as plantas ficaram 30 dias sob deficiência hídrica. Neste caso, os somaclones SP06, SP09 e SP10, mesmo apresentando aumento no extravasamento de eletrólitos celulares, mostraram valores significativamente inferiores em comparação com as plantas do controle e do somaclone SP05.

Após dois dias da reidratação das plantas foi possível observar que as plantas dos somaclones SP06, SP09 e SP10 igualaram os valores de EEC similares

aos observados quando estas foram mantidas irrigadas; entretanto, as plantas-controle e as do somaclone SP05 apresentaram menor recuperação em comparação àquelas do controle irrigado.

Foi possível observar diferenças expressivas entre os regimes hídricos em todas as plantas no que tange à eficiência quântica potencial medida ao meio dia (F_v/F_{m12}) já após 8 dias do início do déficit hídrico. (Tabela 2). A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi afetada pelo déficit hídrico, com a consequente redução da fluorescência, no somaclone SP05 nos regimes de 100% e 30% de irrigação quando comparadas com as plantas controle; entretanto, dentro do regime de 30% a redução do ETR foi pouco afetada nos somaclones SP06, SP09 e SP10.

Tabela 1– Valores médios do potencial de água foliar às 05:00 hs ($-\Psi_{PD}$) e às 12:00 hs ($-\Psi_{MD}$) e extravasamento de eletrólitos celulares (EEC) para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores observados 8 e 30 dias após o início do déficit hídrico e 2 dias após reidratação das plantas.

Cultivar		SP80-3280				
Tratamento		100%				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	
8 dias após início do déficit hídrico						
$-\Psi_{PD}$ (Mpa)	0,4 Ab	0,2 Aa	0,2 Aa	0,2 Aa	0,3 Aab	
$-\Psi_{MD}$ (Mpa)	0,5 Aa	0,7 Aa	0,5 Aa	0,4 Aa	0,4 Aa	
EEC (%)	15,7 Aa	15,2 Aa	18,3 Aa	14,7 Aa	15,6 Aa	
30 dias após déficit hídrico						
$-\Psi_{PD}$ (Mpa)	0,3 Aa	0,2 Aa	0,2 Aa	0,2 Aa	0,2 Aa	
$-\Psi_{MD}$ (Mpa)	0,7 Aa	0,8 Aa	0,6 Aa	0,6 Aa	0,7 Aa	
EEC (%)	15,9 Aa	14,2 Aa	15,6 Aa	14,5 Aa	13,2 Aa	
2 dias após recuperação						
$-\Psi_{PD}$ (Mpa)	0,3 Aa	0,2 Aa	0,2 Aa	0,2 Aa	0,3 Aa	
$-\Psi_{MD}$ (Mpa)	0,6 Aa	0,6 Aa	0,4 Aa	0,6 Aa	0,4 Aa	
EEC (%)	13 Aa	12,9 Aa	12,4 Aa	12,5 Aa	11,8 Aa	
Tratamento		30%				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	
8 dias após início do déficit hídrico						
$-\Psi_{PD}$ (Mpa)	0,85 Ba	0,85 Ba	0,8 Ba	0,8 Ba	0,9 Ba	
$-\Psi_{MD}$ (Mpa)	1,7 Bab	1,5 Ba	1,4 Ba	1,8 Bb	1,8 Bb	
EEC (%)	45,5 Bb	27,65 Ba	27,3 Ba	21,31 Ba	24,65 Ba	
30 dias após déficit hídrico						
$-\Psi_{PD}$ (Mpa)	0,8 Ba	0,8 Ba	0,7 Ba	0,8 Ba	0,9 Bb	
$-\Psi_{MD}$ (Mpa)	1,5 Ba	1,5 Ba	1,3 Ba	1,3 Ba	1,3 Ba	
EEC (%)	50,9 Bb	47,4 Bb	45,7 Ba	45,8 Ba	44,6 Ba	
2 dias após recuperação						
$-\Psi_{PD}$ (Mpa)	0,4 Aa	0,5 Ba	0,5 Ba	0,3 Aa	0,3 Aa	
$-\Psi_{MD}$ (Mpa)	0,6 Aa	0,6 Ba	0,6 Aa	0,5 Aa	0,5 Aa	
EEC (%)	17,8 Bb	20,2 Bb	13,8 Aa	13,5 Aa	13,9 Aa	

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100% e 30%) na comparação dos clones; Letras minúsculas indicam diferença estatística entre soma clones (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2– Valores médios da eficiência quântica potencial antemanhã, meio dia e eficiência quântica efetiva do FSII (F_v/F_m , F_v/F_{m12} , $\Delta F/F_m'$ respectivamente), taxa de transporte de elétrons (ETR) para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores apresentados 8 dias após o início do déficit hídrico.

Cultivar		SP80-3280				
Tratamento		100%				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	
Fv.Fm	0,82 Aa	0,83 Aa	0,81 Aa	0,82 Aa	0,82 Aa	
Fv.Fm ₁₂	0,68 Aa	0,66 Aa	0,75 Aa	0,72 Aa	0,75 Aa	
$\Delta F_v.F_m$	0,79 Aa	0,81 Aa	0,79 Aa	0,83 Aa	0,83 Aa	
ETR	275,52 Aa	278,88 Aa	272,16 Aa	275,52 Aa	275,52 Aa	
Tratamento		30%				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	
Fv.Fm	0,71 Aa	0,69 Aa	0,77 Aa	0,79 Aa	0,83 Aa	
Fv.Fm ₁₂	0,45 Ba	0,49 Ba	0,52 Ba	0,55 Ba	0,55 Ba	
$\Delta F_v.F_m$	0,76 Aa	0,81 Aa	0,78 Aa	0,76 Ba	0,80 Aa	
ETR	238,56 Bb	231,84 Bb	258,72 Ba	265,44 Ba	278,88 Aa	

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100% e 30%) na comparação dos clones; Letras minúsculas indicam diferença estatística entre somaclones (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Após 8 dias do início do déficit hídrico, a taxa de assimilação líquida de CO₂ e a transpiração foliar apresentaram em média 50% de redução para as plantas de todos os genótipos quando entre os regimes hídricos (100% e 30%). As plantas que estavam sob deficiência hídrica tiveram redução de suas taxas fotossintéticas em função da limitação hídrica (Tabela 3).

As plantas-controle e os somaclones quando analisados dentro de cada regime hídrico irrigado, não apresentaram diferenças significativas para os parâmetros analisados. Por outro lado, no regime hídrico de 30% a assimilação líquida de CO₂ dos clones SP05 e SP09 apresentaram valores menores, quando comparadas aos demais somaclones e às plantas controle. Para os demais parâmetros não houve diferença relevante.

Tabela 3– Valores médios de assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO₂ (Ci), para plantas submetida a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores apresentados 8 dias após o início do déficit hídrico.

Cultivar		SP80-3280				
Tratamento		100%				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	40,0 Aa	38,8 Aa	37,58 Aa	31,2 Aa	33,53 Aa	
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	6,43 Aa	5,45 Aa	4,66 Aa	5,33 Ba	4,36 Aa	
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0,43 Aa	0,33 Aa	0,30 Aa	0,30 Aa	0,26 Aa	
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	172,53 Aa	123,3 Aa	124,5 Aa	179,5 Aa	127,6 Aa	
Tratamento		30%				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	21,0 Ba	16,6 Bb	22,46 Ba	13,83 Bb	25,23 Ba	
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	3,63 Ba	1,73 Bb	3,30 Ba	1,46 Bb	2,73 Ba	
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0,13 Ba	0,06 Ba	0,16 Aa	0,03 Ba	0,1 Ba	
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	123,4 Ab	216,36 Aa	185,33 Aa	178,3 Aa	168,66 Aa	

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100% e 30%) na comparação dos clones; Letras minúsculas indicam diferença estatística entre somaclones (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Após 30 dias sob deficiência hídrica as plantas foram reidratadas. Não foram observadas diferenças significativas em assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO₂ (Ci) entre as plantas mantidas com 100% de reposição diária de água durante os 30 dias de cultivo em casa-de-vegetação (Tabela 4). As plantas controle e os clones SP06, SP09 e SP10 que estavam sob deficiência hídrica apresentaram plena recuperação fisiológica após 4 dias de reidratação, não havendo grandes diferenças entre os regimes hídricos (100% e 30%) para assimilação líquida de CO₂, condutância estomática e potencial de água foliar. Porém, houve diferenças pontuais na transpiração foliar e concentração interna de CO₂ nas plantas controle e do somaclone SP09 dentro do regime hídrico de 30%.

Tabela 4– Valores médios de assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO₂ (Ci) e potencial de água foliar às 12:00 hs ($-\Psi_{MD}$) para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores apresentados 4 dias após a reidratação das plantas.

Cultivar		SP80-3280				
Tratamento		100%				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	28,1 Aa	26,8 Ab	30,2 Aa	27,5 Aa	29,1 Aa	
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3,9 Aa	3,5 Aa	3,7 Aa	3,5 Aa	3,6 Aa	
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,2 Aa	0,17 Aa	0,19 Aa	0,18 Aa	0,18 Aa	
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	102,7 Aa	80,3 Aa	73,5 Aa	79,2 Aa	79,4 Aa	
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,4 Aa	0,5 Aa	0,4 Aa	0,4 Aa	0,5 Aa	
Tratamento		30%				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	27,64 Ab	25,39 Ab	31,5 Aa	34,2 Aa	32,4 Aa	
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	2,92 Ba	3,7 Aa	3,3 Aa	3,65 Aa	3,6 Aa	
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,15 Bab	0,21 Aa	0,19 Aa	0,22 Aa	0,2 Aa	
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	44,2 Ba	88,44 Aa	62,3 Aa	66,7 Ba	75,1 Aa	
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,6 Aa	0,5 Aa	0,5 Aa	0,5 Aa	0,4 Aa	

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100% e 30%) na comparação dos clones; Letras minúsculas indicam diferença estatística entre somaclones (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3.2 Avaliações biométricas e biomassa

As avaliações biométricas realizadas durante todo o experimento estão apresentadas na Tabela 5, onde é possível observar que no regime hídrico de 100% todas as plantas apresentaram similaridade nos parâmetros avaliados. Entretanto, é importante destacar positivamente o somaclone SP10 que atingiu taxas de crescimento superiores aos demais em variáveis como altura e diâmetro do colmo, ao contrário do somaclone SP05 que mostrou valores menores em relação aos demais nas variáveis biométricas de crescimento vegetal, durante a avaliação.

Durante o período equivalente ao de recuperação das plantas submetidas ao déficit hídrico, as plantas irrigadas (100%) continuaram apresentando crescimento normal com algumas diferenças significativas pontuais, destacando-se o maior número de entrenós dos somaclones SP06, SP09 e SP10 (Tabela 5), característica esta economicamente importante para indústria sucroalcooleira.

Em plantas sob deficiência hídrica, observou-se que as diferenças relevantes em comparação com o regime hídrico 100%, começaram a partir de 20 dias após o início do déficit hídrico para as variáveis altura e número de folhas verdes e 30 dias após o início do déficit hídrico para diâmetro e número de entrenós (Tabela 5). Esses resultados demonstram o efeito do déficit hídrico no crescimento vegetativo, afetando todas as plantas que estavam sob limitação hídrica, as quais apresentaram a redução em altura, diâmetro de colmo, número de folhas e número de entrenós. O somaclone SP09 se sobressaiu em relação aos demais e mesmo sob limitação hídrica apresentou valores maiores e significativos de altura e diâmetro do colmo (Tabela 5).

Após 10 e 20 dias da reidratação das plantas (30%), não foi possível identificar a recuperação nos parâmetros altura e número de folhas verdes. Apenas o somaclone SP09 estava completamente reestabelecido quando comparado as plantas irrigadas (Tabela 6). Ao final dos 30 dias de reidratação as plantas clonais SP09 e SP10 que estavam sob déficit hídrico se destacaram com maior altura, folhas verdes e entrenós, mostrando ótima recuperação.

Tabela 5– Valores médios dos parâmetros biométricos altura, diâmetro do colmo, número de folhas verdes e número de entrenós para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores observados 10, 20 e 30 dias após o início do déficit hídrico.

Cultivar	SP80-3280									
	Tratamento	100%					30%			
Genótipo	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
10 dias após início do déficit hídrico										
<i>Altura (cm)</i>	47 Aa	32,5 Ab	39,7 Aa	48,8 Aa	47,8 Aa	45 Ab	37,75 Ac	35,5 Ac	51 Aa	39,8 Ac
<i>Diâmetro (mm)</i>	15,6 Aa	10,8 Ab	17,9 Aa	15,5 Aa	16,8 Aa	14,3 Ab	10,9 Ac	11,5 Bc	14,2 Ab	16,1 Aa
<i>Folhas Verdes (nº)</i>	9 Ab	9,5 Ab	11 Ab	10,5 Ab	12 Aa	11 Ab	9,5 Ab	12 Aa	10,5 Ab	10,5 Ab
<i>Entrenós (nº)</i>	12 Aa	12 Aa	12,5 Aa	12 Aa	11,5 Aa	12 Aa	13 Aa	11 Aa	12 Aa	12 Aa
20 dias após início do déficit hídrico										
<i>Altura (cm)</i>	68 Ab	55 Ac	61,8 Ab	57,5 Ac	80 Aa	48,5 Bb	40,3 Bb	41,8 Bb	60,8 Aa	46 Ab
<i>Diâmetro (mm)</i>	20,6 Aa	18,3 Aa	16,3 Aa	16,8 Aa	19,7 Aa	17,8 Aa	11,9 Bb	13 Ab	16,5 Aa	17,8 Aa
<i>Folhas Verdes (nº)</i>	10 Ab	10 Ab	10 Ab	10 Ab	12 Aa	6 Bb	5,5 Bb	8 Ba	9 Aa	9 Ba
<i>Entrenós (nº)</i>	12 Aa	12 Aa	13,5 Aa	13 Aa	13 Aa	12 Aa	13 Aa	12 Aa	13 Aa	12 Aa
30 dias após início do déficit hídrico										
<i>Altura (cm)</i>	74,5 Ab	63,8 Ac	69,6 Ab	67 Ab	84 Aa	57,8 Ba	45,6 Bb	45 Bb	63,6 Aa	48,6 Bb
<i>Diâmetro (mm)</i>	21,5 Aa	19,3 Aa	18,3 Aa	19,3 Aa	21,5 Aa	18,2 Aa	12,8 Bc	15,4 Abc	17,8 Ab	18,9 Aa
<i>Folhas Verdes (nº)</i>	9 Ab	9 Ab	10 Aab	11 Aa	12 Aa	5,5 Bb	5,5 Bb	7 Bab	7 Bab	9 Ba
<i>Entrenós (nº)</i>	12 Aa	12 Aa	13,5 Aa	13 Aa	13 Aa	12 Aa	13 Aa	13 Aa	13 Aa	12 Aa

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100% e 30%) na comparação dos clones; Letras minúsculas indicam diferença estatística entre clones (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$). N=10.

Tabela 6– Valores médios dos parâmetros biométricos altura, diâmetro do colmo, número de folhas verdes e número de entrenós para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. Valores observados 10, 20 e 30 dias após a reidratação.

Cultivar	SP80-3280									
	100%					30%				
Tratamento	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
Genótipo	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
10 dia após recuperação										
<i>Altura (cm)</i>	79,2 Ab	73,4 Abc	78 Ab	70,9 Ac	90 Aa	64,7 Ba	50,9 Ba	48,2 Ba	66,4 Aa	53,1 Ba
<i>Diâmetro (mm)</i>	23,4 Aab	20,8 Ab	19,3 Ab	23,7 Aab	25,4 Aa	19,7 Aab	16,6 Ab	19,6 Aab	21,8 Aa	19,2 Bab
<i>Folhas Verdes (n°)</i>	9 Ab	9 Ab	10 Aab	11 Aa	12 Aa	5,5 Bb	5,5 Bb	7 Bab	7 Bab	9 Ba
<i>Entrenós (n°)</i>	13 Ab	12 Ab	14,5 Aa	14 Aa	15 Aa	14 Aab	13,5 Ab	15 Aa	15 Aa	14,5 Aab
20 dia após recuperação										
<i>Altura (cm)</i>	84,75 Aa	81 Aa	81,5 Aa	77,3 Aa	95,5 Aa	67,4 Ba	58 Ba	58,3 Ba	69 Aa	66,7 Ba
<i>Diâmetro (mm)</i>	25,7 Aa	23,4 Aa	23,4 Aa	27 Aa	26 Aa	21,9 Aa	19,8 Aa	20,3 Aa	22,7 Aa	21,6 Aa
<i>Folhas Verdes (n°)</i>	9 Ab	9 Ab	11 Aa	10,5 Aab	12 Aa	7 Bb	7 Bb	8,5 Bab	8,5 Bab	10 Ba
<i>Entrenós (n°)</i>	15 Aab	13 Ab	16,5 Aa	16 Aa	16 Aa	15 Ab	14,5 Ab	17 Aab	18 Aa	17 Aab
30 dias após recuperação										
<i>Altura (cm)</i>	89,3 Aa	88,3 Aa	90,5 Aa	89,8 Aa	102,5 Aa	78,5 Ab	63,3 Bc	65,8 Bc	83,8 Aa	85 Ba
<i>Diâmetro (mm)</i>	26,5 Aa	24,8 Aa	24,2 Aa	28,1 Aa	27,8 Aa	24,5 Aa	23,5 Aa	24,3 Aa	24,5 Aa	24,4 Aa
<i>Folhas Verdes (n°)</i>	10 Abc	9,5 Ac	12 Aab	11 Abc	13 Aa	9 Ab	9 Ab	10 Aab	10,5 Aab	12 Aa
<i>Entrenós (n°)</i>	17 Abc	15 Ac	20 Aa	18 Bab	18 Aab	17 Abc	16 Ac	19 Aab	21 Aa	19,5 Aab

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100% e 30%) na comparação dos clones; Letras minúsculas indicam diferença estatística entre clones (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$). N=10.

Em relação aos dados de biomassa, as plantas que estavam sob condição hídrica ideal apresentaram diferenças expressivas entre si, sendo que os somaclones SP09 e SP10 exibiram maiores valores de biomassa de folha, bainha, raiz e também maior área foliar total (Tabela 7). Apenas o somaclone SP06 apresentou valor de massa seca de bainha inferior aos demais. É importante salientar que os somaclones SP09 e SP10 que ficaram sob restrição hídrica obtiveram os maiores valores de biomassa em todos os parâmetros avaliados, se aproximando dos valores obtidos pelas plantas clonais SP05, SP06 e Controle que estavam sob condições hídricas ideais durante todo experimento (Tabela 7).

Tabela 7– Valores médios de massa seca foliar (MsF), massa seca da bainha (MsB), massa seca de raiz (MsR), e área foliar total (AFT) para plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada avaliados o final do experimento (30 dias após a reidratação das plantas).

Cultivar		SP80-3280			
Tratamento		100%			
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
<i>MsF (g)</i>	60 Ab	63,2 Ab	57 Ab	70 Aa	76 Aa
<i>MsB (g)</i>	86 Ab	90 Ab	81 Ac	104 Aa	108 Aa
<i>MsR (g)</i>	231,6 Ab	259 Ab	295 Aa	300 Aa	321,5 Aa
<i>AFT (cm²)</i>	2099,8 Ab	1898 Ab	2621,5 Aa	2617,5 Aa	2606,8 Aa
Tratamento		30%			
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
<i>MsF (g)</i>	48 Bb	37 Bb	29,5 Bc	55 Ba	53 Ba
<i>MsB (g)</i>	55,5 Bc	59 Bb	51 Bb	82 Ba	78 Ba
<i>MsR (g)</i>	146,5 Bc	193,5 Bb	205,5 Bb	225 Ba	234 Ba
<i>AFT (cm²)</i>	1262,3 Bb	1161,5 Bb	1267 Bb	1514 Ba	1972 Ba

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100% e 30%) na comparação dos clones; Letras minúsculas indicam diferença estatística entre clones (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.4 Discussão

Vários estudos demonstraram que a variação somaclonal pode ser utilizada para a melhoria de características agronômicas em cana-de-açúcar e em outras culturas agrícolas (LIU; CHEN, 1974, 1978; LAT; LANTIN, 1976; KARP; MADDOCK, 1984; ADKINS *et al.*, 1990; ADKINS *et al.*, 1995). Como as variações

genéticas são traduzidas em características fisiológicas e morfológicas, o entendimento amplo sobre os parâmetros fisiológicos em diferentes genótipos, singularmente em termos de relações hídricas e trocas gasosas, auxilia na seleção de plantas tolerantes à seca (ENDRES *et al.*, 2010). Como a cana-de-açúcar, ao ser submetida à deficiência hídrica, exibe alterações morfofisiológicas, como redução do potencial de água foliar, fechamento parcial/total dos estômatos, redução da transpiração foliar e da fotossíntese (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; DAPANAGE; BHAT, 2018). Neste trabalho buscou-se avaliar a resposta de genótipos originados de cultura de tecidos por embriogênese somática a este estresse ambiental para verificar possíveis variantes potencialmente úteis para o melhoramento ou uso direto como cultivar.

O potencial de água foliar ($-\Psi$), que pode ser considerado um indicador do estado hídrico da planta, é afetado pela redução na disponibilidade de água no solo (BERGONCI *et al.*, 2000; KORIR *et al.*, 2006; BAYOUMI *et al.*, 2008; ENDRES *et al.*, 2010). Ennahli e Earl (2005) e Vieira *et al.* (2014) observaram uma relação linear entre conteúdo relativo de água nas folhas (CRA) e potencial de água foliar ($-\Psi$), quando as plantas estão sob regimes de restrição hídrica leve, moderado e severo. Os resultados de potencial de água foliar ($-\Psi$) obtidos em todos os genótipos aqui analisados corroboram com os encontrados por Graça *et al.* (2010) em um estudo realizado com cultivares de cana-de-açúcar, onde foi observado redução no potencial de água foliar ($-\Psi$) quando em plantas sob deficiência hídrica. Também, Pincelli (2010) apresentou dados confirmando que genótipos tolerantes conseguem manter seu potencial de água foliar ($-\Psi$) em níveis maiores do que os genótipos suscetíveis diante do mesmo regime de deficiência hídrica.

O déficit hídrico afeta a fisiologia da cana-de-açúcar, principalmente os parâmetros que tem relação com a taxa de fotossíntese foliar, condutância estomática e a eficiência fotoquímica (FSII) (SILVA *et al.*, 2007, 2011, 2012; SANTOS *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2010; KHONGHINTAISONG, 2018). A condutância estomática em cana-de-açúcar é controlada pelo sistema radicular, com o envolvimento de sinalização química (SMITH *et al.*, 1999), sendo o fechamento estomático uma das primeiras respostas de defesa contra perda de água e possuindo uma correlação positiva com potencial e conteúdo de água foliar (Ψ , CRA), conteúdo de clorofila (índice SPAD), eficiência fotoquímica (F_v/F_m) e pigmentos fotossintéticos (SANTOS *et al.*, 2015). Os resultados observados em

todos os genótipos usados neste trabalho confirmam o comportamento já observado em plantas de cana-de-açúcar, que apresentaram fechamento estomático como forma de impedir a desidratação excessiva das folhas e, conseqüentemente, ocasionando o declínio da fotossíntese líquida (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005; INMAN-BAMBER *et al.*, 2008).

Outro aspecto importante observado em todos os genótipos foi a redução na transpiração foliar (E) em condição de déficit hídrico, possivelmente como consequência direta da diminuição da condutância estomática, que, de acordo com Machado *et al.* (2009), é uma estratégia interessante em resposta à falta de água. Estes resultados se assemelham aos relatados por Smit e Singels (2006), que constataram redução na condutância estomática em cultivares de cana-de-açúcar sul-africanas (N22 e NCo376) em condições de déficit hídrico. Ao encontro a estes resultados, Gonçalves *et al.* (2010) também verificaram a diminuição de trocas gasosas (A, Gs e E) em plantas submetidas à restrição hídrica no decorrer do crescimento vegetativo inicial.

Especificamente, analisando as respostas de cada genótipo ao déficit hídrico, os somaclones SP06, SP09 e SP10 apresentaram melhor desempenho quanto a assimilação líquida de CO₂. Como neste trabalho, outros autores também demonstraram a possibilidade de detectar plantas mais tolerantes à deficiência hídrica analisando parâmetros fisiológicos de somaclones de cana-de-açúcar (WAGIH *et al.*, 2004; BEGUM *et al.*, 2011; NAHEED *et al.*, 2017).

Os prejuízos advindos do déficit hídrico podem ser detectados em diversas variáveis biométricas após a cessação do estresse, como na altura, no número, peso e diâmetro dos colmos, bem como na redução do número de folhas verdes (SILVA *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2010). Esses efeitos causados pelo déficit hídrico podem estar associados ao processo de expansão celular que necessita de condições hídricas adequadas para a divisão e alongamento celular (PÁEZ *et al.*, 1995). Como esperado, nas condições aplicadas neste trabalho, o déficit hídrico afetou negativamente os parâmetros biométricos em todos os genótipos, sendo que resultados similares foram observados por Machado *et al.* (2009), com o cultivar IAC96-2042 sob restrição hídrica que apresentou grande redução na altura das plantas. Gonçalves (2008) ainda observou redução de até 35,9% na altura de plantas de diferentes cultivares de cana-de-açúcar em condições de deficiência hídrica. Neste trabalho, os somaclones SP09 e SP10, apesar de apresentarem

redução média de 50% em altura durante o período de déficit hídrico, se destacaram no período de reidratação, reestabelecendo seu crescimento e apresentando recuperação em altura, número de folhas verdes e número de entrenós.

Ainda, o déficit hídrico pode ocasionar redução no número de perfilhos e área foliar, resultando em menor biomassa tanto a radicular como da parte área (ZHAO *et al.*, 2010; JANGPROMMA *et al.*, 2012). Gonçalves (2008) verificou em plantas de cana-de-açúcar redução de 55,6% da área foliar no tratamento de limitação hídrica em comparação com o controle, dados esses que apoiam os encontrados neste trabalho, onde o déficit hídrico acarretou reduções médias de 40% na área foliar total, sendo que a redução de área foliar foi menor nos somaclones SP09 e SP10.

Considerando os parâmetros biométricos após 30 dias da cessação do déficit hídrico, foi observado que os somaclones SP06, SP09 e SP10 apresentaram melhor potencial de recuperação, com destaque para altura das plantas. Além desta característica, variantes somaclonais apresentando variações positivas para o diâmetro, comprimento e massa dos colmos (LAT; LANTIN, 1976), número, volume e densidade de colmos (LIU; CHEN, 1974, 1978; LAT; LANTIN, 1976; MANCHANDA *et al.*, 2018) já foram anteriormente observados.

Os dados obtidos aqui mostram que os somaclones SP06, SP09 e SP10 apresentaram melhor capacidade de recuperação fotossintética após a reidratação e isso pode estar relacionado a sua capacidade e eficiência na captação de recursos hídricos. Em condições de deficiência hídrica foi demonstrado que ocorre aumento do sistema radicular da cana-de-açúcar, sendo que esse aumento foi maior quando houve redução do conteúdo de água superficial do solo (INMAN-BAMBER *et al.*, 2003; JONGRUNGKLANGA *et al.*, 2013). Plantas que apresentam sistema radicular com grande porte e raízes mais profundas no solo, demonstram melhores respostas na extração de nutrientes e na capacidade de absorção de água (WOOD; WOOD 1967; JONGRUNGKLANG *et al.*, 2011; INMAN-BAMBER *et al.*, 2012). Nesse sentido, os dados aqui obtidos demonstram que os somaclones SP06, SP09 e SP10 obtiveram maior biomassa do sistema radicular tanto em condições hídricas ideais (100%), como sob deficiência hídrica, o que pode ter fornecido melhor suporte às trocas gasosas. O desempenho elevado encontrado no desenvolvimento do sistema radicular em condições de seca foi demonstrado em vários cultivares de cana-de-açúcar que apresentaram tolerância à seca (SMITH *et al.*, 2005).

As variações na resposta ao déficit hídrico apresentadas pelas variantes somaclonais analisadas neste trabalho indicam que esta ferramenta biotecnológica é útil para a obtenção de plantas com melhor resposta agrônômica a este estresse abiótico. Entretanto, ainda há debates sobre se esta variabilidade obtida em plantas oriundas de cultivo *in vitro*, classificada com variação somaclonal (LARKIN; SCOWCROFT, 1981; EVANS; SHARP, 1986; MANCHANDA *et al.*, 2018), é o resultado da diferenciação genética preexistente nas células somáticas ou induzida pelos procedimentos de cultura de tecidos (mutações ou epigenética), ou provavelmente a combinação das duas acima (SKIRVIN; JANICK, 1976; LÖRZ; SCOWCROFT, 1983; KARP, 1991; KAEPLER *et al.*, 2000; D'ALESSIO; SZYF, 2006; BHOJWANI; DANTU, 2013; CHEN *et al.*, 2013). Independentemente de sua origem, conforme aqui demonstrado, a variação somaclonal pode ser aproveitada em cana-de-açúcar, podendo ser herdada em progênie sexual ou clonal, como mostram as experiências anteriores bem-sucedidas nesta importante espécie agrícola (LARKIN; SCOWCROFT, 1983; RAMOS *et al.*, 1996).

3.5 Conclusão

Os somaclones SP09 e SP10 obtidos *in vitro*, apresentaram melhores respostas para a tolerância ao déficit hídrico nas avaliações realizadas em casa-de-vegetação considerando os parâmetros fisiológicos e biométricos quando comparado às demais plantas avaliadas.

Portanto, a obtenção de somaclones por embriogênese somática mostrou-se uma ferramenta biotecnológica útil no intuito de obter plantas mais tolerantes ao déficit hídrico, com potencial agrônômico para serem utilizadas como cultivares comerciais. Contudo, há necessidade de novas avaliações em condições de campo a fim de obter dados de resposta a este estresse abiótico em condições de cultivo predominantes, mas também em relação a outras características agrônômicas como produtividade, rendimento de açúcar (ATR), entre outras.

4 CAPÍTULO 2: Resposta transgeracional ao déficit hídrico em cana-de-açúcar

RESUMO

Há evidências de que plantas submetidas a tipos diferentes e subsequentes de estresses podem responder de forma mais rápida e efetiva quando expostas a um futuro estresse. Nesse sentido, as respostas fisiológicas mediante à deficiência hídrica em cultivares de cana-de-açúcar que vivenciaram exposição a eventos de estresse anteriores é relevante no contexto da busca de novas tecnologias de manejo da cultura. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se condições de restrição hídrica afetam o desempenho fisiológico de cana-de-açúcar submetidos à deficiência hídrica na geração clonal subsequente. Para tal, plantas somaclones do cultivar SP80-3280 regenerados a partir de calos embriogênicos foram resubmetidos à deficiência hídrica na 2ª geração clonal. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x5, sendo dois regimes hídricos, 100% e 30% da reposição diária de água evapotranspirada e cinco genótipos (somaclones SP05, SP06, SP09 e SP10, e plantas controle propagadas vegetativamente por gemas axilares). A parcela experimental foi constituída de vasos plásticos contendo 14,0 kg de solo com uma planta por vaso, para cada tratamento utilizou-se dez repetições. O déficit hídrico foi iniciado aos 120 dias após plantio e durante este período foram realizadas avaliações biométricas e fisiológicas nas plantas. Após 30 dias sob deficiência hídrica as plantas foram reidratadas e as avaliações realizadas novamente. Os genótipos do cultivar SP80-3280 que vivenciaram a situação de estresse hídrico na geração anterior apresentaram maior tolerância a deficiência hídrica quando expostas novamente a essa esta situação, indicando a indução de mudanças fenotípicas adaptativas (“stress memory”), provavelmente através de mecanismos epigenéticos. Assim, é possível concluir que o déficit hídrico aplicado na primeira geração clonal de plantas de cana-de-açúcar atuou como um processo de preparo prévio (“plant priming”), aumentando o potencial adaptativo das plantas na geração subsequente.

Palavras-chave: Deficiência hídrica, Memória do estresse, Somaclones.

ABSTRACT

There is evidence that plants undergoing different and successive stresses can respond more quickly and effectively when exposed to an ensuing stress. In this sense, physiological responses to water deficiency in sugarcane cultivars that experienced exposure to previous stress events is relevant in searching for new crop management technologies. Therefore, the objective of this work was to evaluate if water restriction conditions affect the physiological performance of sugarcane plants submitted to water deficit in subsequent clonal generation. For this purpose, plants of four somaclones of the cultivar SP80-3280 regenerated from embryogenic calluses were resubmitted to water deficit in the 2nd clonal generation. The experimental design was completely randomized in the 2x5 factorial scheme, with two water regimes, 100% and 30% of the daily replenishment of evapotranspirated water and five genotypes (somaclones SP05, SP06, SP09 and SP10, and control plants propagated by axillary buds). The experimental plot consisted of plastic pots containing 14.0 kg of soil with one plant per pot, ten treatments were used for each treatment. The water deficit was started at 120 days after planting and during this period the biometric and physiological evaluations were performed in the plants. After 30 days under water deficit the plants were rehydrated and then reanalyzed. The genotypes of the cultivar SP80-3280 that experienced the water stress situation in the previous generation presented greater tolerance to water deficit when exposed again to this stress, indicating the induction of phenotypic changes (“stress memory”), probably through epigenetic mechanisms. Thus, it is possible to conclude that the water deficit applied in the first clonal generation of sugarcane plants acted as a plant priming process, increasing the adaptive potential of the plants in the subsequent generation.

Keywords: Water deficit, Stress memory, Somaclones.

4.1 Introdução

As plantas consideradas tolerantes à seca, normalmente são reconhecidas pela capacidade de redução do metabolismo a fim de construir respostas que, a partir de alguma alteração morfofisiológica, seja capaz de superar a condição de estresse (SOUZA; LUTTGE, 2015).

Alguns estudos com cana-de-açúcar relatam alta variação genotípica entre cultivares sob restrição hídrica (BASNAYAKE *et al.*, 2012; JANGPROMMA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2013; SALES *et al.*, 2013; KHUEYCHAI *et al.*, 2015). A maioria dos estudos realizados avaliam apenas as respostas morfológicas ou fisiológicas em plantas sob déficit hídrico e isto não esclarece como a cultura da cana-de-açúcar consegue manter seu crescimento em situações de limitação hídrica (RAMESH, 2000; MACHADO *et al.*, 2009). A conexão entre planta e ambiente é o que governa suas respostas fisiológicas e morfológicas perante as variações ambientais, e essa capacidade de perceber e reagir às perturbações gera alterações de fenótipo, que é chamada de plasticidade fenotípica (MATESANZ *et al.*, 2010; VALLADARES *et al.*, 2006). As plantas possuem a capacidade de aclimação perante a um estresse abiótico (BRUCE *et al.*, 2007; LAMBERS *et al.*, 2008), a partir de sua plasticidade fenotípica em resposta a mudanças ambientais (AUBIN-HORTH; RENN, 2009). A plasticidade fenotípica pode dar a planta a condição de ter respostas mais ágeis visando proteção ao estresse recorrente (WALTER, 2010).

Diversas evidências mostram que plantas submetidas a tipos diferentes de estresse e subsequente podem responder de forma mais rápida e efetiva quando exposta a um futuro estresse (RAMÍREZ *et al.*, 2015; WALTER *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014). O preparo de uma planta para enfrentar um estresse futuro é conhecido como “*priming*” e é um processo usado para desenvolver plantas com melhor capacidade para lidar com estresses (BRUCE *et al.*, 2007; CONRATH 2011). Este fenômeno está relacionado com efeito de memória do estresse (“*stress memory*”), que envolve diversas alterações que podem ser transcricionais, pós-transcricionais e/ou devido a mecanismos epigenéticos (KINOSHITA; SEKI, 2014). Estas alterações podem ocorrer em qualquer período do ciclo de vida de uma planta (MUNNÉ-BOSCH; ALEGRE, 2013; RAMÍREZ *et al.*, 2015).

O processo denominado “*plant priming*”, ocorre quando uma planta é exposta a um estresse biótico/abiótico visando prepará-la para uma exposição futura a este estresse (BRUCE *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2012; CHEN; ARORA, 2012; LI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015). O processo de “*priming*” induz respostas de memória que podem persistir em gerações sucessivas à original (CHINNUSAMY; ZHU, 2009; CHEN; ARORA, 2012). Respostas diferenciais mediante ao mesmo tipo de estresse é o que traduz o conceito de memória do estresse dado pelo termo em inglês “*stress memory*” (AVRAMOVA, 2015), sendo que alguns estudos tiveram como foco explorar os mecanismos envolvidos em “*plant priming*” e “*stress memory*”, em busca de plantas mais tolerantes à seca (POLLE *et al.*, 1996; TAHKOKO *et al.*, 2007; KREYLING *et al.*, 2010; WALTER *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015; RAMÍREZ *et al.*, 2015; SHUKLA *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015).

Diante do exposto, torna-se relevante a compreensão dos mecanismos fisiológicos de plantas de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica em duas gerações clonais subsequentes, visando desenvolver novas tecnologias de manejo da cultura baseadas nos conceitos de “*plant priming*” e “*stress memory*”.

4.2 Material e Métodos

Foram usadas neste estudo plantas de 4 somaclones de cana-de-açúcar cv. SP80-3280 (SP05, SP06, SP09, SP10) obtidos através de embriogênese somática usando como fontes de explantes tecido meristemático apical conforme descrito por Maniero (2015), e plantas dessa mesma cultivar obtidas através de propagação vegetativa natural por toletes (genótipo “controle”).

As plantas foram então mantidas em condições de casa-de-vegetação durante todo o período experimental (6 meses) em vasos de 12L contendo 14 kg de solo tipo Argissolo Vermelho-Amarelo eutrófico. O solo foi corrigido 30 dias antes do plantio segundo as recomendações de Vitti (2008), a fim de atender necessidades nutricionais da cultura apontadas em análise química previamente realizada.

O ambiente foi monitorado diariamente por um sistema HOBO (modelo H08-004-02, EUA) de coleta automática de temperatura, luz e umidade. Durante este período foi realizado acompanhamento das plantas e os parâmetros fisiológicos

foram avaliados durante o período de restrição hídrica e reidratação das plantas, conforme descrito abaixo.

As plantas foram submetidas a dois regimes hídricos, caracterizados por reposição de 100% (controle) e 30% (déficit) da evapotranspiração diária através do método gravimétrico, sendo feita a reposição diária da água. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação e o experimento foi realizado em arranjo inteiramente casualizado com 10 repetições de cada tratamento. Cada repetição foi constituída apenas por plantas com um colmo originado do perfilho primário, com desbaste permanente dos perfilhos secundários.

O regime de limitação hídrica foi iniciado 120 dias após brotação das mudas, com reposição hídrica realizada diariamente a partir de pesagens dos vasos e reposição da massa de água perdida conforme definido acima. As plantas com restrição hídrica ficaram submetidas a este fator estressante por um período de 30 dias, em seguida foi reestabelecida a quantidade de água adequada (100%), a fim de analisar a capacidade de recuperação fisiológica das plantas.

Ao final do experimento, 30 dias após a reidratação, foi realizada a avaliação do rendimento de biomassa, analisando a massa seca total (*MST*), massa seca foliar (*MSF*), massa seca do colmo (*MSC*), massa seca da raiz (*MSR*) e a área foliar total por planta (*AFT*).

4.2.1 Descrição do modelo experimental

- **Experimento – Deficiência hídrica na 2ª geração clonal**

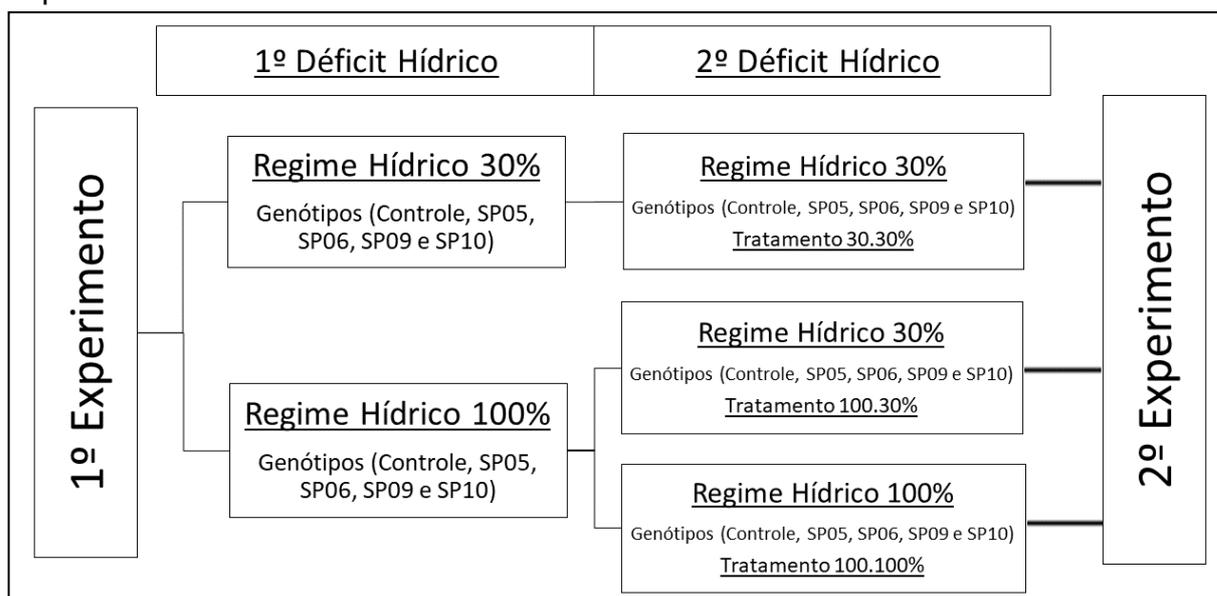
Apenas gemas oriundas de plantas usadas no 1º experimento (somaclones e plantas controle) foram selecionadas a partir de marcação realizada com uma fita colorida no colmo. Essas gemas foram plantadas e submetidas aos regimes hídricos seguindo os mesmos procedimentos já descritos no primeiro capítulo, para estabelecer as condições de déficit hídrico em plantas da primeira geração. Assim, os tratamentos que compõem o segundo experimento são:

- 1- Plantas do regime hídrico 100% (reposição de 100% da *ETc*) que continuaram sendo irrigadas, tratamento este identificado como 100.100%.

2- Plantas do regime hídrico 100% (reposição de 100% da ETc) submetidas à deficiência hídrica (reposição 30% da ETc), tratamento este identificado como 100.30%.

3- Plantas do regime hídrico 30% (reposição 30% da ETc), novamente expostas à deficiência hídrica (reposição 30% da ETc), tratamento este identificado como 30.30%.

Figura 4- Croqui experimental - Fluxograma explicativo da segunda etapa do experimento.



Fonte: O autor.

4.2.2 Parâmetros avaliados

4.2.2.1 Estado hídrico das plantas

O conteúdo relativo de água foliar (CRA) foi avaliado para determinar a porcentagem de água na folha (10cm de tecido foliar por planta de cada repetição). O CRA foi realizado 20 dias após o início do tratamento com déficit hídrico. As análises foram realizadas às 05:00h e às 12:00h. O CRA foi calculado segundo Larcher (2000):

$$\text{CRA} = (\text{Mf} - \text{Ms}) / (\text{Msat} - \text{Ms}) \times 100 (\%)$$

Onde M_f corresponde à massa fresca de discos foliares pesados imediatamente após o seu destacamento e M_{sat} corresponde a massa de discos foliares sob saturação de água, após imersão em água destilada durante 12h. M_s corresponde a massa seca obtida após secagem dos discos foliares em estufa a 60°C até obtenção de massa constante.

Foi determinado o potencial de água foliar ($-\Psi$) às 05:00h (“predawn” $-\Psi_{PD}$) e às 12:00h (“midday” $-\Psi_{MD}$) quando as plantas estavam sob deficiência hídrica aos 8 e 30 dias após o início do déficit hídrico utilizando a câmara de Scholander. O potencial de água foliar medido com a câmara de pressão fornece uma medição de pressão hidrostática negativa que ocorre no xilema de uma planta intacta devido à evaporação de água a partir da transpiração (SCHOLANDER *et al.*, 1965; KIRKHAM, 2005).

4.2.2.2 Extravasamento de membrana (*EM*)

O extravasamento de eletrólitos celulares foi avaliado por condutividade elétrica de uma solução aquosa. Foram coletados 10 discos de folhas extraídos de cada repetição em todos os tratamentos durante o período de restrição hídrica e em seguida foram colocados em um recipiente plástico com 10 mL de água deionizada. Os recipientes com a solução foram tampados e mantidos à temperatura de 25° C por 24 h. Posteriormente, a condutividade do meio foi determinada (X_i) com o auxílio de um medidor portátil de condutividade elétrica (LTLutron, modelo CD-4301).

Posteriormente, os discos na solução foram submetidos a banho-maria a 60 °C por 3h e a condutividade elétrica da solução foi avaliada novamente (X_f). O extravasamento de eletrólitos celulares foi expresso como a porcentagem de condutividade em relação à condutividade total após o aquecimento por 3h a 60 °C [$(X_i/X_f) \times 100$]. Essa técnica permite avaliar a integridade das membranas celulares visto que quanto menor a condutividade elétrica da solução, menor é a quantidade de eletrólitos que extravasam das membranas indicando seu grau de integridade. (SCOTTI CAMPOS; THU PHAM THI, 1997).

4.2.2.3 Medidas das variáveis fotossintéticas

Durante o período de déficit hídrico (120 DAP) foram realizadas medidas de resposta fotossintética (A, E, Gs, Ci). Para essas medidas foram utilizadas as folhas classificadas como +1, que são as primeiras folhas totalmente expandidas de cada planta, consideradas folhas adultas. Estes parâmetros foram analisados após a determinação do estado hídrico das plantas, a fim de que as medidas fossem realmente feitas somente quando as plantas estivessem sob déficit hídrico. Para esta avaliação utilizou-se o analisador de gás por infravermelho (Li-6400XTR, LiCor, EUA), sob irradiação de $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração de CO_2 de 400 ppm.

4.2.2.4 Fluorescência da clorofila a

A avaliação da atividade fotoquímica foi realizada no mesmo momento das medidas fotossintéticas (120 DAP), por meio da análise de fluorescência da clorofila a, utilizando um medidor ótico de fluorescência (FluorPen, FP100, Photo System Instruments). Os parâmetros determinados foram: eficiência quântica potencial (F_v/F_m) e efetiva (F_v'/F_m') do FSII às 05:00h e 12:00h. Calculou-se também a taxa de transporte de elétrons ($ETR = DFFF * \Delta F/F_m' * 0,5 * 0,84$) (BILGUER *et al.*, 1995). Os valores de F_m e F_v indicam, respectivamente, as fluorescências máxima e variável, determinadas após 30 min de adaptação ao escuro. F_m' e F_s são, respectivamente, a fluorescência máxima e no estado de equilíbrio dinâmico na presença de luz e F_0' representa a fluorescência basal após a excitação do FSII. (BILGER; SCHREIBER; BOCK, 1995).

4.2.2.5 Medidas pontuais de recuperação

Após 30 dias do início do déficit hídrico foi realizada a reidratação das plantas de modo a elevar a capacidade de campo para 100%. Após a reidratação foram realizadas avaliações pontuais da fotossíntese (A) e da condutância estomática (Gs) no dia da reidratação, aos três e aos cinco dias após a reidratação. Para esta avaliação utilizou-se o analisador de gás por infravermelho (Li-6400XTR, LiCor, EUA), sob irradiação de $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e concentração de CO_2 de 400 ppm.

4.2.2.6 Avaliação biométrica e produção da biomassa total

Após o transplante das mudas para os vasos de 14,0 kg em casa-de-vegetação, foram realizadas quinzenalmente avaliações biométricas da altura das plantas, diâmetro do colmo, número de folhas verdes e número de entrenós. A altura das plantas foi medida da base (solo) até a bainha da folha totalmente expandida (folha +1) e o diâmetro do colmo foi aferido no terço médio do colmo de cada planta. Ao final do experimento, foi realizado a coleta das plantas para a avaliação do rendimento de biomassa, analisando a massa seca total (*MST*), massa seca foliar (*MSF*), massa seca do colmo (*MSC*), massa seca da raiz (*MSR*) e a área foliar total por planta (*AFT*).

A área foliar total foi medida com um analisador portátil de área foliar (modelo LI-3000A, Li-Cor, USA). Para a quantificação de massa seca foliar (*MSF*), massa seca do colmo (*MSC*) e massa seca da raiz (*MSR*) as amostras foram armazenadas em sacos de papel, identificados e mantidos em estufa sob uma temperatura constante de 70 °C até obtenção de massa constante medida com uma balança de precisão.

4.2.2.7 Índice de plasticidade fenotípica

Os índices de plasticidade fenotípica (IPF), foram calculados a partir dos valores médios para cada parâmetro fisiológico, biométrico e biomassa de acordo com Valladares *et al.* (2006):

$$IPF = (MédiaMax - MédiaMin) / MédiaMax$$

O índice de plasticidade fenotípica (IPF) indica a distância fenotípica entre indivíduos do mesmo genótipo expostos a diferentes ambientes e varia de 0 (sem plasticidade) a 1 (plasticidade máxima).

4.2.3 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$) e ao teste de comparação de médias Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software SISVAR[®] (versão 5.3).

4.3 Resultados

4.3.1 Parâmetros fisiológicos

Após 3 dias do início do déficit hídrico as plantas cultivadas sob regime hídrico 100%.100% mantiveram-se estáveis em relação aos parâmetros de assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs) e concentração interna foliar de CO₂ (Ci), contudo, os somaclones SP09 e SP10 obtiveram respostas significativas ligeiramente superiores aos demais genótipos nos parâmetros citados anteriormente (Tabela 8). Quanto ao potencial de água foliar ($-\Psi_{MD}$), não houve diferenças em todas as plantas neste regime hídrico. No entanto, nas plantas que foram submetidas ao déficit hídrico pela primeira vez (100.30%), foi possível verificar diferenças expressivas em A, E, Gs, Ci e potencial de água foliar, sendo que os somaclones SP06, SP09 e SP10 apresentaram melhores respostas fisiológicas nestes parâmetros (Tabela 8).

A mesma resposta exibida pelas plantas dos somaclones SP09 e S10 no tratamento 100.30% foi confirmada no regime hídrico 30.30%, juntamente com o somaclone SP06. Estes três somaclones demonstraram melhor desempenho fisiológico que os demais em todos os parâmetros avaliados neste tratamento, indicando que a passagem por um prévio evento estressante afeta positivamente as suas respostas fisiológicas a um novo ciclo de restrição hídrica (Tabela 8). Após 3 dias do início do déficit hídrico já ficou evidenciado as melhores respostas tanto dos somaclones como do genótipo controle, sendo que as plantas 30.30% apresentaram valores similares de assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO₂ (Ci) aos observados nas plantas sob o regime hídrico 100%.100% (Tabela 8). Nos dois regimes hídricos com deficiência hídrica (100.30% e 30.30%), os somaclones SP06, SP09 e SP10 se

destacaram positivamente, principalmente com maiores valores nas taxas fotossintéticas.

Tabela 8– Valores médios de assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO₂ (Ci), e potencial de água foliar às 12:00hs ($-\Psi_{MD}$) 3 dias após início do déficit hídrico em plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.

Cultivar	SP80-3280				
3 dias após início do déficit hídrico					
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
100.100%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	22,9 Ab	23,1 Ab	25,3 Bab	27,7 Aa	25,2 Aab
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3,3 Ab	3,4 Ab	3,7 Aab	3,9 Aa	4 Aa
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,21 Ab	0,22 Aab	0,25 Aab	0,32 Aa	0,32 Aa
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	173 Ab	171 Ab	186 Bb	245 Aa	223 Aa
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,5 Aa	0,5 Aa	0,4 Aa	0,4 Aa	0,4 Aa
100.30%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	16,8 Cc	16 Cc	24,1 Ba	20,8 Bb	21,1 Bb
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	2,7 Ba	2,6 Ba	2,9 Ba	3,1 Ba	2,9 Ba
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,19 Ab	0,17 Ab	0,24 Aab	0,30 Aa	0,25 Aab
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	158 Aa	152Aa	169 Ba	172 Ca	162 Ba
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	1,3 Cb	1,2 Cab	1,1 Ca	1,2 Cab	1,1 Ca
30.30%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	20,3 Bb	19,8 Bb	27,9 Aa	27,6 Aa	25,2 Aa
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	2,4 Bb	2,4 Ab	3,7 Aa	3,2 Ba	3,5 Aa
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,19 Ab	0,14 Ab	0,29 Aa	0,27 Aa	0,26 Aa
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	178 Ab	145,6 Ac	206 Aab	214 Ba	222 Ba
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	1 Bb	1 Bb	0,7 Ba	0,8 Ba	0,7 Ba

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100.100%, 100.30% e 30.30%); Letras minúsculas indicam diferença estatística entre genótipos (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Após 5 dias do início do déficit hídrico, as diferenças na assimilação líquida de CO₂, transpiração foliar e condutância estomática mostraram-se ainda maiores entre as plantas do regime hídrico 100.100% em comparação àquelas com déficit hídrico nos regimes 100.30% e 30.30%, evidenciando efeitos da restrição hídrica (Tabela 9). É interessante observar que houve diferenças significativas importantes entre os genótipos no regime 100.30%, sendo que os somaclones SP06, SP09 e

SP10 apresentaram melhor desempenho fotossintético, mostrando que mesmo não tendo vivenciado um estresse anterior conseguiram apresentar boas taxas de fotossíntese e transpiração foliar frente ao estresse hídrico.

Tabela 9– Valores médios de assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO₂ (Ci) 5 dias após início do déficit hídrico em plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.

Cultivar		SP80-3280			
5 dias após início do déficit hídrico					
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
100.100%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	22,6 Ab	26 Aab	24,3 Aab	27,4 Aa	26,2 Aa
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	3,8 Aa	3,2 Ab	3,8 Aa	4 Aa	3,9 Aa
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0,16 Aab	0,13 Ab	0,17 Aab	0,17 Aab	0,18 Aa
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	183 Aa	152 Aa	156 Aa	157 Aa	181 Aa
100.30%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	16,7 Bab	15,4 Cb	19,6 Ba	19,3 Ba	17,3 Bab
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	2,3 Cb	2,2 Bb	2,9 Ba	2,7 Ca	2,7 Ca
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0,12 Ba	0,12 Aa	0,14 Aa	0,14 Aa	0,13 Ca
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	145 Ba	132 Aa	134 Aa	153 Aa	142 Ca
30.30%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	19,4 Ba	19,8 Ba	20,9 Ba	19,9 Ba	20 Ba
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	3,4 Ba	3,2 Aa	3,2 Ba	3,2 Ba	3,5 Ba
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	0,16 Aa	0,14 Aa	0,15 Aa	0,15 Aa	0,15 Ba
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	156 Ba	151 Aa	137 Aa	155 Aa	167 Ba

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100.100%, 100.30% e 30.30%); Letras minúsculas indicam diferença estatística entre genótipos (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação ao período de condições severas de restrição hídrica, após 7 dias sem irrigação, houve diferenças significativas em plantas que experimentaram o estresse pela primeira vez (100.30%), evidenciando uma influência negativa maior da limitação hídrica em todos os parâmetros fisiológicos avaliados (Tabela 10).

Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros fisiológicos entre genótipos dentro do regime 100.100% que estavam em condições hídricas ideais (Tabela 10).

Nas plantas do regime hídrico 30.30%, os efeitos do déficit hídrico sob as taxas de fotossíntese, transpiração foliar e os parâmetros referentes aos fotossistemas (F_v/F_{m12} , $\Delta F/F_{m'}$, ETR) foram menores do que nas plantas do regime hídrico 100.30%, realçando claramente que as plantas que passaram pelo estresse anterior (30.30%), obtiveram maior tolerância ao déficit hídrico, capacidade esta adquirida possivelmente durante o primeiro evento de estresse hídrico (Tabela 10).

Tabela 10– Valores médios de assimilação líquida de CO_2 (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO_2 (Ci), potencial de água foliar às 12:00hs ($-\Psi_{MD}$), eficiência quântica potencial meio dia, eficiência quântica efetiva do FSII (F_v/F_{m12} , $\Delta F/F_{m'}$) e a taxa de transporte de elétrons (ETR), 7 dias após início do déficit hídrico em plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.

Cultivar		SP80-3280			
7 dias após início do déficit hídrico					
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
100.100%					
<i>A</i> ($\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$)	23 Ab	24,5 Aab	25,7 Aa	25 Aab	24,6 Aab
<i>E</i> ($mmol H_2O m^{-2} s^{-1}$)	3,8 Aa	3,8 Aa	3,9 Aa	3,8 Aa	3,9 Aa
<i>Gs</i> ($mmol m^{-2} s^{-1}$)	0,16 Aab	0,15 Aab	0,14 Ab	0,19 Aa	0,16 Aab
<i>Ci</i> ($\mu mol m^{-2} s^{-1}$)	134 Ab	144 Aab	160 Aa	147 Aab	134 Ab
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,5 Aa	0,5 Aa	0,5 Aa	0,4 Aa	0,4 Aa
F_v/F_{m12}	0,70 Aa	0,69 Aa	0,69 Aa	0,68 Aa	0,67 Aa
$\Delta F/F_{m'}$	0,77 Aa	0,78 Aa	0,79 Aa	0,77 Aa	0,75 Aa
ETR	235,20 Aa	231,84 Aa	231,84 Aa	228,48 Aa	225,12 Aa
100.30%					
<i>A</i> ($\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$)	12,9 Cb	16 Ca	14,6 Cab	14,6 Cab	15,3 Cab
<i>E</i> ($mmol H_2O m^{-2} s^{-1}$)	1,5 Cb	1,3 Cb	1,5 Cb	1,9 Ca	1,9 Ba
<i>Gs</i> ($mmol m^{-2} s^{-1}$)	0,10 Ba	0,09 Ba	0,10 Aa	0,09 Ca	0,11 Ba
<i>Ci</i> ($\mu mol m^{-2} s^{-1}$)	109 Bbc	103 Bc	128 Bb	106 Bbc	140 Aa
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	2 Bb	2,2 Cb	2,1 Cab	2 Cb	1,9 Ba
F_v/F_{m12}	0,60 Ca	0,39 Cc	0,52 Cb	0,50 Cb	0,55 Cb
$\Delta F/F_{m'}$	0,66 Bab	0,65 Bb	0,66 Bab	0,69 Ba	0,67 Bab
ETR	201,60 Ca	131,04 Cb	174,72 Ca	168,00 Ca	184,80 Ca
30.30%					
<i>A</i> ($\mu mol CO_2 m^{-2} s^{-1}$)	18 Ba	20 Ba	18,3 Ba	18,5 Ba	19,3 Ba
<i>E</i> ($mmol H_2O m^{-2} s^{-1}$)	2,4 Bab	2,4 Bab	2,5 Ba	2,2 Bab	2,1 Bb

G_s ($mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	0,12 Ba	0,13 Aa	0,13 Aa	0,14 Ba	0,13 Ba
C_i ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	147 Aab	94 Bb	134 Bab	151 Aa	125 Aab
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	2 Ba	1,9 Ba	1,9 Ba	1,8 Ba	1,9 Ba
$F_v/F_{m_{12}}$	0,65 Bb	0,63 Bbc	0,67 Ba	0,68 Ba	0,68 Ba
$\Delta F/F_{m'}$	0,78 Aa	0,77 Aa	0,77 Aa	0,75 Aa	0,78 Aa
ETR	221,76 Ba	211,68 Ba	225,12 Ba	194,88 Aa	201,60 Aa

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100.100%, 100.30% e 30.30%); Letras minúsculas indicam diferença estatística entre genótipos (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Três dias após a reidratação, as plantas do regime hídrico 100.100% demonstraram níveis similares de A , E , G_s , C_i e $-\Psi_{MD}$ (Tabela 11). Todas as plantas submetidas a dois ciclos subsequentes de déficit hídrico (30.30%) obtiveram maior capacidade de recuperação tendo em vista a melhoria de todos os parâmetros fisiológicos analisados (Tabela 11), com destaque para os somaclones SP06, SP09 e SP10 que obtiveram melhores valores de potencial de água foliar e fotossíntese. Em clara oposição a este fato, todos os genótipos que não foram submetidas à limitação hídrica na geração clonal anterior (100.30%) não conseguiram recuperar sua capacidade hídrica foliar após este período, apresentando menores taxas de assimilação líquida de A , E , G_s e C_i (Tabela 11).

Tabela 11– Valores médios de assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO₂ (Ci) e potencial de água foliar às 12:00 h ($-\Psi_{MD}$), 1 dias após reidratação das plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.

Cultivar	SP80-3280				
	1 dia após a recuperação				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
100.100%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	24,8 Aa	23,5 Aab	23,7 Aab	21,8 Bb	24,9 Aa
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	5,2 Aa	4,1 Ab	5,1 Aa	4,7 Aa	5,1 Aa
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,29 Aa	0,30 Aa	0,27 Aa	0,26 Aa	0,28 Aa
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	217 Aa	193 Aab	206 Aa	174 Ab	187 Aab
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,5 Aa	0,4 Aa	0,4 Aa	0,4 Aa	0,4 Aa
100.30%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	18,2 Ca	18,4 Ca	18,7 Ca	19,8 Ca	17,9 Ba
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	2,4 Cb	2,4 Cb	2,6 Cab	3,0 Ca	2,9 Cab
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,12 Bb	0,10 Cb	0,16 Ba	0,14 Bab	0,14 Bab
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	161 Ba	116 Cb	147 Bab	150 Aa	177 Aa
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	1,2 Ca	1,1 Ca	1,1 Ca	1,1 Ca	1,2 Ca
30.30%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	22 Bb	25,2 Aa	26,3 Ba	25,2 Aa	26,6 Aa
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	4,2 Ba	4,2 Aa	4,3 Ba	4,3 Ba	4,3 Ba
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,15 Ba	0,15 Ba	0,17 Ba	0,18 Ba	0,15 Ba
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	136 Ba	151 Ba	149 Ba	153 Aa	138 Ba
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,9 Bb	0,8 Bb	0,7 Ba	0,7 Ba	0,6 Ba

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100.100%, 100.30% e 30.30%); Letras minúsculas indicam diferença estatística entre genótipos (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Subsequentemente, após 5 dias da reposição hídrica ideal no solo para o tratamento de déficit hídrico, as plantas dos somaclones SP06, SP09 e SP10 no regime hídrico totalmente irrigado (100.100%), exibiram melhores respostas fotossintéticas e de transpiração foliar em comparação aos demais genótipos (Tabela 12). É importante ressaltar que mesmo após 5 dias de reidratação as plantas de todos os genótipos do regime 100.30% não recuperaram totalmente a capacidade de assimilação líquida de CO₂ (A), enquanto que as plantas do regime 30.30% apresentaram valores assimilação líquida de CO₂ (A) similares aos das plantas que se mantiveram completamente irrigadas (100.100%) durante todo o experimento (Tabela 12).

Tabela 12– Valores médios de assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO₂ (Ci), 3 dias após reidratação das plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evaporotranspirada.

Cultivar	SP80-3280				
3 dias após a recuperação					
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
100.100%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	23,6 Ac	25,1 Abc	29 Aa	26,3 Ab	27,5 Ab
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	4,0 Ab	4,0 Ab	3,7 Ab	4,7 Aa	4,7 Aa
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,18 Ba	0,14 Aa	0,17 Aa	0,20 Aa	0,16 Aa
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	152 Aa	117 Bb	155 Aa	162 Aa	158 Aa
100.30%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	20,6 Ba	19,5 Ca	20,4 Ca	19,5 Ca	20,1 Ca
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3,3 Bbc	3,1 Bc	3,2 Bc	3,7 Bb	4,0 Ba
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,14 Ba	0,13 Aa	0,18 Aa	0,16 Aa	0,18 Aa
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	116 Bb	119 Bb	164 Aa	151 Aa	159 Aa
30.30%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	22,2 Aa	22,2 Ba	22,3 Ba	23,4 Aa	22,1 Ba
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3,2 Bb	3,1 Bb	4,1 Ba	3,9 Ba	3,8 Ba
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,35 Aa	0,14 Ab	0,24 Aab	0,19 Aab	0,15 Ab
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	113 Bb	153 Aa	175 Aa	157 Aa	173 Aa

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100.100%, 100.30% e 30.30%); Letras minúsculas indicam diferença estatística entre genótipos (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

A recuperação fisiológica das plantas somente foi observada após 7 dias de reidratação, quando o potencial de água foliar mostrou-se equilibrado nas plantas de todos os genótipos em todos os tratamentos (Tabela 13). O somaclone SP10 apresentou melhores respostas em parâmetros fisiológicos (A, E, Ci) avaliados dentre os genótipos do tratamento que esteve totalmente irrigado (100.100%) (Tabela 13). Nos regimes 100.30% e 30.30% os somaclones SP06, SP09 e SP10 apresentaram as melhores respostas em praticamente todos os parâmetros fisiológicos avaliados (Tabela 13).

Tabela 13– Valores médios de assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO₂ (Ci), e potencial de água foliar às 12:00 hs ($-\Psi_{MD}$) 5 dias após reidratação das plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.

Cultivar	SP80-3280				
	5 dias após recuperação				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
100.100%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	25,7 Ab	26 Ab	26 Ab	25,5 Ab	29,3 Aa
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	4,5 Ac	5,2 Aab	4,9 Ab	4,8 Ab	5,4 Aa
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,20 Ab	0,27 Aa	0,20 Ab	0,19 Ab	0,29 Aa
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	137 Ab	209 Aa	155 Ab	158 Bb	213 Aa
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,5 Aa	0,5 Aa	0,5 Aa	0,4 Aa	0,5 Aa
100.30%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	24,7 Aab	24,1 Ba	24,8 Aab	25,4 Aab	26,3 Ba
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3,9 Bb	4,0 Bb	4,9 Ba	4,7 Aa	4,6 Ba
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,13 Bb	0,14 Bb	0,20 Aa	0,18 Aa	0,17 Bab
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	142 Ab	150 Bb	151 Ab	186 Aa	147 Bb
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,4 Aa	0,4 Aa	0,4 Aa	0,5 Aa	0,5 Aa
30.30%					
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	25,7 Aa	24,5 Ba	24,8 Aa	26,3 Aa	28,1 Aa
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	3,8 Bb	3,9 Bb	4,5 Ba	4,5 Aa	4,4 Ba
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,13 Bb	0,13 Bb	0,19 Aa	0,22 Aa	0,21 Ba
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	126 Ab	121 Cb	143 Aab	155 Ba	123 Ca
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,5 Aa	0,4 Aa	0,4 Aa	0,4 Aa	0,5 Aa

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100.100%, 100.30% e 30.30%); Letras minúsculas indicam diferença estatística entre genótipos (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.2 Avaliações biométricas e biomassa

As plantas dos somaclones SP06, SP09 e SP10 mantidas com suplemento ideal de água (100.100%) apresentaram maiores biomassas de raiz e folha, o que contribuiu para um acúmulo maior de massa total dessas plantas ao final do experimento (Tabela 14).

As plantas sob regime hídrico 100.30% foram fortemente afetadas pelos efeitos da deficiência hídrica aplicada neste experimento, o que resultou em diminuição dos valores de massa seca de folha, colmo e raiz (MS_F , MS_C , MS_R); porém estes efeitos foram mais acentuados nos genótipos Controle e SP05 do que nos SP06, SP09 e SP10 que apresentaram maiores valores em todos os parâmetros de biomassa analisados (Tabela 14). Contudo, todas as plantas no regime 30.30%

apresentaram resultados equivalentes aos observados nas plantas do regime hídrico (100.100%) e superiores quando comparadas com as plantas do tratamento 100.30% para as variáveis MS_F , MS_C e MS_R , com destaque a este último (Tabela 14).

É nítido o impacto decorrente da deficiência hídrica na área foliar total (AFT) de todas as plantas do tratamento 100.30%, com destaque negativo para os genótipos SP05 e Controle. Comparado ao tratamento 100.100%, é notória a redução da área foliar total neste regime hídrico dos somaclones SP06, SP09 e SP10 (média de 50%), sendo esta redução ainda maior nas plantas dos genótipos SP05 e Controle (65%). Por outro lado, as plantas no regime de irrigação 30.30% tiveram somente uma redução de média de 20% para os somaclones SP06, SP09, SP10 e 35% para SP05 e Controle (Tabela 14).

Em relação a razão raiz/parte aérea (R/PA), os resultados relevantes ficaram restritos aos somaclones SP09 e SP10, que apresentaram valores muito próximos das plantas do regime hidratado (100.100%).

Tabela 14– Valores médios de massa seca foliar (MS_F), massa seca do colmo (MS_C), massa seca de raiz (MS_R), massa seca total (MS_T), a razão entre raiz e parte aérea (R/PA) e área foliar total (AFT) das plantas submetidas a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.

Cultivar		SP80-3280				
		100.100%				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	
MS_F (g)	35,0 Ac	35,3 Ac	51,3 Aa	43,6 Aab	42,8 Abc	
MS_C (g)	198 Aa	192 Aa	226 Aa	210 Aa	198 Aa	
MS_R (g)	80,3 Bc	92,6 Bbc	124,7 Aab	140,6 Aa	150,8 Aa	
MS_T (g)	313,3 Ab	319,9 Bb	401,9 Aa	404,9 Aa	381 Aa	
R/PA	0,36 Bb	0,41 Bab	0,46 Bab	0,58 Aa	0,59 Aa	
AFT (cm^2)	2539,75 Aa	2503,75 Aa	2712,5 Aa	2617,5 Aa	2856,75 Aa	
Tratamento		100.30%				
MS_F (g)	27,4 Bb	28,6 Aab	30,8 Cab	36,1 Ba	33,7 Bab	
MS_C (g)	74,5 Bb	94,5 Bb	96 Bb	150,5 Ba	155,5 Ba	
MS_R (g)	57 Bb	60,5 Cb	87,5 Bab	89 Bab	93 Ba	
MS_T (g)	158,9 b	183,6 Cb	214,3 Cb	284,6 Ba	273,1 Ba	
R/PA	0,56 Aa	0,50 Ba	0,69 Aa	0,48 Ba	0,48 Ba	
AFT (cm^2)	1079,75 Ca	1071,5 Ca	1270,75 Ca	1247,25 Ca	1214,75 Ca	
Tratamento		30.30%				
MS_F (g)	34,5 Aab	33,4 Ab	42,1 Ba	42,9 Aa	40,8 Aab	
MS_C (g)	163 Ab	197 Aa	192,5 Aa	194,5 Aa	197,5 Aa	
MS_R (g)	107 Ab	104,5 Ab	117,8 Aa	121,3 Aa	133,2 Aa	
MS_T (g)	305,5 Ab	325,9 Ab	352,3 Bab	358,6 Aab	371,5 Aa	
R/PA	0,58 Aa	0,62 Aa	0,5 Ba	0,52 Aa	0,56 Aa	
AFT (cm^2)	1632,5 Bb	1672,25 Bb	2047,25 Ba	2039,25 Ba	2050,0 Ba	

Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre os regimes hídricos (100.100%, 100.30% e 30.30%); Letras minúsculas indicam diferença estatística entre genótipos (Controle, SP05, SP06, SP09, SP10) dentro de cada regime hídrico. Teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.3 Índice de plasticidade fenotípica

Para a realização do cálculo do índice de plasticidade fenotípica (IPF) foram utilizados os dados obtidos na análise de variância, sendo os valores de média máxima referentes às plantas do regime hídrico totalmente irrigado (100.100%) e as médias mínimas são advindas das plantas que estavam sob déficit hídrico (100.30% e 30.30%).

Para os parâmetros fisiológicos, independentemente do genótipo, os índices de plasticidade fenotípica foram menores em todas as plantas que foram submetidas a deficiência hídrica pela segunda vez (30.30%) em comparação com as plantas que

vivenciaram o déficit hídrico pela primeira vez (100.30%) (Tabela 15). Nesta última condição, onde as plantas experienciaram a deficiência hídrica pela primeira vez, os maiores índices de plasticidade fenotípica em todos genótipos foram encontrados nos parâmetros de potencial de água foliar ($-\Psi_{MD}$), transpiração foliar (E) e condutância estomática (G_s), que são fatores intrinsecamente ligados ao estado hídrico das plantas (Tabela 15).

Em todos os genótipos no tratamento 30.30%, o IPF mais elevado foi observado aos 7 dias após início do déficit hídrico e 1 dia após a reidratação, para o parâmetro de potencial de água foliar e condutância estomática (Tabela 15). No entanto, em todos os outros parâmetros avaliados nestes períodos citados acima, os índices de plasticidade fenotípica mantiveram-se próximos de zero. É importante ressaltar que as plantas neste regime hídrico já haviam superado um evento de estresse na primeira geração, o que pode ter influenciado as respostas plásticas dos parâmetros fisiológicos. Portanto, para essas plantas (30.30%) não foi observado níveis elevados de alteração do fenótipo em relação aos parâmetros fisiológicos; no entanto, em contraste ao citado para as plantas 30.30%, as respostas de plasticidade fenotípica das plantas 100.30% revelou altos índices em parâmetros fisiológicos importantes (A , E , G_s , $-\Psi_{MD}$) durante o período de déficit hídrico.

Tabela 15– Índice de plasticidade fenotípica referente a assimilação líquida de CO₂ (A), transpiração foliar (E), condutância estomática (Gs), concentração interna foliar de CO₂ (Ci), e potencial de água foliar às 12:00 h ($-\Psi_{MD}$), para a variedade SP80-3280 submetida a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada. 3, 7 dias após início do déficit hídrico e 1 dias após reidratação das plantas.

Cultivar	SP80-3280									
Genótipos	Índice de plasticidade fenotípica									
	100.30%					30.30%				
	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
3 dias após déficit hídrico										
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,27	0,31	0,05	0,25	0,16	0,11	0,14	0,09	0,00	0,00
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,18	0,24	0,22	0,21	0,28	0,27	0,29	0,00	0,18	0,13
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,06	0,20	0,05	0,06	0,22	0,06	0,35	0,15	0,16	0,19
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,09	0,11	0,09	0,30	0,27	0,03	0,15	0,10	0,13	0,00
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,62	0,58	0,64	0,67	0,64	0,50	0,50	0,43	0,50	0,43
7 dias após déficit hídrico										
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,44	0,35	0,43	0,42	0,38	0,22	0,18	0,29	0,26	0,22
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,61	0,66	0,62	0,50	0,51	0,37	0,37	0,36	0,42	0,46
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,34	0,39	0,26	0,49	0,28	0,26	0,10	0,06	0,25	0,19
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,19	0,28	0,20	0,28	0,04	0,09	0,35	0,16	0,03	0,07
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,75	0,77	0,76	0,80	0,79	0,75	0,74	0,74	0,78	0,79
Fv/Fm ₁₂	0,01	0,04	0,04	0,09	0,03	0,01	0,01	0,03	0,04	0,04
$\Delta F/Fm'$	0,14	0,43	0,25	0,26	0,18	0,09	0,38	0,22	0,14	0,08
1 dia após recuperação										
<i>A</i> ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,27	0,22	0,21	0,09	0,28	0,11	0,07	0,10	0,13	0,06
<i>E</i> ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,54	0,41	0,49	0,36	0,43	0,19	0,02	0,16	0,09	0,16
<i>Gs</i> ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,59	0,65	0,41	0,46	0,49	0,49	0,48	0,38	0,31	0,47
<i>Ci</i> ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	0,26	0,40	0,29	0,14	0,05	0,37	0,22	0,28	0,12	0,26
$-\Psi_{MD}$ (MPa)	0,58	0,64	0,64	0,64	0,67	0,44	0,50	0,43	0,43	0,33

Em relação aos índices de plasticidade fenotípica relacionados ao acúmulo de biomassa, é possível observar que todos os genótipos no tratamento 30.30% apresentaram valores maiores no IPF de massa seca de colmo e raiz (MSc, MS_R) e, conseqüentemente, de massa seca total (MS_T) (Tabela 16). Essa resposta mais plástica, principalmente em biomassa do sistema radicular, tem relação direta com a

manutenção do estado hídrico dessas plantas e deu suporte a outros parâmetros fisiológicos (A, E Gs).

No regime 100.30%, todos os genótipos apresentaram baixa plasticidade fenotípica em relação aos parâmetros de biomassa analisados, com rara exceção para os genótipos SP05 e Controle que apresentaram valores de plasticidade fenotípica equivalente às plantas do tratamento 30.30% para massa seca de raiz, mas que isoladamente não contribuiu efetivamente para um melhor desempenho fisiológico dessas plantas.

Tabela 16– Índice de plasticidade fenotípica referente a massa seca foliar (MsF), massa seca do colmo (MsC), massa seca de raiz (MsR), massa seca total (MsT), a razão entre raiz e parte aérea (R/PA) e área foliar total (AFT) para a variedade SP80-3280 submetida a 100% e 30% de reposição de água evapotranspirada.

Cultivar	SP80-3280									
	Índice de plasticidade fenotípica									
	100.30%					30.30%				
Genótipos	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10	Controle	SP05	SP06	SP09	SP10
MS_F (g)	0,01	0,05	0,18	0,02	0,05	0,22	0,19	0,40	0,17	0,21
MS_C (g)	0,18	0,03	0,15	0,07	0,00	0,62	0,51	0,58	0,28	0,21
MS_R (g)	0,31	0,36	0,06	0,14	0,12	0,29	0,35	0,30	0,37	0,38
MS_T (g)	0,01	0,16	0,12	0,11	0,02	0,49	0,43	0,47	0,30	0,28
R/PA	0,38	0,06	0,08	0,10	0,05	0,36	0,18	0,33	0,17	0,19
AFT (cm ²)	0,36	0,02	0,25	0,22	0,28	0,57	0,57	0,53	0,52	0,57

4.4 Discussão

A manutenção da condição hídrica foliar durante eventos de estresse hídrico é um importante indicativo de plantas tolerantes à limitação de água (JAMAUX *et al.*, 1997; ALTINKUT *et al.*, 2001; COLOM; VAZZANA 2003; LAWLOR; TEZARA, 2009; SILVA *et al.*, 2011; CIA *et al.*, 2012). Plantas que são capazes de manter ou apresentar menor redução no conteúdo de água foliar demonstram uma capacidade crucial para preservar suas funções fisiológicas (GORAI *et al.*, 2010). Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a importância da condição hídrica foliar para

tolerância ao déficit hídrico em cana-de-açúcar, sendo que os somaclones SP06, SP09 e SP10 no tratamento (30.30%) obtiveram redução de apenas 50% de seu potencial de água foliar após 3 dias do início do déficit hídrico, enquanto todos os genótipos do tratamento 100.30% apresentaram redução média de 90% no mesmo período.

Estudos relataram que reduções severas na eficiência quântica do PSII (F_v/F_m), com valores abaixo de 0,75 são encontrados em cultivares sensíveis ao déficit hídrico e estresse salino (BOLHÀR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989; CHA-UM; KIRDMANEE 2009; GRAÇA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014). Portanto, o parâmetro que considera a razão F_v/F_m é um relevante fator para identificar cultivares que possam ser tolerantes ao estresse hídrico (BOLHÀR-NORDENKAMPF *et al.*, 1989; SANTOS *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2011). A eficiência quântica do fotossistema II possui correlação direta com assimilação de carbono, contribuindo com a atividade fotossintética foliar (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Portanto, os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os anteriormente descritos, pois os somaclones SP06, SP09 e SP10 do tratamento 30.30% obtiveram melhores respostas de eficiência quântica efetiva (F_v/F_{m12}) do fotossistema, parâmetro este que dá suporte ao aparato fotoquímico. A partir de dados fotoquímicos em condições hídricas de extrema limitação, evidenciou-se que plantas de cana-de-açúcar com maior eficiência fotoquímica possui melhor desempenho na dissipação do excesso de energia gerado no FSII, evitando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MÜLLER *et al.*, 2001; VILELA, 2017).

Ainda, os somaclones SP06, SP09 e SP10 do tratamento denominado 30.30% apresentam maior tolerância ao déficit hídrico, mantendo sua condição hídrica até 5 dias após o início do déficit hídrico, indicando que essa característica positiva tenha sido adquirida através da experiência de estresse em um ciclo anterior, denominado “*stress memory*” (BRUCE *et al.*, 2007; CONRATH 2011; CHEN *et al.*, 2012; CHEN; ARORA 2012; LI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015). Os valores dos parâmetros fisiológicos obtidos ao avaliar as plantas submetidas a um segundo evento de deficiência hídrica (30.30%) confirmam as diversas evidências que afirmam que plantas submetidas a tipos diferentes estresses de maneira subsequente podem responder de forma mais rápida e efetiva quando exposta a um futuro estresse (RAMÍREZ *et al.*, 2015; WALTER *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014). Essa capacidade adquirida de aclimação faz com que plantas possam

apresentar melhores respostas quando o evento de estresse é recorrente (SCHEFFER *et al.*, 2001; BRUCE *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2015). Outros estudos recentes concentraram seus esforços no entendimento dos mecanismos presentes nos processos de “*plant priming*” e “*stress memory*”, na qual plantas apresentam melhores respostas perante eventos estressantes e deletérios (POLLE *et al.*, 1996; TAHKOKORPI *et al.*, 2007; KREYLING *et al.*, 2010; WALTER *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015; RAMÍREZ *et al.*, 2015; SHUKLA *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015).

O déficit hídrico conduz a alta senescência foliar, afetando a área foliar, diminuindo a produtividade de colmos e concomitantemente reduz o rendimento da biomassa total das plantas de cana-de-açúcar (SMIT; SINGELS, 2006; PINCELLI; SILVA, 2012). De acordo com Smit e Singels (2006), a limitação da expansão foliar pode ser considerada um critério de defesa da planta contra a falta de água, sendo que um dos primeiros efeitos da deficiência hídrica na planta é o decréscimo no turgor celular que afeta a alongação das células e influencia negativamente a área foliar das plantas, variável extremamente importante pela sua estreita conexão com estado hídrico da planta e a capacidade fotossintética. No tratamento (30.30%), os soma clones SP06, SP09 e SP10 apresentaram comparativamente maior área foliar total após déficit hídrico. Portanto, os dados obtidos na avaliação de biomassa das plantas reforçam a observação que, dependendo do genótipo, plantas oriundas de material propagado de plantas que vivenciaram uma situação hídrica adversa anteriormente podem apresentar uma melhor capacidade de resposta ao déficit hídrico, principalmente no que tange a área foliar total e a massa seca do sistema radicular e que foram menos afetadas pela restrição hídrica.

Como já relatado, há uma ampliação do sistema radicular de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em condições de deficiência hídrica, (INMAN-BAMBER *et al.*, 2003; JONGRUNGKLANGA *et al.*, 2013). Sistemas radiculares com maior densidade e profundidade apresentam melhor aporte hídrico e nutricional as plantas de cana (WOOD; WOOD, 1967; SMITH *et al.*, 2005; LACLAU; LACLAU, 2009; JONGRUNGKLANG *et al.*, 2011; INMAN-BAMBER *et al.*, 2012). O maior acúmulo de biomassa sob déficit hídrico em cana-de-açúcar foi associado a maior plasticidade fenotípica, pois melhor regulação das trocas gasosas determinou maior plasticidade fisiológica (MARCHIORI *et al.*, 2017). Neste trabalho, os soma clones SP06, SP09 e SP10 que passaram pelo tratamento 30.30% apresentaram maior sistema radicular

mediante submissão às condições de déficit hídrico aqui aplicadas, fato que não ocorreu com àquelas submetidas a esse estresse pela primeira vez (tratamento 100.30%).

Alterações genéticas, fisiológicas e possíveis adaptações ao longo de seu processo evolutivo, podem elevar os níveis de plasticidade fenotípica (ZHANG *et al.*, 2013). A plasticidade fenotípica pode conferir a planta uma condição de apresentar respostas mais rápidas visando se proteger do estresse recorrente (VALLADARES *et al.*, 2007; WALTER, 2010), e é uma ferramenta utilizada para analisar a aclimação das plantas às variações ambientais (NICOTRA *et al.*, 2010). Nesse sentido, sugere-se que a capacidade de uma planta em notar e lidar com as variações ambientais apresentando respostas morfofisiológicas e alterando seu fenótipo são determinadas pela sua plasticidade fenotípica (VALLADARES *et al.*, 2006; PIGLIUCCI; MURREN; SCHLICHTING, 2006; MATESANZ *et al.*, 2010). Portanto, plantas com maior capacidade de aclimação mediante um estresse abiótico podem apresentar melhores respostas a partir de sua plasticidade fenotípica (MUNNE-BOSCH; ALEGRE, 2000; JIANG *et al.*, 2005; BRUCE *et al.*, 2007; LAMBERS *et al.*, 2008; AUBIN-HORTH; RENN, 2009). Segundo Hahn, Kleunen e Schärer (2012), espécies poliploides como a cana-de-açúcar, apresentam altos níveis de plasticidade fenotípica, sendo mais adaptadas e resistentes a fatores abióticos. Plantas desse tipo apresentam um genoma plástico, possuindo mecanismos regulatórios capazes de mediar variações prejudiciais, permitindo o surgimento de novos fenótipos estimulados por adaptações e estímulos ambientais (SONG; CHEN, 2015). No entanto, nem sempre alta plasticidade é sinônimo de vantagem adaptativa (COUSO; FERNÁNDEZ, 2012). No caso dos parâmetros fisiológicos analisados nos genótipos usados neste trabalho, foram observados índices de plasticidade fenotípica (IPF) menores em todas plantas que foram originárias das submetidas à deficiência hídrica na geração clonal anterior (30.30%), em comparação com as plantas que vivenciaram o déficit hídrico pela primeira vez (100.30%) (Tabela 19). Portanto, isso indica que plantas submetidas pela primeira vez um déficit hídrico (regime 100.30%) tendem a apresentar respostas fisiológicas mais plásticas, a fim de tentar superar a limitação hídrica.

Estudos relataram aclimação diferencial a vários modelos de estresse que podem afetar o metabolismo das plantas (DING *et al.*, 2012; BYUN *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2016). Assim, a resposta plástica observada, principalmente

em massa de raiz, nas plantas submetidas ao tratamento 30.30%, pode ter fornecido melhor suporte na manutenção do hídrico dessas plantas, que se manteve sempre superior no que se refere aos parâmetros fisiológicos durante o déficit hídrico em comparação as plantas 100.30%.

No contexto do trabalho aqui desenvolvido, plantas expostas previamente à alguma situação estressante desenvolveram um tipo diferente de aclimatação, denominado efeito de memória do estresse (*“stress memory”*), que pode potencializar as respostas defensivas das plantas quando submetidas ao estresse novamente (BRUCE *et al.*, 2007; IWASAKI; PASZKOWSKI, 2014; FLETA-SORIANO; MUNNÉ-BOSCH, 2016; AVRAMOVA, 2015). Algumas respostas positivas apresentadas por plantas submetidas a um déficit hídrico, incluindo os índices de plasticidade fenotípica, podem ser afetadas pelo processo conhecido como *“plant priming”*, que acontece quando uma planta é exposta a um estresse biótico/abiótico visando prepará-la para uma possível exposição futura ao mesmo evento estressante (CHEN *et al.*, 2012; CHEN; ARORA, 2012; BRUCE *et al.*, 2007). Estudos anteriores mostram que essa exposição anterior ao estresse favorece a planta em respostas posteriores durante seu ciclo de vida (RAMÍREZ *et al.*, 2015; MUNNÉ-BOSCH; ALEGRE, 2013; LI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015) e isso inclui o efeito de memória (*“stress memory”*) que também pode ser mediada por proteínas, fatores de transcrição, modificações epigenéticas e alterações fisiológicas (CHINNUSAMY; ZHU, 2009; CHEN; ARORA, 2012; KINOSHITA; SEKI, 2014; BRUCE *et al.*, 2007; CONRATH, 2011).

Neste caso a condição estressante (déficit hídrico) foi aplicada em uma geração clonal anterior e o mesmo estresse foi replicado em plantas que vivenciaram e não vivenciaram o fator estressante. Mesmo neste caso, que se diferencia de mecanismos de memória experienciados durante o mesmo ciclo biológico da planta, ficou evidente pelos parâmetros fisiológicos como potencial de água foliar, pelo acúmulo de biomassa e maior área foliar que alguns genótipos testados (SP06, SP09 e SP10) apresentaram um mecanismo fisiológico adquirido durante a primeira passagem por condições de deficiência hídrica (30.30%) que as prepara para superar o déficit hídrico de maneira mais efetiva do que as plantas que são submetidas ao estresse pela primeira vez (100.30%). Resultados similares foram obtidos por (MARCOS *et al.*, 2018) em plantas de cana-de-açúcar sob ciclos recorrentes de déficit hídrico aplicados em gerações subsequentes, no qual plantas

expostas previamente ao déficit hídrico responderam com mais eficiência na geração seguinte.

4.5 Conclusão

As evidências do efeito de memória do estresse (*“stress memory”*) são confirmadas neste trabalho, onde os somaclones SP06, SP09 e SP10 que passaram por deficiência hídrica subsequente apresentaram melhores respostas fisiológicas e de biomassa perante os efeitos negativos do estresse, demonstrando que ao serem submetidas ao primeiro evento estressante adquiriram através de mecanismos regulatórios internos algum tipo de preparo para enfrentar o evento de estresse no futuro.

Avaliações futuras são necessárias com os somaclones SP06, SP09 e SP10, afim de investigar quais os mecanismos fisiológicos estão por trás das respostas positivas mediante o estresse.

REFERÊNCIAS

- AGEITEC. **Árvore do Conhecimento Cana-de-açúcar**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_42_1110200717570.html. Acesso em: abril 2015.
- ALTINKUT, A.; KAZAN, K.; IPEKCI, Z.; GOZUKIRMIZI, N. Tolerance to paraquat is correlated with the traits associated with water stress tolerance in segregating F2 populations of barley and wheat. **Euphytica**, v. 121, p. 81–86. 2001
- ARRUDA, P. Perspective of the sugarcane industry in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 3-8, 2011.
- AUBIN-HORTH, N.; RENN, S.C.P. Genomic reaction norms: using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 3763–3780, 2009.
- AVRAMOVA, Z. Transcriptional ‘memory’ of a stress; transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress response genes. **Plant Journal**, v. 83, p. 149–59, 2015.
- BARBOSA, A. M.; GUIDORIZI, K. A.; CATUCHI, T. A.; MARQUES, T. A.; RIBEIRO R. V.; SOUZA G.M. Biomass and bioenergy partitioning of sugarcane plants under water deficit. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 1-8, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1887-7>
- BAILEY, R.A.; BECHET, G.R.A. Comparison of seedcane derived from tissue culture in sugarcane with conventional seedcane. **Proc. South African Sugar Tech Ass.**, v. 63, p. 125–129, 1989.
- BAIRU, M.W.; AREMU, A.O.; STADEN, J.V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p.147–173, 2011.
- BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry II**. Somaclonal variation in crop improvement. Berlin: Springer, 1990. p. 3–35.
- BAMBANG, S. Biotechnology of Drought-Tolerant Sugarcane, Sugarcane, Alexandre Bosco de Oliveira, **Intech Open**. 2017. DOI: 10.5772/intechopen.72436
- BOUHARMONT, J. Application of somaclonal variation and in vitro selection to plant improvement. **Acta Hort.** v. 355, p. 213–218, 1994.
- BOWER. R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, v. 2, n. 3, p. 409-416, 1992. DOI: 10.1111/j.1365-313x.1992.00409.x.
- BRAR, D.S.; JAIN, S.M. **Somaclonal variation**: mechanism and applications in crop improvement. Netherlands: Springer, 1998. p. 15-37.

BRAUN, A. A demonstration of the recovery of the crown gall tumor cell with the use of complex tumors of single cell origin. **Prae Natl Aead Sei USA**, v. 45, p. 932-938, 1959.

BARBOSA, M.H.P.; RESENDE, M.D.; SILVEIRA, L.C.I.; PETERNELLI, L.A. Estratégias de melhoramento genético da cana-de-açúcar em universidades. In: SIMPÓSIO SOBRE SELEÇÃO RECORRENTE, 9., Lavras. **Anais [...]**. Lavras: UFLA, 2005. p.43-57.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Crit. Rev. Plant Science**, v. 24, p. 23–58, 2005. doi: 10.1080/07352680590910410.

BASNAYAKE, J.; JACKSON, P. A.; INMAN-BAMBER, N. G.; LAKSHMANAN, P. Sugarcane for water-limited environments genetic variation in cane yield and sugar content in response to water stress. **Journal Experimental Botany**, v. 63, p. 6023–6033, 2012. doi: 10.1093/jxb/ers251.

BAYOUMI, T. Y.; EID, M. H.; METWALI, E. M. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 2341–2352, 2008.

BERGONCI, J. I. *et al.* Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 8, p. 1531-1540, ago. 2000.

BHOJWAN, S. S.; DANTU, P. K. Plant tissue culture: an introductory text. **Springer**, p. 141-154, 2013.

BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, v. 102, p. 425-432, jun. 1995.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P.; BAKER, N.R. Chlorophyll fluorescence as probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrument. **Functional Ecology**, v. 3, p. 497–514, 1989.

BONNETT, G.D. Developmental stages (phenology). In: MOORE, P. H.; BOTHA, F. C. **Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology**. United States: John Wiley and Sons Iowa, 2013. p. 35-54.

BONNETT, G.D.; HEWITT, M.L.; GLASSOP, D. Effects of high temperature on the growth and composition of sugarcane internodes. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 57, p. 1087-1095, 2006.

BOWER, R.; BIRCH, R.G. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. **The Plant Journal**, v. 2, n. 3, p. 409-416, 1992.

BRADSHAW, A.D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advantage Genetics**, v.13, p. 1115-115, 1965.

BRUCE, T.J.A.; MATTHES, M.C.; NAPIER, J.A.; PICKETT, J.A. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, p. 603–608, 2007.

BURNER, D.M.; GRISHAM, M.P. Induction and stability of phenotypic variation in sugarcane as affected by propagation procedure. **Crop Science**, v. 35, p. 875–880, 1995.

CAIEIRO, J.T.; PANOBIANCO, M.; BESPALHOK FILHO, J.C.; OHLSON, O.C. Physical purity and germination of sugarcane seeds (Caryopses) (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 140-145, 2010.

CARRARI, F.; NUNES-NESI, A.; GIBON, Y.; LYTOVCHENKO, A.; LOUREIRO, M.E.; FERNIE, A.R. Reduced expression of aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1322-1335, 2003.

CARVALHO, A.L.D.; MENEZES, R.S.; NÓBREGA, A.D.S.; PINTO, J.P.H.B.; OMETTO, C.; GIAROLLA, A. Impact of climate changes on potential sugarcane yield in Pernambuco, northeastern region of Brazil. **Renewable Energy**, 2015.

CASAGRANDE, A. A.; VASCONCELOS, C. M. Fisiologia da parte aérea. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G.A. (Eds.). **Cana-de-açúcar**. 1. ed. Campinas: Instituto Agronômico. 2008. v. 1, p. 57-78.

CHANDEL, A. *et al.*, Use of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) as biomaterial for cell immobilization and modulated ethanol production by thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS 3. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2404-2410, 2009.

CHEN, Q. *et al.* Research of total levels on DNA methylation in plant based on HPLC analysis. **American Journal of Molecular Biology**, v.3, n.2. p. 98-101, apr. 2013.

CHEN, H.; ZHENG, X.; LI, J.; ZHANG, J.; XU, X. Response of sugarcane chlorophyll fluorescence parameters and spectral reflectance to water stress in elongation. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTER DISTRIBUTED CONTROL AND INTELLIGENT ENVIRONMENTAL MONITORING (CDCIEM). **Proceedings** [...], Hunan, China: Changsha, 2011. p. 981–984.

CHEN, K. A. R. Priming memory invokes seed stress-tolerance. **Environmental Experimental Botany**, v. 94, p. 33–45, 2012.

CHEN, K.; FESSEHAIE, A.; ARORA, R. Selection of reference genes for normalizing gene expression during seed priming and germination using qPCR in *Zea mays* and *Spinacia oleracea*. **Plant Molecular Biology Reports**, v. 30, p.478–87, 2012.

CHEN, W.H.; CHEN, T.M.; FU, Y.M. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 7–13, 1998.

CURRAIS, L.; LOUREIRO, J.; SANTOS, C.; CANHOTO, J.M. Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 114, p. 149–159, 2013.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J-K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current Opinion Plant Biology**, v. 12, p. 133–9, 2009.

CIA, M.C.; A.C.R. GUIMARÃES, L.O.; MEDICI, S.M.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, v. 161, p. 313–324, 2012.

CIAIS, P.; REICHSTEIN, M.; VIOVY, N.; GRANIER, A.; OGÉE, J.; ALLARD, V. Europe-wide reduction in primary productivity caused by the heat and drought in. **Nature**, v. 437, p. 529–533, 2005. doi: 10.1038/nature03972.

COLOM, M. R.; VAZZANA, C. Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought sensitive weeping lovegrass plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 135–144, 2003.

CONAB. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: abril. 2018.

CONRATH, U. Molecular aspects of defense priming. **Trends Plant Science**, v. 16, p. 524–31, 2011.

COUSO, L.L.; FERNÁNDEZ, R.J. Phenotypic plasticity as an index of drought tolerance in three Patagonian steppe grasses. **Annals of Botany**, Oxford, v. 110, p. 849-857, 2012.

CRISP, P. A. C.; DIEP, G.; STEVEN, R. E.; JUSTIN, O. B.; BARRY, J. P. Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. **Science Advantage**, v. 2, 2016.

CTNBio. 2018. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/inicio>. Acesso em: abril. 2018.

D'ALESSIO, A. C.; SZYF, M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. **Biochemistry Cell Biology**, v. 84, p. 463-76, 2006.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution in sugarcane. In: HEINZ, D. J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7-84.

DAPANAGE, M.; BHAT, S. Physiological responses of commercial sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) varieties to moisture deficit stress tolerance. **Indian Journal Plant Physiology**, v. 23, n. 40, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40502-017-0328-6>.

SOUZA, A.P.; GASPAR, M.; SILVA, E.A.; ULIAN, E.C.; WACLAWOVSKY, A.J.; NISHIYAMA, M.Y.JR.; SANTOS, R.T.M.M.; SOUZA, G.; BUCKERIDGE, M.S. Elevated CO₂ increases photosynthesis, biomass and productivity, and modifies

gene expression in sugarcane. **Plant Cell and Environment**, v. 31, p. 1116–1127, 2008.

SANTOS, C.M.; SILVA, M.A.; LIMA, G.P.P. *et al.* Physiological Changes Associated with Antioxidant Enzymes in Response to Sugarcane Tolerance to Water Deficit and Rehydration. **Sugar Tech.**, v. 17, p. 291, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12355-014-0325-2>.

ENDRES, L. *et al.* Photosynthesis and water relations in brazilian sugarcane. The Open **Agriculture Journal**, Bussum, v. 4, p. 31-37, jan. 2010.

EFTEKHARI, M.; ALIZADEH, M.; MASHAYEKHI, K. In vitro propagation of four Iranian grape varieties: influence of genotype and pretreatment with arbuscular mycorrhiza. **Vitis**, v. 51, p. 175–182, 2012.

FERREIRA, T.H.S.; TSUNADA, M.S.; BASSI, D.; ARAÚJO, P.; MATTIELLO, L.; GUIDELLI, G.V.; RIGHETTO, G.L.; GONÇALVES, V.R.; LAKSHMANAN, P.; MENOSSI, M. Sugarcane Water Stress Tolerance Mechanisms and Its Implications on Developing Biotechnology Solutions. **Frontier Plant Science**, 2017.

GRAÇA, J.; RODRIGUES, F.; FARIAS, J.; OLIVEIRA, MD.; HOFFMANN-CAMPO, C.; ZINGARETTI, S. Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. **Brazilian Society Plant Physiology**, n.22, p. 189–197, 2010. doi: 10.1590/S1677-04202010000300006.

GENG, Y; GAO, L; YANG, J. Epigenetic flexibility underlying phenotypic plasticity. **Progress in Botany**, v. 74, p. 153-163, 2013.

GONÇALVES, E. R. **Fotossíntese, osmorregulação e crescimento inicial de quatro variedades de cana-de-açúcar submetida à deficiência hídrica**. 2008. 66 f. Dissertação 584 Variáveis morfológicas da cana-de-açúcar... Irriga, Botucatu, v. 19, n.4, p. 573-584, outubro-dezembro, 2014 (Mestrado em Agronomia/Produção Vegetal) - Universidade Federal do Alagoas, Rio Largo, 2008.

GONÇALVES, E. R.; FERREIRA, V. M.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; BARBOSA, T. P.; DUARTE, W. G. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v. 14, n. 4, p. 378-386, 2010.

GORAI, M.; HACHEF, A.; NEFFATI, M. Differential responses in growth and water relationship of *Medicago sativa* (L.) cv. Gabe`s and *Astragalus gombiformis* (Pom.) under water-limited conditions. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 1, p. 01–12, 2010.

HAHN, M. A.; VAN KLEUNEN, M., MULLER-SCHARER, H. Increased Phenotypic Plasticity to Climate May Have Boosted the Invasion Success of Polyploid *Centaurea stoebe*. **PLOS ONE**, v. 7, 2012.

HITCHCOCK, A.S. Type species of the first 100 genera of Linnaeus "Species Plantarum". **Botanical Society of America**, v. 10, n. 9, p. 510-514, nov. 1923.

HENDRE, R.R.; IYER, R.S.; KOTWAL, M. Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture. **Sugar cane**, v. 1, p. 5–8, 1983.

HOY, J.W.; BISCHOFF, K.P.; MILLIGAN, S.B.; GRAVOIS KA. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. **Euphytica**, v. 129, n. 2, p. 237-240, 2003.

HEINZ, D.J. Sugarcane improvement through induced mutations using vegetative propagules and cell culture techniques. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Induced mutations in vegetatively propagated plants. **Proceedings [...]**. Vienna, 1973. p. 53–59.

IDEA NEWS. **Características Agronômicas mais Marcantes das Principais Variedades de Cana da Região Centro-Sul**. ano 5, n. 41, fev. 2004. Disponível em: <http://www.udop.com.br/index.php?item=caracteristicas>.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 89, p. 85-202, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.01.023>.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 185-202, 2005.

INMAN-BAMBER, N.; LAKSHMANAN, P.; PARK, S. Sugarcane for water limited environments: Theoretical assessment of suitable traits. **Field Crops Res.**, v. 134, p. 95–104, 2012. doi: 10.1016/j.fcr.2012.05.004.

INMAN-BAMBER, N.G.; SMITH, D.M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 92, p. 185–202, 2005.

INMAN-BAMBER, N.G.; BAILLIE, C.; WILLCOX, J.; ATTARD, S.; SPILLMAN, M.F. Increased profitability and water use efficiency through best use of limited water under supplementary irrigation in sugarcane. Final Report for Rural Water Use Efficiency Initiative, Queensland Department of Natural Resources and Mines. CSIRO. **Sustainable Ecosystems**, Townsville, 2003.

INMAN-BAMBER, N.G.; LAKSHMANAN, P.; PARK, S. Sugarcane for water-limited environments: Theoretical assessment of suitable traits. **Field Crops Research**, v. 134, p. 95–104, 2012.

IRVINE, J.E. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture, II. Evidence for vegetative and genetic transmission, epigenetic effects and chimeral disruption. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 26, p. 115-125, 1991.

IRVINE, J.E.; BENDA, G.T.A.; LEGENDRE, B.L.; MACHADO JR., G.R. The frequency of marker changes in sugarcane plants regenerated from callus culture. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 3, p. 201-209, 1984.

JADOSKI, C.J., E.V.B. TOPPA, A. JULIANETTI, T. HULSHOF, E.O. ONO AND J.D. RODRIGUES. Physiology of the development of the vegetative stage of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Pesq. Apl. Agrotec.**, v.3, p. 169-176, 2010.

JAENISCH, R; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33, p. 245–254, 2003.

JAILLAIS, Y.; AND CHORY, J. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. **Nature Structural Molecular Biology**, 17, p. 642–645, 2010. doi: 10.1038/nsmb0610-642.

JAMAUX, I.; STEINMERTZ, A.; BELHASSEN, E. Looking for molecular and physiological markers of osmotic adjustment in sunflower. **New Phytologist.**, v. 137, p. 117–127, 1987.

JANGPROMMA, N.; THAMMASIRIRAK, S.; JAISIL, P.; SONGSRI, P. Effects of drought and recovery from drought stress on above ground and root growth, and water use efficiency in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 6, n. 8, p. 1298-1304, 2012.

JANGPROMMA, N.; SONGSRI, P.; THAMMASIRIRAK, S.; JAISIL, P. Rapid assessment of chlorophyll content in sugarcane using a SPAD chlorophyll meter across different water stress conditions. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9, p. 368–374, 2010.

JANGPROMMA, N.; THAMMASIRIRAK, S.; JAISIL, P.; SONGSRI, P. Effects of drought and recovery from drought stress on above ground and root growth, and water use efficiency in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Australian Journal Crop Science**, v. 6, p. 1298–1304, 2012.

JIANG, C.D.; LI, P.M.; GAO, H.Y.; ZOU, Q.; JIANG, G.M.; LI, L.H. Enhanced photoprotection at the early stages of leaf expansion in field-grown soybean plants. **Plant Science**, v. 168, p. 911–919, 2005.

JONGRUNGKLANG, N.; TOOMSAN, B.; VORASOOT, N.; JOGLOY, S.; BOOTE, K.J.; HOOGENBOOM, G.T.; PATANOTHAI, A. Rooting traits of peanut genotypes with different yield responses to pre-flowering drought stress. **Field Crops Research**, v. 120, p. 262–270, 2011.

JONGRUNGKLANGA, N.; TOOMSANA, B.; VORASOOTA, N.; JOGLOYA, S.; BOOTEB, K.J.; HOOGENBOOMC, G.; PATANOTHAI, A. Drought tolerance mechanisms for yield responses to pre-flowering drought stress of peanut genotypes with different drought tolerant levels. **Field Crops Research**, v. 144, p. 34–42, 2013.

JAIN, S.M. Tissue cultured-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v.118, n.2, p.153-166, 2001. doi: 10.1023/A:1004124519479.

JALAJA, N.C.; NEELAMATHI, D.; SREENIVASAN, T.V. Micropropagation for quality seed production in sugarcane in Asia and the Pacific. New Delhi: Food and

Agriculture Organization of the United Nations, Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology, 2008.

KAEPLER, S.M.; KAEPLER, H.F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 179–188, 2000.

KEVIN, H. D. **Molecular and genetic characterisation of genome stability in genetically engineered sugarcane**. 2012. Thesis (School of Biological Sciences) - The University of Queensland, 2012. Disponível em: <http://espace.library.uq.edu.au>. Acesso em: 26.mai. 2019.

KHATIWADA, D.; LEDUC, S.; SILVEIRA, S.; MCCALLUM, I. Optimizing ethanol and bioelectricity production in sugarcane biorefineries in Brazil. **Renew. Energy**, v. 85, p. 371–386, 2016.

KHONGHINTAISONG, J.; SONGSRI, P.; TOOMSAN, B. *et al.* Rooting and Physiological Trait Responses to Early Drought Stress of Sugarcane Cultivars. **Sugar Tech.**, v. 20, p. 396, 2018. Doi.org/10.1007/s12355-017-0564-0.

KHUEYCHAI, S.; JANGPROMMA, N.; DADUANG, S.; JAISIL, P.; LOMTHAISONG, K.; AND DHIRAVISIT, A. *et al.* Comparative proteomic analysis of leaves, leaf sheaths, and roots of drought-contrasting sugarcane cultivars in response to drought stress. **Acta Physiologiae. Plantarum**, v. 37, p. 88, 2015. doi: 10.1007/s11738-015-1826-7.

KIM, M. S.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 803–807, 2010.

KINOSHITA, T.; SEKI, M. Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. **Plant Cell Physiol.**, v. 55, p. 1859–63, 2014.

KIRKHAM, M.B. Principles of soil and plant water relations. New York: Elsevier, 2005. 500 p

KOOKE, R.; AND KEURENTJES, J. J. B. Multi-dimensional regulation of metabolic networks shaping plant development and performance. **Journal Experimental Botany**, v. 63, p. 3353–3365, 2012. doi: 10.1093/jxb/err373.

KORIR, P.; NYABUNDI, J.; KIMURTO, P. Genotypic response of common bean (*Phaseolus vulgaris*. L). to moisture stress condition in Kenya. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 24–32, 2006.

KREYLING, J.; BEIERKUHNLIN, C.; JENTSCH, A. Effects of soil freeze–thaw cycles differ between experimental plant communities. **Basic Appl. Ecology.**, v. 11, p. 65–75, 2010.

KAEPLER, S.M.; KAEPLER, H.F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 179–188, 2000.

KARP, A. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: VASIL, I.K.; THORPE, T.A. (eds). **Plant cell and tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. P. 139–152.

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, v. 85, p. 295–302, 1995.

KRISHNA, H.; SAIRAM, R.K.; SINGH, S.K. Mango explants browning: effect of ontogenic age: mycorrhization and pre-treatments. **Science Horticulture**, v. 118, p. 132–138, 2008.

KRISHNAMURTHI M, T.J. Fiji disease resistant *Saccharum officinarum* Var. Pindar subclones from tissue culture. **Proceedings - International Society of Sugar Cane Technologists**, v. 15, p. 130-137, 1974.

KRISHNAN SR, M.C. Methods of sugarcane transformation. In: MOHAN, C. (ed) **Sugarcane biotechnology: challenges and prospects**. New York: Springer, 2017. p 51–60.

LACLAU, P.B.; LACLAU, J.P. Growth of the whole root system for a plant crop of sugarcane under rainfed and irrigated environments in Brazil. **Field Crops Research**, v. 114, p. 351–360, 2009.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F.S.; PONS, T.L. **Plant physiological ecology**. 2.nd. New York: Springer, 2008.

LI, X.; CAI, J.; LIU, F.; DAI, T.; CAO, W.; JIANG, D. Cold priming drives the sub-cellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 82, p. 34–43, 2014.

LI, X.; TOPBJERG, H.B.; JIANG, D.; LIU, F. Drought priming at vegetative stage improves the antioxidant capacity and photosynthesis performance of wheat exposed to a short-term low temperature stress at jointing stage. **Plant and Soil**, v. 393, p. 307–18, 2015.

LISBOA, I.P.; CHERUBIN, M.R.; CERRI, C.C.; CERRI, D.G.; CERRI, C.E.; Guidelines for the recovery of sugarcane straw from the field during harvesting. **Biomass Bioenergy**, v. 96, p. 69–74, 2017.

LUNN, J. E. Compartmentation in plant metabolism. **Journal Experimental Botany**, v. 58, p. 35–47, 2007.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.L.P.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant.**, v. 41, n. 4, p. 345-363, 2005. DOI: 10.1079/IVP2005643.

LAL, M.; TIWARI, A.K.; GUPTA, G.N. *et al.*, Commercial scale micropropagation of sugarcane: constraints and remedies. **Sugar Tech.**, v. 17, p. 339–347, 2015.

LARKIN, P.J. Introduction. In: JAIN, S.M.; BRAR, D.S.; AHLOOWALIA, B.S. (eds) **Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. p 3–13.

LARKIN, P.J.; SCOWCROFT, W.R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. **Theory Appl. Genetics**, v. 60, p. 197–214, 1981.

LEE, M.; PHILLIPS, R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation. **Annual Rev Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 413–437, 1988.

LEE, T.S.G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum spp.*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 10, p. 47-55, 1987.

MANCHANDA, P.; KAUR, A.; GOSAL, S.S. Somaclonal Variation for Sugarcane Improvement. DOI: 10.1007/978-3-319-78283-6_9. **Biotechnologies of Crop Improvement.**, v. 1, 2018.

MACHADO, R. S.; RIBEIRO, R. V.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, D. F. S. P.; MACHADO, E. C.; LANDELL, M. G. A. Respostas biométricas e fisiológicas ao déficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1575-1582, 2009.

MAGALHÃES FILHO, J. R.; LANDELL, M. G. A. Revealing drought resistance and productive patterns in sugarcane genotypes by evaluating both physiological responses and stalk yield. **Experimental Agriculture**, v. 49, p. 212–224, 2013. doi: 10.1017/S0014479712001263.

MANHÃES, C. M. C.; GARCIA, R. F.; FRANCELINO, F. M. A.; FRANCELINO, H.O.; COELHO, F. C. Fatores que afetam a brotação e o perfilhamento da cana-de-açúcar. **Vértices**, Campos dos Goytacazes, v. 17, n. 1, p. 163-181, 2015.

MANIERO, R. **Oligossacarídeos de rafinose em cana-de-açúcar: caracterização de genes sob estresse hídrico e abordagens transgênicas**. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2015. 1 CD-ROM.

MARCHIORI, P.E.R.; MACHADO, E.C.; SALES, C.R.G.; ESPINOZA-NÚÑEZ, E.; MAGALHÃES FILHO, J.R.; SOUZA, G.M.; PIRES, R.C.M.; RIBEIRO, R.V. Physiological Plasticity Is Important for Maintaining Sugarcane Growth under Water Deficit. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2148, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.02148.

MARCOS, F.C.C.; SILVEIRA, N.M.; MARCHIORI, P.E.R.; MACHADO, E.C.; SOUZA, G.M.; LANDELL, M.G.A.; RIBEIRO, R.V. Drought tolerance of sugarcane propagules is improved when origin material faces water deficit. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, 2018. e0206716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206716>.

MATESANZ, S.; GIANOLI, E.; VALLADARES, F. Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. **Ann. N. Y. Academy Science**, v. 1206, p. 35–55

2010.doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05704.x.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p. 225-274.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 659–668, 2000.

MENANDRO, L.M.S.; CANTARELLA, H.; FRANCO, H.C.J.; KÖLLN, O.T.; PIMENTA, M.T.B.; SANCHES, G.M.; RABELO, S.C.; CARVALHO, J.L.N. Comprehensive assessment of sugarcane straw: implications for biomass and bioenergy production. **Biofuels Bioprod. Biorefin.**, v. 11, p. 488–504, 2017.

MOLINARI, H.B.; MARUR, C.J.; DAROS, E.; FREITAS DE CAMPOS, M.K.; CARVALHO, J.F.R.P.; BESPALHOK FILHO, J.C.; PEREIRA, L.F.P.; VIEIRA, L.G.E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum spp.*): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, p. 218-229, 2007.

MOORE, P.H. Temporal and spatial regulation of sucrose accumulation in the sugarcane stem. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 22, p. 661-679, 1995.

MÜLLER, P.; LI, X.P.; NIYOGI, K.K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1558–1566, 2001.

MUNNÉ-BOSCH S, A. L. Cross-stress tolerance and stress “memory” in plants: an integrated view. **Environmental Experimental Botany**, n. 94, p. 1–2, 2013.

MUNNE-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. **Planta**, v. 210, p. 925–931, 2000.

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

MAHLANZA, T.; RUTHERFORD, R.S.; SNYMAN, S.J.; WATT, M.P. In vitro generation of somaclonal variant plants of sugarcane for tolerance to *Fusarium sacchari*. **Plant Cell Reports**, v. 32, p. 249–262, 2013.

MAHLANZA, T.; RUTHERFORD, R.S.; SNYMAN, S.J. Methylglyoxal-induced enhancement of somatic embryogenesis and associated metabolic changes in sugarcane (*Saccharum spp. hybrids*). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1513-7>.

MANICKAVASAGAM M, G.A.; ANBAZHAGAN, V.R.; SUDHAKAR, B.; SELVARAJ, N.; VASUDEVAN, A. Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide resistant sugarcane (*Saccharum species hybrids*) using axillary buds. **Plant Cell Reports**, v. 23, p. 134-143, 2004. DOI: 10.1007/s00299-004-0794-y.

MARTINEZ-MONTERO, M.E.; MARTINEZ, J.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of sugarcane somatic embryos. **Cryo Letters**, v. 29, p. 229–242, 2008.

MEHTA, Y.R.; ANGRA, D. C. Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of diploids through wheat x maize hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 3, p. 617-622, 2000.

MENDOZA, E.M.T. Sugarcane biotechnology: Trends and prospects for the Philippine sugar industry. **Philippine Journal of Crop Science**, v. 25, n.2, p. 73-83, 2000.

NAHEED, R.; ARFAN, M.; IJAZ, S.; SHAHBAZ, M. Induction of somaclonal variation in selected drought sensitive genotype of sugarcane (*sachharum officinarum*). **International journal of agriculture and biology**, 2017.

NICOTRA, A.B.; ATKIN, O.K.; BONSER, S.P.; DAVIDSON, A.M.; FINNEGAN, E.J.; MATHESIU, U.; POOT, P.; PURUGGANAN, M.D.; RICHARDS, C.L.; VALLADARES, F.; VAN KLEUNEN, M. Plant phenotypic plasticity in a changing climate. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, p. 1-9, 2010.

NIEVES, N.; MARTINEZ, M.E.; CASTILLO, R.; BLANCO, M.A.; GONZÁLEZ-OLMEDO, J.L. Effect of abscisic acid and jasmonic acid on partial desiccation of encapsulated somatic embryos of sugarcane. **Plant Cell Tissue Organ.**, v. 65, p.15–21, 2001.

NCBI. **Taxonomy**. 2018. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=193079>.

NOGUEIRA, G. A. Produção de mudas de cana-de-açúcar. In: **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006. p. 79-92.

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**, Madison, v. 46, p. 681-687, 2006.

OLIVEIRA, E.C.A.; OLIVEIRA, R.I.; ANDRADE, B.M.T.; FREIRE, F.J.; LIRA-JÚNIOR, M.A.; MACHADO, P.R. Crescimento e acúmulo de matéria seca em variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 9, 2010.

PÁEZ, A. *et al.* Water stress and clipping management effects on guineagrass: I. Growth and biomass allocation. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, p. 698-706, 1995.

PARRY, M. A.; AWKESFORD, M. J. Food security: increasing yield and improving resource use efficiency. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 69, p. 592–600, 2010. doi: 10.1017/S0029665110003836.

PIGLIUCCI, M.; MURREN, C. J.; SCHLICHTING, C. D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p.

2362-2367, 2006.

PINCELLI, R. P. **Tolerância à deficiência hídrica em cultivares de cana-de-açúcar avaliada por meio de variáveis morfofisiológicas**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

PINCELLI, R. P.; SILVA, M. A. Alterações morfológicas foliares em cultivares de cana-de-açúcar em resposta à deficiência hídrica. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 546-556, 2012.

POLLE, A.; KRÖNIGER, W.; RENNENBERG, H. Seasonal fluctuations of scorbaterelated enzymes: acute and delayed effects of late frost in spring on antioxidative systems in needles of Norway Spruce (*Picea abies* L.). **Plant Cell Physiol.**, v. 37, p. 717–725, 1996.

PRABU, G.; KAWAR, P. G.; PAGARIYA, M.C.; PRASAD, D.T. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, p. 291–304, 2011.

PATADE, V.Y.; SUPRASANNA, P. Radiation induced in vitro mutagenesis for sugarcane improvement. **Sugar Tech.**, v. 10, p.14–19, 2008.

PEROS JP, BONNEL E, ROQUES D. Effect of in vitro culture on rust resistance and yield in sugarcane. **Field Crops. Res.**, v. 37, p. 113–119, 1994.

PREDIERI S. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 64, p. 185–210, 2001.

REUVENI, O.; GOLUBOWICZ, S.; ISRAELI, Y. Factors influencing the occurrence of somaclonal variations in micropropagated bananas. **Acta Horticulture**, v. 336, p. 357-364, 1993. DOI: 10.17660/ActaHortic.1993.336.47.

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 Agronomy Crop Science**, v. 185, p. 83–89, 2000. doi: 10.1046/j.1439-037x.2000.00404.x.

RAMÍREZ, D.A.; ROLANDO, J.L.; YACTAYO, W.; MONNEVEUX, P.; MARES, V.; QUIROZ, R. Improving potato drought tolerance through the induction of long-term water stress memory. **Plant Science**, v. 238, p. 26–32, 2015.

RAMPINO, P.; PATALEO, S.; GERARDI, C.; MITA, G.; PERROTTA, C. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. **Plant Cell Environmental**, v. 29, p. 2143–2152, 2006. doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01588.x.

RIBEIRO, R. V.; MACHADO, R. S.; MACHADO, E. C.; MACHADO, D. F. S. P.; RICAUD, C. **Diseases of sugarcane: major diseases**. Elsevier, 2012.

- RICAUD, C.; RYAN, C. C. **Leaf scald in 'Diseases of Sugarcane: Major Diseases'**. 1989. p. 39–53.
- RICO, L. *et al.* Changes in DNA methylation fingerprint of *Quercus ilex* trees in response to experimental field drought simulating projected climate change. **Plant Biology**, v. 16, n. 2, p. 419–427, 2014.
- SAGUINO, A. *et al.* **Controle do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar em toletes de três gemas pelo tratamento térmico em água a 52° C por 30 minutos.** (Relatório CTC). 1996.
- SAGUINO, A. *et al.* Controle do raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 97, jul. 1988.
- SALES, C. R. G.; RIBEIRO, R. V.; SILVEIRA, J. A. G.; MACHADO, E. C.; MARTINS, M. O.; LAGÔA, A. M. M. A. Superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improve the recovery of photosynthesis in sugarcane plants subjected to water deficit and low substrate temperature. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 73, p. 326–336, 2013.
- SALIENDRA, N.Z.; MEINZER, D.F.C. Genotypic, developmental and drought-induced differences in root hydraulic conductance of contrasting sugarcane cultivars. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, p. 1209–1217, 1992.
- SANTOS, C.M.; SILVA, M.A.; LIMA, G.P.; BORTOLHEIRO, F.P.A.P.; BRUNELLI, M.C.; HOLANDA, L.A.; OLIVER, R. Physiological changes associated with antioxidant enzymes in response to sugarcane tolerance to water deficit and rehydration. **Sugar Tech.**, v. 17, p. 291–304, 2015.
- SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e botânica. Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2008. v. 882.
- SCHLICHTING, C. D.; SMITH, H. Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. **Evolutionary Ecology**, v. 16, n. 3, p. 189–221, 2002.
- SCHOLANDER, P.F. *et al.* Sap pressure in vascular plants. **Science**, n. 148, p. 339–346, 1965.
- SCOTTI CAMPOS, P.; THU PHAM THI, A. Effect of abscisic acid pretreatment on membrane leakage and lipid composition of *Vigna unguiculata* leaf discs subjected to osmotic stress. **Plant Science**, v. 130, p. 11–18, 1997.
- SETTA, N. *et al.* Noise or Symphony: Comparative Evolutionary Analysis of Sugarcane Transposable Elements with Other Grasses. In: **Plant Transposable Elements**. Berlin: Springer, 2012. p. 169–192.
- SHUKLA, N.; AWASTHI, R.P.; RAWAT, L.; KUMAR, J. Seed bioprimering with drought tolerant isolates of *Trichoderma harzianum* promote growth and drought tolerance in *Triticum aestivum*. **Ann Appl Biology**, v. 166, p. 171–82, 2015.

SILVA, M. A. *et al.* Agronomic performance of sugarcane families in response to water stress. **Bragantia**, Campinas, v. 67, p. 656-661, 2008.

SILVA, M. A.; SILVA, J. A. G.; ENCISO, J.; SHARMA, V.; JIFON, J. Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. **Scientia Agricola**, v. 65, 2008.

SILVA, P.P.L.; SOARES, J.G.; COSTA, L.D.S.; VIANA, J.C.; ANDRADE, E.R.F.; GONCALVES, J.M.S; VERÍSSIMO, G. Path analysis for selection of drought tolerant sugarcane genotypes through physiological components. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 11–19, 2012.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; DOS SANTOS, C. M.; SHARMA, V. Relationships between physiological traits and productivity of sugarcane in response to water deficit. **Journal of Agricultural Science**, v. 152, p. 104-118, 2014. <https://doi.org/10.1017/S0021859612000834>.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SANTOS, C. M.; JADOSKI, C. J.; SILVA, J. A. Photosynthetic capacity and water use efficiency in sugarcane genotypes subject to water deficit during early growth phase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 735-748, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132013000500004>.

SILVA, M.A.; SILVA, J.A.G.; ENCISO, J.; SHARMA, V.; JIFON, J. Yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 620–627, 2008.

SILVA, M.A.; JIFON, J.L.; SHARMA, V.; SILVA, J.A.G.; CAPUTO, M.M.; DAMAJ, M.B.; GUIMARA, E.R. Use of physiological parameters in screening drought tolerance in sugarcane genotypes. **Sugar Tech.**, v. 13, n. 3, p. 191–197, 2011.

SHEPARD, J. F.; BIDNEY, D.; SHAHIN, E. Potato protoplasts in crop improvement. **Science**, p. 17-24, 1980.

SMI ULLAH, A.; AHMAD, K.; FAROOQ, I.; RAMEEZ, R.; MUHAMMAD, A.; RASHEDA, H.; GHAZANFAR, I.; AMBREEN, W.; ZAFAR, M.; USMAN, L. Detection of somaclonal variation in micropropagated plants of sugarcane and SCMV screening through ELISA. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 4, mar. 2013.

SILVA, M.D.A.; JIFON, J.L.; SILVA, J.A.G.; 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.

SINGELS, A.; DONALDSON, R.A.; SMIT, M.A. Improving biomass production and partitioning in sugarcane: theory and practice. **Field Crops Research**, v. 92, p. 291-303, 2005.

SMIT, M. A.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 98, p. 91-97, 2006.

SMIT, M.; SINGELS, A. The response of sugarcane canopy development to water stress. **Field Crops Research**, v. 98, p. 91–97, 2006. doi: 10.1016/j.fcr.2005.12.009.

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

SOBHAKUMARI V. P. Assessment of somaclonal variation in sugarcane. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 15303-15309, oct. 2012.

SONG, Q.; CHEN, Z. J. Epigenetic and developmental regulation in plant polyploids. **Current Opinion Plant Biology**, v. 24, p. 101-109, 2015.

SOUZA, G. M.; LUTTGE, U. Stability as a phenomenon emergent from plasticity – complexity – diversity in ecophysiology. **Prog. Botany.**, v. 76, p. 211–239, 2015. doi: 10.1007/978-3-319-08807-5_9.

STAB. **Manual de Variedades**. 2012. Disponível em: http://www.stab.org.br/II_usuario_variedades/01_Sebastiao_APRESENTACAO_VARIEDADE_CANA_RIBEIRAO_PRETO.pdf. 2012.

SUCEST. **Sugarcane Functional Genomics Database**. Last Updated on Monday, 25 February 2013 17:57. Disponível em: <http://www.sucest-fun.org/>. 2013.

SWEETLOVE, L. J.; FERNIE, A. R. The spatial organization of metabolism within the plant cell. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 64, p. 723–746, 2013. doi: 10.1146/annurevarplant-050312-120233.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J.; BOLLAMMA, K. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.) **In Vitro Cell Development Biology Plant.**, v. 39, p. 551–556, 2003.

SILVAROLLA, M.B. Plant genomic alterations due to tissue culture. **Journal Brazil Association Advance Science**, São Paulo, v. 44, p. 329-335, 1992.

SKIRVIN, R.M. *et al.* Sources and frequency of somaclonal variation. **Hortscience**, v. 29, n. 11, p. 1232-1237, 1994.

SNYMAN, S.J. Sugarcane transformation. In: CURTIS, I.S. (ed). **Transgenic crops of world: essential protocols**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2004. p. 103–114.

SREENIVASAN, J.; SREENIVASAN, T.V. In vitro propagation of *Saccharum officinarum* (L.) and *Sclerostachya fusca* (Roxb.) A. Camus hybrid. **Theor Appl Genetics**, v. 67, p. 171–174, 1984.

SREENIVASAN, J.; SREENIVASAN, T.V. Tissue culture of species and species hybrids for creating genetic variability. **Annual Report. Sugarcane Breeding Institute**, Coimbatore, p. 61–62, 1984.

SUGIHARTO, B.; SATO, M.; TAMURA, Y.; TANIO, M.; TAKAGI, H. Development of an efficient Agrobacterium – mediated transformation method in sugarcane. In:

INTERNATIONAL CONGRESS OF SABRAO, 10. **Proceedings** [...]. Tsukuba Japan, 2005. 1-Ac (CD-ROM).

TAYLOR, P.W.J.; GEIJSKES, J.R.; KO, H.L. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. **Theor Appl Genet.**, v. 90, p. 1169–1173, 1995.

TAHKOKORPI, M.; TAULAVUORI, K.; LAINE, K.; TAULAVUORI, E., After-effects of drought-related winter stress in previous and current year stems of *Vaccinium myrtillus* L. **Environmental Experimental Botany**, v. 61, p. 85–93, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 449-484.

UNAI, E.; ISELEN, T.; GARCIA, E.D.E. Comparison of characteristics of bananas (*Musa* sp.) from the somaclone CIEN BTA-03 and its parental clone Williams. **Fruit.**, v. 59, p. 257-263, 2004.

VALLADARES, F.; SANCHEZ-GOMEZ, D.; ZAVALA, M. A. Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. **Journal Ecology**, v. 94, p. 1103–1116, 2006. doi: 10.1111/j.1365-2745.2006.01176.x.

VALLADARES, F.; GIANOLI, E.; GÓMEZ, J. M. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. **New Phytologist.**, Oxford, v. 176, p. 749-763, 2007.

VALLADARES, F.; SANCHEZ-GOMEZ, D.; ZAVALAA, M. A. Quantitative estimations of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. **Journal of Ecology**, v. 94, p. 1103-1116, 2006.

VETTORE, A.L. *et al.* Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome research**, v. 13, n. 12, p. 2725-2735, 2003.

VILELA, R.; BEZERRA, B.; FROEHLICH, A.; ENDRES, L. Antioxidant system is essential to increase drought tolerance of sugarcane. **Ann. Appl. Biology**, v. 171, p. 451-463, 2017. doi:10.1111/aab.12387.

VU, J.C.; ALLEN, L.H.JR. Growth at elevated CO₂ delays the adverse effects of drought stress on leaf photosynthesis of the C4 sugarcane. **Journal Plant Physiology**, v. 166, p. 107–116, 2009.

VU, J.C.; ALLEN, L.H.JR; GESCH, R.W. Up-regulation of photosynthesis and sucrose metabolism enzymes in young expanding leaves of sugarcane under elevated growth CO₂. **Plant. Science**, v.171, p. 123–131, 2006.

WALTER, J.; NAGY, L.; HEIN, R.; RASCHER, U.; BEIERKUHNLEIN, C.; WILLNER, E.; JENTSCH, A. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. **Environmental Experimental Botany**, v. 71, p. 34–40, 2011.

WANG, X.; CAI, J.; LIU, F.; DAI, T.; CAO, W.; WOLLENWEBER, B.; JIANG, D. Multiple heat priming enhances thermo-tolerance to a later high temperature stress via improving subcellular antioxidant activities in wheat seedlings. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 74, p. 185–92, 2014.

WANG, X.; VIGJEVIC, M.; LIU, F.; JACOBSEN, S.; JIANG, D.; WOLLENWEBER, B. Drought priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought and heat stresses during grain filling in spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Vinjett). **Plant Growth Regulation**, v. 75, p. 677–87, 2015.

WANG, X.; VIGNJEVIC, M.; JIANG, D.; JACOBSEN, S.; WOLLENWEBER, B. Improved tolerance to drought stress after anthesis due to priming before anthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Vinjett. **Journal Experimental Botany**, v. 65, p. 6441–56, 2014.

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. doi: 10.1007/s00425-003-1105-5.

WOOD, G.H.; WOOD, R.A. The estimation of cane root development and distribution using radio phosphorus. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, p. 41, p. 160–168, 1967.

ZHANG, Y. Y.; FISCHER, M.; COLOT, V.; BOSSDORF, O. Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. **New Phytologist.**, v. 197, p. 314-322, 2013.

ZHAO, D.; BARRY, G.; COMSTOCK, J.C. Sugarcane response to water-deficit stress during early growth on organic and sandy soils. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 403–414, 2010.

ZHAO, D.; GLAZ, B.; COMSTOCK, J. C. Sugarcane leaf photosynthesis and growth characters during development of water-deficit stress. **Crop Science**, v. 53, p. 1066-1075, 2013. <https://doi.org/10.2135/cropsci2012.09.0554>.