

GIULIANA CRISTINA MOURÃO SOARES

**EFEITO DO ÁCIDO SALICÍLICO NO METABOLISMO PRIMÁRIO E
SECUNDÁRIO DE PLANTAS DE ARROZ, MILHO E
CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S676e
2016 Soares, Giuliana Cristina Mourão, 1986-
Efeito do ácido salicílico no metabolismo primário e secundário de plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar / Giuliana Cristina Mourão Soares. - Viçosa, MG, 2016.
vii, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.37-46.

1. Plantas - Efeito do ácido salicílico. 2. Análise foliar. 3. Plantas - Metabolismo Secundário. 4. Metabolismo primário. 5. Hormônios. 6. Arroz. 7. Cana-de-açúcar. 8. Milho. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 633

GIULIANA CRISTINA MOURÃO SOARES

**EFEITO DO ÁCIDO SALICÍLICO NO METABOLISMO PRIMÁRIO E
SECUNDÁRIO DE PLANTAS DE ARROZ, MILHO E
CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

Dimas Mendes Ribeiro

Edgard Augusto de Toledo Picoli

Flávio Barcellos Cardoso

Maira Christina Marques Fonseca

Marcelo Rogalski
(Presidente da Banca)

À minha família, fonte de amor e sabedoria

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida.

À minha família, pelo amor indescritível e pelo apoio imensurável para a conclusão dos meus estudos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela excelência dos estudos oferecidos.

À CAPES e ao CNPq, pelo financiamento do doutorado.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), pela análise de açúcares hemicelulósicos.

Ao professor Marcelo Loureiro, pela orientação.

Aos meus coorientadores, professor Marcelo Rogalski e Dra Andrea Giordano, pela amizade, auxílio, e conselhos fundamentais em todas as etapas para a obtenção deste título.

Aos professores Dimas Mendes Ribeiro e Edgard Augusto de Toledo Picoli, ao Dr. Flávio Barcellos Cardoso e à Dra. Maira Christina Marques Fonseca, por terem gentilmente aceitado o convite para participar da arguição oral da tese.

Aos professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, que participaram ativamente para a obtenção desse título.

Aos meus queridos amigos de curso, em especial aos integrantes do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, pela alegria, acolhimento, carinho e cumplicidade. Em especial aos amigos: Izabel, Ana Carla, Carla, Thiago, Fernanda, Karla, Túlio, Mirelli, Amanda, Daniele, Maria Antônia (Susy!), Odione, Gélia, Juliene, Emanuel, Camilo, Rosilene, Fabiana, Martielly, Rodrigo, Samuel, Flávio, Diego, Lucilene, Kelem, Marcelo e Antônio.

Ao meu namorado Alberto Souza Boldt, por estar sempre ao meu lado sendo meu amigo e companheiro.

Meu maior aprendizado durante a execução desta Tese foi de que não fazemos nada sozinhos. É indispensável ter a participação de pessoas com conselhos, dicas, apoios, sorrisos e ajudas

em si. Por isso, sou eternamente grata a todos que de alguma forma, mesmo da mais simples possível, contribuíram para a finalização deste trabalho.

BIOGRAFIA

GIULIANA CRISTINA MOURÃO SOARES, filha de Natal Luiz Soares e Cátia Roberta da Silva Mourão Soares, nasceu em 14 de junho de 1986, em Goiânia, Goiás.

Em julho de 2009 graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais.

Em março de 2010, ingressou, em nível de Mestrado, no programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, submetendo-se à defesa da dissertação em fevereiro de 2012. Em março desse mesmo ano, iniciou o curso de Doutorado dessa mesma instituição e programa, submetendo-se à defesa de tese em 28 de junho de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1 Material vegetal e condições de cultivo	6
2.2 Caracterização dos tratamentos e delineamento experimental	6
2.3 Caracterização das respostas fisiológicas	7
2.3.1 Trocas gasosas	8
2.3.2 Parâmetros de fluorescência da clorofila a	8
2.4 Teores de pigmentos	8
2.5 Determinação de açúcares, amido, proteínas e aminoácidos.....	8
2.6 Quantificação de EROs	9
2.7 Avaliação de danos celulares.....	9
2.8 Atividade de enzimas antioxidantes	10
2.9 Fenólicos totais	11
2.10 Atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5) e tirosina amônia-liase (TAL, EC 4.3.1)	11
2.11 Composição química da parede celular	12
2.11.1 Isolamento da parede celular	12
2.11.2 Lignina.....	12
2.11.3 Carboidratos	12
2.12 Sacarificação: análise da recalcitrância da parede.....	13
2.13 Análise estatística	13
3. RESULTADOS	14
3.1 Avaliação dos parâmetros fisiológicos e teores de pigmentos	14
3.2 Análise de metabólitos primários	17
3.3 Avaliação do sistema antioxidante e danos celulares	19
3.4 Fenólicos totais e atividades da FAL e TAL	21
3.5 Análise da parede celular.....	23
3.6 Análise de componentes principais	26
4. DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

SOARES, Giuliana Cristina Mourão Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2016. **Efeito do ácido salicílico no metabolismo primário e secundário de plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar.** Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Coorientadores: Andrea Mariana Giordano e Marcelo Rogalski.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas da indução do sistema de defesa de plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar, através da aplicação de ácido salicílico (AS) nas folhas. Plantas de arroz e milho, com 30 dias de crescimento em solução hidropônica, e plantas de cana-de-açúcar, com 2 meses de crescimento em substrato comercial, receberam 5 aplicações de solução 100 μ M AS + 0,15% Tween 20, ou apenas 0,15% Tween 20 (controle). Após duas semanas de tratamento, foram avaliados parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a nas folhas +3, que também foram coletadas para a quantificação de compostos do metabolismo primário, secundário e antioxidante, além dos componentes químicos da parede celular e da eficiência de sacarificação da parede. Nas três espécies, o AS promoveu aumento significativo na taxa fotossintética líquida e na condutância estomática, mas que não refletiram em acúmulo de compostos de reserva, pelo contrário, em cana-de-açúcar houve redução significativa dos níveis de glicose, sacarose e aminoácidos. O AS não alterou o teor de malonaldeído em nenhuma das espécies. Em arroz e milho, os níveis de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio já estavam em homeostase no momento da coleta. Em cana, o aumento significativo no teor de ânions superóxido foi neutralizado pela atividade basal da dismutase do superóxido. O teor de fenólicos não alterou após a aplicação de AS, e as atividades da fenilalanina amônia-liase e tirosina amônia-liase reduziram significativamente em milho e cana. Não houve alterações nos teores de lignina e celulose em nenhuma das espécies. Em cana, houve aumento no teor de glicose da fração hemicelulósica. O AS não alterou a eficiência de sacarificação da parede das folhas avaliadas. Os resultados sugerem que o AS induziu o metabolismo primário das folhas +3 de arroz, milho e cana-de-açúcar, mas não houve investimento de carbono no metabolismo secundário.

ABSTRACT

SOARES, Giuliana Cristina Mourão Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2016. **Effect of salicylic acid on primary and secondary metabolism in plants of rice, maize and sugarcane.** Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-advisers: Andrea Mariana Giordano and Marcelo Rogalski.

This study aimed to investigate the responses of plant defense system in rice, maize and sugarcane, after foliar application of salicylic acid (SA). Plants of rice and maize, grown for 30 days in hydroponic system, and plants of sugarcane, grown for 2 months under greenhouse conditions, were sprayed 5 times with 100 μ M SA + 0,15% Tween 20, or only 0,15% Tween 20 (control). After two weeks of treatment, gas exchange and chlorophyll a parameters were evaluated in leaf +3, from which samples were collected to determine compounds from primary, secondary and antioxidant metabolisms, and also cell wall components and saccharification efficiency. In the three species, SA significantly increased net CO₂ and stomatal conductance, but these alterations were not coupled with reserve accumulation, on the contrary, there was a significantly reduction of glucose, sucrose and amino acids levels in sugarcane. SA did not alter malonaldehyde content in any specie. In rice and maize, levels of hydrogen peroxide and superoxide anion were in homeostasis when samples were collected. In sugarcane, SA significantly increased superoxide anion content, but it was scavenged by the basal activity of superoxide dismutase. Total phenolics did not change with SA application in any specie, and phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities significantly decreased in maize and sugarcane. There were no alternations in lignin or cellulose contents in any specie. In sugarcane, glucose from hemicellulose significantly increased. SA did not change cell wall saccharification efficiency of leaves +3. The results suggest that SA induced primary metabolism of leaves +3 from rice, maize and sugarcane, but there was no carbon investment in secondary metabolism.

1. INTRODUÇÃO

As plantas desenvolveram diferentes mecanismos de adaptação e defesa contra condições ambientais adversas, provocadas tanto por agentes bióticos quanto por abióticos. Raramente as plantas experimentam condições de estresse impostas por uma única restrição ambiental. Por isso, o sistema de defesa vegetal é versátil, e atua de maneira eficaz, dinâmica e coordenada, no momento e local apropriados e com a magnitude adequada (Garcia-Brugger et al. 2006). Quando há o contato de um agente patogênico com a planta, duas formas de interação podem ser observadas: a interação compatível, quando o organismo hospedeiro é susceptível e não manifesta resistência; e a interação incompatível, na qual o organismo hospedeiro gera respostas de defesa (Somssich e Hahlbrock 1998).

De maneira geral, os mecanismos de resistência são classificados em dois grupos principais: resistência constitutiva ou pré-formada, aquela já presente na planta previamente ao contato com o agente patogênico; e resistência adquirida ou pós-formada, que é induzida somente após o contato com o patógeno. As respostas pós formadas podem ainda ser locais, de hipersensibilidade, ou manifestadas além do local de infecção, chamada de resposta sistêmica adquirida (Dixon et al. 1994). Tanto na resistência constitutiva quanto na adquirida são observados mecanismos de defesa estruturais, que atuam como obstáculos físicos impedindo a entrada do patógenos e a colonização dos tecidos, tais como ceras, cutícula, tricomas, papilas, aumento da lignificação das células, deposição de tiloses, etc.; e mecanismos de defesa bioquímicos, que são reações que ocorrem nas células do hospedeiro para produzir substâncias tóxicas ao patógeno, ou que criam condições desfavoráveis ao crescimento deste no interior da planta, tais como compostos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, alcaloides, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese, também chamadas de proteínas RP, com destaque para quitinases, peroxidases, glucanases, inibidores de proteases, entre outros (Nürnberg et al. 2004; Van Loon et al. 2006).

A velocidade com que a planta reconhece a presença do patógeno determina o tempo de resposta à invasão, desencadeando uma ou mais reações de defesa. Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas sinalizadoras fundamentais para a regulação do sistema de defesa das plantas em respostas a estresses (Baxter e Stewart 2013). As EROs existem basicamente sob quatro formas nas células: oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\bullet})

(Arora et al. 2002). A produção de EROs ocorre normalmente como consequência do metabolismo celular, em diferentes compartimentos celulares, como em cloroplastos, mitocôndrias ou peroxissomos, como subprodutos dos processos de fotossíntese, fotorrespiração ou respiração, ou ainda na região do apoplasto, pela ação de NADPH oxidases ligadas à membrana plasmática, ou de peroxidases associadas à parede celular (Mittler 2002). Quando as plantas se encontram sob condições adversas, observa-se um aumento na produção de EROs, chamado de “explosão oxidativa”, que geralmente acontece em duas fases. Na primeira fase observa-se em poucos minutos o acúmulo de EROs, resultante provavelmente do contato entre a planta e o patógeno, e que nem sempre está correlacionada com a produção de respostas de resistência, pois pode acontecer em interações compatíveis. Já na segunda fase, a explosão oxidativa é mais forte e prolongada, e está relacionada com a indução de resistência da planta ao patógeno, sendo características em interações incompatíveis (Lamb e Dixon 1997). Por serem moléculas altamente reativas, potencialmente capazes de causar danos oxidativos ou comprometer a integridade celular (Gill and Tuteja 2010), as EROs são mantidas em níveis subletais nas células, pela atuação de mecanismos antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos (Noctor e Foyer 1998).

O metabolismo secundário é responsável pela produção de muitos dos compostos de defesa envolvidos nas resistências constitutiva e adquirida das plantas. Há três grupos principais de metabólitos secundários produzidos pelas plantas: os terpenos (formados por unidades isoprênicas de cinco carbonos), os compostos fenólicos (formados a partir de um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos), e os compostos nitrogenados (formados principalmente a partir de aminoácidos aromáticos) (Nicholson e Hammerschmidt 1992; Goyal et al. 2012). Os terpenos, além de possuírem alguns representantes atuantes no metabolismo primário, como fitohormônios (ácido abscísico, gibberelinas, brassinoesteróides) ou carotenoides, também estão envolvidos na produção de toxinas piretróides, de ação inseticida, e óleos essenciais com ação repelente. Os compostos nitrogenados apresentam uma variedade de metabólitos tóxicos que atuam principalmente na defesa das plantas contra herbívoros, como os alcaloides e os glicosídeos cianogênicos. Alguns compostos fenólicos atuam diretamente na defesa das plantas, como as cumarinas e os taninos, enquanto outros apresentam propriedades aleloquímicas, reduzindo o crescimento de plantas adjacentes, ou conferem resistência física aos vegetais, como a lignina (Arimura et al. 2005; Bhattacharya et al., 2010; Goyal et al. 2012).

A lignina é um polímero fenólico heterogêneo amorfo, e é incorporada como o último componente na parede celular secundária, entremeando a matriz de polissacarídeos e, assim, conferindo rigidez, impermeabilidade e resistência ao ataque de patógenos (Cesarino et al. 2012). A lignina é formada, em geral, por três diferentes unidades, chamadas de monolignóis: guaiacila (lignina G), siringila (lignina S) e p-hidroxifenila (lignina H). Os monolignóis são produzidos a partir de uma série de reações de hidroxilação e metilação de intermediários da rota dos fenilpropanóides (Li et al. 2014). Em muitas espécies, a fenilalanina é o precursor preferencial para a síntese dos fenilpropanóides, sendo convertida em ácido trans-cinâmico pela enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), considerada uma das enzimas mais importantes na regulação do metabolismo secundário. Em gramíneas, a tirosina também é utilizada para a produção de fenilpropanóides, sendo convertida em ácido p-cumárico pela enzima tirosina amônia-liase (TAL) (Hatfield et al. 2009). Os fenilpropanóides são importantes para as plantas não apenas por darem suporte à produção de compostos fenólicos atuantes na defesa contra patógenos e herbívoros, mas também por possuírem elevada capacidade antioxidante. Devido à ressonância do anel aromático presente na sua estrutura química, os fenilpropanóides são capazes de quelar íons de metais pesados, e sequestrar radicais livres como o O_2^{\bullet} , auxiliando na proteção da integridade e estrutura de macromoléculas celulares (Michalak 2006).

A parede celular secundária é formada por uma matriz de carboidratos (celulose e hemicelulose) entremeada por lignina, e constitui uma estrutura resistente e duradoura que confere proteção e sustentação celular para as plantas. A parede celular atua na primeira linha de defesa das plantas contra o ataque de patógenos, pois representa uma barreira física à entrada e disseminação dos microorganismos (Nafisi et al. 2015). Além disso, a parede é capaz de perceber a presença de fatores estressantes, e induzir respostas de defesa (Malinovsky et al. 2014). Por exemplo, expansinas atuam no afrouxamento da parede em resposta à seca (Sasidharan et al. 2011). Contra o ataque de patógenos, são observados o aumento da lignificação de tecidos (Sattler e Funnell-Harris 2013) e maior deposição de papilas nas células epidérmicas (Underwood 2012). A recalcitrância da parede celular pode ser definida como o conjunto de propriedades químicas envolvidas em sua resistência à desorganização (Tavares et al. 2015). Na prática, a recalcitrância da parede celular pode ser estimada através da sua eficiência de sacarificação: realiza-se a hidrólise da parede e a quantificação de açúcares liberados (de Carli Poelking et al. 2015).

Para fins comparativos, pode-se deduzir que uma parede com elevado grau de recalcitrância possui menor eficiência de sacarificação. Assim, modificações químicas na composição da parede, que promovem o aumento da sua recalcitrância, podem ser vistas como sendo uma estratégia de reforço mecânico contra fatores estressantes.

Elicitores são moléculas naturais ou sintéticas capazes de induzir respostas no sistema de defesa das plantas (Nürnberger 1999). Diversos tipos de elicitores já foram caracterizados, como oligossacarídeos, lipídeos, glicolipídeos e glicoproteínas (Thakur e Sohal 2013). O reconhecimento desses elicitores é realizado por proteínas transmembranas que atuam como receptores (Montesano et al. 2003). Como consequência ao reconhecimento, é iniciada uma resposta de defesa, que envolve uma complexa cascata de sinais mediada por proteínas cinases ativadas por mitógenos (proteínas MAPKs) (Garcia-Brugger et al. 2006). Estudos têm demonstrado que a atuação das EROs e de fitohormônios, como o ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, é fundamental nesta via sinalização (Pieterse et al. 2009; Wu and Baldwin 2010).

O ácido salicílico (ácido 2-hidróxibenzóico) é um fitohormônio de natureza fenólica sintetizado nas plantas a partir de duas vias enzimáticas diferentes (Seyfferth e Tsuda 2014). Pela via dos fenilpropanóides, o ácido benzoico é convertido em ácido salicílico pela enzima ácido benzoico-2-hidroxilase. Nos cloroplastos, o corismato é convertido pela enzima sintase do isorismato a isocorismato, que por sua vez é convertido em ácido salicílico pela enzima isocorismato piruvato liase. Após ser produzido, o ácido salicílico (AS) pode ser convertido em formas glicosiladas ou metiladas, que também são translocadas via floema (Kawano e Bouteau 2013).

A relação do AS com o sistema de defesa das plantas tem sido amplamente estudada (Sundar et al., 2009; Hayat et al., 2012; Rojas et al., 2014). O envolvimento do AS como molécula sinalizadora, para a indução de respostas de defesa, foi proposto após ser verificado um rápido acúmulo nos níveis de AS nas plantas após interações planta-patógeno, tanto na compatíveis quanto nas incompatíveis (Mauch-Mani e Métraux 1998). Estudos indicam que o AS é fundamental para a cascata de sinais que levam à resposta sistêmica adquirida, atuando na síntese de enzimas envolvidas na produção de compostos de defesa, na ativação da expressão de genes que codificam as proteínas RP e na regulação da explosão oxidativa (Nürnberger et al. 2004; Wu and Baldwin 2010). Em *Arabidopsis*, foi observado que existem diferentes proteínas atuantes como receptores do AS, com destaque para as proteínas da família não relacionadas à patogênese (NRP). As proteínas

NRP se ligam ao AS, e interagem com fatores de transcrição específicos para reprogramar a expressão de genes requeridos para a defesa (Seyfferth e Tsuda 2014). Devido à presença dessa complexa rede de sinalização e ativação de defesa mediada pelo AS, tem sido proposta a utilização agrícola de elicitores sintéticos análogos ao AS, como forma de reduzir a aplicação de defensivos químicos que são altamente poluentes e prejudiciais à saúde humana (Thakur e Sohal 2013). Produtos à base de acibenzolar S–metil (ASM) ou ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (INA) já são comercializados em diversos países.

Pesquisas mostram que a aplicação exógena de AS é capaz de induzir respostas de defesa nas plantas, promovendo, por exemplo, alterações na produção de EROs, na atividade de enzimas antioxidantes (Dong et al., 2010), no conteúdo de compostos fenólicos (Durango et al. 2013), e no acúmulo de proteínas RP (Tamaoki et al. 2013). Em um estudo recente do nosso grupo de pesquisa, a aplicação de AS em plantas de *Brachypodium distachyon*, uma gramínea modelo para plantas C3, promoveu o aumento do nível de compostos fenólicos nas folhas, e também modificou a composição química da parede celular que, como consequência, levou ao aumento da recalcitrância da parede (Napoleão, 2015). Esses resultados promissores basearam a realização desta tese, que objetivou investigar o efeito do AS na indução de respostas de defesa de três gramíneas de relevante importância agrônômica: arroz, milho e cana-de açúcar. Os principais objetivos do trabalho foram analisar possíveis alterações em parâmetros fisiológicos, em componentes dos metabolismos primário, secundário e antioxidante, e também na composição química e recalcitrância da parede celular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi realizado com plantas de milho (*Zea mays* L., cultivar UFVM 200), arroz (*Oryza sativa* L. ssp. indica, cultivar EPAGRI 108) e cana-de-açúcar (híbridos *Saccharum* spp., cultivar RB 867515). As sementes de arroz foram gentilmente doadas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri). As sementes de milho e as mudas de cana-de-açúcar foram gentilmente fornecidos pelo Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa.

O cultivo das plantas de milho e arroz foi realizado em sistema hidropônico aerado em câmaras de crescimento, enquanto as plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas em substrato em casa de vegetação. As sementes de arroz e milho foram superficialmente esterilizadas, colocadas para germinar em rolos de papel filtro umedecidos com água destilada, e mantidas a 25 ± 1 °C com 12 h de luz (intensidade luminosa de $\pm 250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Dez dias após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 1,75 L, com solução nutritiva de Hoagland modificada por (Sanglard et al. 2014): 1,0 mM KNO_3 , 0,25 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,1 mM NH_4Cl , 0,5 mM MgSO_4 , 1,0 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,30 μM CuSO_4 , 0,33 μM ZnSO_4 , 11,5 μM H_3BO_3 , 3,5 μM MnCl_2 , 0,1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0,25 μM FeSO_4 e 0,25 μM Na_2EDTA . As plântulas permaneceram em solução nutritiva com $\frac{1}{4}$ da força iônica nos primeiros três dias de crescimento, após o que foram mantidas em solução com $\frac{1}{2}$ da força por mais três dias, e finalmente transferidas para solução com força total. As soluções dos vasos foram renovadas a cada cinco dias, mantidas sob aeração constante, e o pH foi ajustado a cada dois dias para valores entre 5,6 e 5,7.

As mudas de cana-de-açúcar foram obtidas a partir de colmos seccionados em toletes em bandejas contendo substrato comercial (Tropstrato HT®). Após 30 dias do plantio, as mudas foram transplantadas para vasos com capacidade de 10 L contendo substrato e 42 g da fórmula 4-14-8 (NPK). As plantas foram mantidas em casa de vegetação com irrigação diária por gotejamento (temperatura média de 28 ± 1 °C, condições naturais de luz).

2.2 Caracterização dos tratamentos e delineamento experimental

Plantas de arroz (V4) e milho (V5), com um mês de crescimento, e plantas de cana-de-açúcar (fase de perfilhamento), com dois meses de crescimento, foram utilizadas

para os tratamentos. Nas três espécies, foi aspergida em todas as folhas uma solução de 100 µM ácido salicílico (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) + 0,15% Tween 20, o grupo controle foi aspergido com 0,15% Tween 20. Plantas de arroz e milho foram agrupadas em diferentes câmaras de crescimento de acordo com o tratamento recebido, devido ao possível efeito de compostos voláteis gerados após a aplicação de AS. Na casa de vegetação, plantas de cana de diferentes tratamentos permaneceram separadas entre si por aproximadamente três metros de distância. No total, foram realizadas cinco aplicações dos tratamentos, com um intervalo de três dias entre uma aplicação e outra. Após duas semanas de tratamento (48 horas após a última aplicação de AS), as regiões medianas, sem nervuras, das folhas +3 (terceira folha completamente expandida a partir do ápice) foram coletadas entre 12:00 e 13:00 p.m. As folhas +3 foram escolhidas para análise porque se tratam de órgãos maduros com parede secundária, cuja composição foi alvo de estudo no trabalho.

As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, até o início dos ensaios bioquímicos. Para a realização de algumas análises, as amostras foram liofilizadas, pulverizadas com o auxílio de esferas metálicas em um disruptor celular do tipo Mini Beadbeater 96 (Biospec Products, Bartlesville, OK, Estados Unidos), e serão referidas no texto como “material seco”. Para outras análises, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido com almofariz e pistilo, e serão referidas como “material congelado”.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Nos tratamentos com arroz e milho a unidade experimental consistiu em um vaso com quatro plantas, e foram utilizadas três repetições para cada tratamento. Em cana-de-açúcar, a unidade experimental foi um vaso com duas plantas, e cada tratamento possuiu seis repetições. Os ensaios bioquímicos foram realizados a partir de amostras compostas obtidas pelo agrupamento do material coletado das plantas de cada repetição.

2.3 Caracterização das respostas fisiológicas

Antes de realizar a coleta das amostras no último dia de tratamento, os parâmetros de trocas gasosas foram avaliados entre 8:00 e 10:00 a.m., e os de fluorescência da clorofila a foram avaliadas na noite anterior entre 8:00 e 10:00 p.m., por meio de um analisador de gases a infravermelho em sistema aberto (IRGA – Infrared Gas Analyzer),

modelo LI 6400XT (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), acoplado a um fluorômetro (LI-6400-40, LI-COR Inc.). As análises foram realizadas em folhas +3.

2.3.1 Trocas gasosas

Foram determinadas a taxa fotossintética líquida (A), a condutância estomática ao vapor d'água (g_s), a razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) e a transpiração (E). Para as três espécies foram utilizadas a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante de $1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 , temperatura e umidade ambiente.

2.3.2 Par\u00e2metros de fluoresc\u00eancia da clorofila a

Foram determinadas a fluoresc\u00eancia m\u00ednima (F_0) e m\u00e1xima (F_m) das folhas adaptadas ao escuro com a finalidade de calcular o rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo do fotossistema II (F_v/F_m) conforme descrito por (van Kooten and Snel 1990). Determinou-se ainda o rendimento qu\u00e2ntico efetivo do fotossistema II (ϕ_{FSII}), a taxa de transporte de el\u00e9trons (ETR) e a dissipac\u00e3o de energia n\u00e3o fotoqu\u00edmica via ciclo das xantofilas (NPQ), segundo (Genty et al. 1989).

2.4 Teores de pigmentos

A extra\u00e7\u00e3o de pigmentos (clorofilas a e b) foi realizada pela adi\u00e7\u00e3o de 1mL de acetona 80% (v/v) \u00e0s al\u00edquotas de 50 mg de material congelado. O extrato resultante foi filtrado e lido em espectrofot\u00f4metro nos comprimentos de onda de 645 e 665 nm, e os teores de clorofilas a e b estimados conforme o proposto por (Lichtenthaler 1987).

2.5 Determina\u00e7\u00e3o de a\u00e7\u00facares, amido, prote\u00ednas e amino\u00e1cidos

Para a extra\u00e7\u00e3o destes metab\u00f3litos, foi adicionado 1 mL de metanol \u00e0s al\u00edquotas de 10 mg de material seco, que permaneceram a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min sob agita\u00e7\u00e3o de 700 rpm. Ap\u00f3s centrifuga\u00e7\u00e3o a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (14000 rpm, 10 min), $700 \mu\text{L}$ do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, ao qual foram adicionados $500 \mu\text{L}$ de clorof\u00f3rmio e $800 \mu\text{L}$ de \u00e1gua ultra-pura. Ap\u00f3s nova centrifuga\u00e7\u00e3o, $700 \mu\text{L}$ da fase polar foram coletados, secos em speed vac, e ressusp\u00eandidos em $700 \mu\text{L}$ de \u00e1gua ultra-pura. Este extrato foi utilizado para quantificar amino\u00e1cidos sol\u00faveis totais, pelo m\u00e9todo da ninidrina (Gibon et al. 2004), glicose, frutose e sacarose (Ferne et al. 2001). O precipitado da extra\u00e7\u00e3o

metanólica foi utilizado para a quantificação de proteínas solúveis, pelo método de Bradford (1976), e também para a quantificação de amido, seguindo a metodologia de (Gibon et al. 2004).

Para a quantificação dos açúcares, foram adicionados 20 μL do extrato a 280 μL do tampão de reação constituído de 100 mM imidazol, pH 6,9, 5 mM MgCl_2 , 2 mM NAD^+ , 2mM ATP e 2 U μL^{-1} da enzima desidrogenase glicose-6-fosfato. A reação foi continuamente registrada em um leitor de ELISA (OptiMax Tunable Microplate Reader, Sunnyvale, CA, Estados Unidos), a 340 nm. Adicionou-se 1 U reação⁻¹ de hexocinase para a determinação de glicose. Após a estabilização das leituras, adicionou-se 1 U reação⁻¹ de fosfoglicoisomerase, para a determinação de frutose. Por fim, após a estabilização dessa reação, adicionou-se 1 U reação⁻¹ de invertase, para a quantificação de sacarose.

2.6 Quantificação de EROs

Para determinar a concentração de $\text{O}_2^{\bullet-}$, 100 mg de material congelado foram incubados em tubos hermeticamente fechados com 1 mL de meio de reação constituído de 100 μM Na_2EDTA , 20 μM NADH e 20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7,8 (Mohammadi e Karr 2001). A reação foi iniciada pela introdução de 100 μL de 25,2 mM epinefrina (preparada em 0,1 N HCl). As amostras foram incubadas por 5 min a 28 °C, após o que os fragmentos foliares foram removidos e a absorbância foi medida a 480 nm por 5 min. A liberação de ânion superóxido foi determinada pela quantidade de adenocromo acumulado, utilizando-se o coeficiente de extinção molar $4,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Boveris 1984).

A extração e determinação de H_2O_2 foram realizadas de acordo com Wu et al. (2006). Alíquotas de 100 mg de material congelado foram homogeneizadas a 4 °C com 1 mL de solução 10% ácido tricloroacético (TCA) (p/v). Após centrifugação a 4 °C (14000 rpm, 5 min), 200 μL do sobrenadante foram incubados com 1,8 mL do meio de reação constituído de 0,5 M KI e 2,5 mM tampão fosfato de potássio, pH 5,8. A absorbância foi lida a 390 nm, e uma curva padrão de H_2O_2 (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada para quantificar a concentração de peróxido nas amostras.

2.7 Avaliação de danos celulares

A concentração de malonaldeído (MDA) foi determinada para estimar a intensidade da peroxidação de lipídeos, segundo (Cakmak and Horst 1991). Para isso, 150 mg de material congelado foram homogeneizados a 4 °C com 2 mL de 0,1% TCA (p/v). Após

centrifugação a 4 °C (13000 rpm, 15 min), 500 µL do sobrenadante foram adicionados a 1,5 mL do meio de reação constituído por 0,5% ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (p/v) e 20% TCA (p/v). A mistura foi incubada a 95 °C por 20 min, e a reação foi paralisada pela imersão dos tubos de ensaio no gelo. Após centrifugação (13000 rpm, 4 min), a absorvância do sobrenadante foi lida a 532 nm e 600 nm. A absorvância a 600 nm foi subtraída da de 532 nm, e a concentração de MDA foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.8 Atividade de enzimas antioxidantes

Foram avaliadas as atividades da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidase inespecífica (POX, EC 1.11.1.7) e peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11). Para a obtenção do extrato enzimático, realizou-se a homogeneização de 200 mg de material congelado com 2 mL do meio de extração composto por 0,1 M tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 0,1 mM EDTA e 2 mM DTT. Foi realizada a centrifugação (14000 rpm, 15 min), e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto. Todas as etapas foram realizadas a 4 °C.

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 20 µL do extrato enzimático a 280 µL de meio de reação (50 mM tampão fosfato de sódio pH 7,8, 13 mM metionina, 75 µM azul p-nitrotetrazólio, 0,1 mM EDTA e 2 µM riboflavina) (Del Longo et al. 1993). As amostras foram iluminadas com lâmpadas de 15 W por 5 min e, em seguida, a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi quantificada pela leitura da absorvância a 560 nm. O branco foi obtido nas mesmas condições, mas na ausência de luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (Beauchamp e Fridovich 1971).

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 20 µL do extrato enzimático a 280 µL de meio de reação (50 mM tampão fosfato de potássio pH 7,0 e 12,5 mM H₂O₂) (Havir e McHale 1987). O decréscimo da absorvância a 240 nm foi monitorado por 2 min, e a atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹.

A atividade da POX foi determinada pela oxidação do piragolol, de acordo com (Kar and Mishra 1976). A reação foi iniciada pela adição de 20 µL do extrato enzimático a 280 µL de meio de reação (25 mM tampão fosfato de potássio pH 6,8, 20 mM piragolol e 20 mM H₂O₂). A formação de purpurogalina foi acompanhada através do incremento

da absorbância da reação a 420 nm, por 2 min. A atividade foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance e Maehly 1955).

A atividade da APX foi determinada pela adição de 20 μL do extrato enzimático a 280 μL do meio de reação (50 mM fosfato de potássio pH 7,0, 0,8 mM ácido ascórbico e 1,0 mM H_2O_2). O decréscimo na absorbância a 290 nm foi acompanhado por 2 min. Para o cálculo da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano e Asada 1981).

2.9 Fenólicos totais

A extração e quantificação do teor de fenólicos totais solúveis foram realizadas de acordo com (Singleton et al. 1999). Extrações sequenciais com clorofórmio, metanol e água foram realizadas a partir de 20 mg de material seco. A fase superior da mistura foi coletada para a quantificação com o uso do reagente Folin-Ciocalteu[®] (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). A absorbância do extrato foi lida a 725 nm, e o teor de fenólicos totais estimado utilizando-se uma curva padrão de ácido tânico.

2.10 Atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5) e tirosina amônia-liase (TAL, EC 4.3.1)

A metodologia proposta por (Mehta e Bhavnarayana 1981) foi utilizada para a extração e determinação da atividade das enzimas FAL e TAL. Alíquotas de 100 mg de material congelado foram homogeneizadas com 2 mL de 50 mM tampão fosfato de sódio, pH 6,5. Foi realizada a centrifugação a 4 °C (14000 rpm, 20 min) e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático. As atividades foram determinadas pela adição de 50 μL do extrato enzimático a 1 mL do meio de reação (25 mM Tris-HCl pH 8,8 com 25 mM de L-fenilalanina ou 25 mM de L-tirosina). A reação ocorreu por 1 h a 37 °C, e foi paralisada pela adição de 60 μL de 6 N HCl. Os produtos das reações, ácidos trans-cinâmico (FAL) ou p-cumárico (TAL), foram determinados pela leitura da absorbância a 290 nm e 310 nm, respectivamente. Para o cálculo das atividades foi considerado o coeficiente de extinção molar $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.11 Composição química da parede celular

2.11.1 Isolamento da parede celular

A extração de parede celular foi realizada de acordo com (Van Acker et al. 2013). Alíquotas de aproximadamente 10 mg de material seco foram submetidas a uma série de extrações sequenciais. As amostras permaneceram por 30 min com os seguintes solventes: água deionizada (98 °C), etanol (76 °C), clorofórmio (59 °C) e acetona (54 °C). Entre um solvente e outro foi realizada a centrifugação (14000 rpm, 3 min) e remoção do sobrenadante. Ao final da extração com acetona, as amostras foram secas em speed vac por 3 h. Esse resíduo de parede celular foi utilizado para as quantificações seguintes.

2.11.2 Lignina

O teor de lignina foi determinado pelo método acetil-brometo. Alíquotas de 4 mg de parede celular foram incubadas por 30 min a 70 °C e 750 rpm com 100 µL de solução 25% acetil-brometo (v/v) em ácido acético e 4 µL de 60% ácido perclórico. As amostras foram centrifugadas (14000 rpm, 15 min) e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O precipitado foi lavado com 500 µL de ácido acético e centrifugado (14000 rpm, 3 min). Os sobrenadantes foram combinados e a eles foram adicionados 200 µL de 2 M NaOH. O volume final foi ajustado para 2 mL com ácido acético. O teor de lignina foi determinado pela leitura da absorvância a 280 nm, e calculado utilizando o coeficiente de absorção de 17,75 g⁻¹ L cm⁻¹ de acordo com o proposto por Foster et al. (2010a).

2.11.3 Carboidratos

A extração dos carboidratos da parede celular foi feita de acordo com a metodologia proposta por (Foster et al. 2010b). Alíquotas de 4 mg de parede celular foram incubadas com 1 mL de 2 M ácido trifluoroacético (TFA) por 2 h a 99 °C. Após centrifugação (2500 rpm, 2 min), 800 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos novos e secos em speed vac para uso posterior na quantificação de monômeros de hemicelulose (descrição abaixo). O precipitado resultante da centrifugação foi lavado três vezes com água e duas vezes com acetona e, em seguida, seco em speed vac. Esse resíduo foi incubado com 150 µL de H₂SO₄ e 30 µL de 5% fenol (p/v), por 1 h a 90 °C e 500 rpm. Após centrifugação (14000 rpm, 3 min), o sobrenadante foi diluído e a quantidade do teor de celulose foi realizada medindo a absorvância a 493 nm, segundo (Van Acker et al. 2013).

Os teores de arabinose, galactose e glicose da fração hemicelulósica foram determinadas por cromatografia de troca iônica de alta eficiência (Dionex IC 2500; Thermo Scientific, Camberley, Surrey, reino Unido), através de uma coluna Dionex Carbopac PA-10 a 27 °C. A fase móvel utilizada foi água (solvente A) e solução de 200 mM NaOH (solvente B), com fluxo constante de 800 $\mu\text{L}/\text{min}$. Aplicou-se o seguinte gradiente linear: 0 a 15 min, 10% de B e 90% de A; 15 a 20min, 10-100% de B e 90-0% de A; 20 a 23 min, 100% de B; 23 a 23,1min, 100 - 10% de B e 0 - 90% de A; 23,1 a 28 min, 10% de B e 90% de A. A quantificação foi realizada utilizando curvas de calibração com os padrões de arabinose, galactose e glicose, e a detecção feita por um detector de pulso amperométrico.

2.12 Sacarificação: análise da recalcitrância da parede

Alíquotas de 6 mg de material seco foram submetidas a dois tipos de pré-tratamento: no ácido, utilizou-se 350 μL de 0,5% H_2SO_4 (v/v); no básico, utilizou-se 350 μL de 4% NaOH (v/v). As amostras permaneceram a 99 °C por 1 h sob agitação de 750 rpm, e foram lavadas cinco vezes com tampão acetato de sódio (25 mM, pH 4,5) (Gomez et al. 2011). Após as lavagens, a fração sólida foi ressuspensa no tampão acetato e submetida à hidrólise enzimática, pela adição da celulase comercial Celluclast[®] (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil), na concentração de 15 FPU por grama de substrato. As amostras foram incubadas a 50 °C por 8 h sob agitação de 750 rpm. A quantificação da glicose liberada foi realizada de acordo com a metodologia descrita em (de Carli Poelking et al. 2015). O rendimento da sacarificação (%) foi calculado pela razão entre a glicose liberada após a hidólise (g L^{-1}) e o material seco submetido ao pré-tratamento (g L^{-1}).

2.13 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e avaliados pelo teste t de Student ($P < 0,05$). Para a análise de componentes principais utilizou-se o pacote básico do programa R (R Development Core Team, 2011).

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação dos parâmetros fisiológicos e teores de pigmentos

Após duas semanas de tratamento, foram realizadas análises fisiológicas e bioquímicas nas folhas. Nas três espécies, a aplicação de AS promoveu aumento significativo na taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) (Figura 1A) e na condutância estomática (g_s) (Figura 1B). Em arroz, houve aumento de 54% em A e de 47% na g_s. Em milho, o aumento foi de 50% em A e de 78% na g_s. Já nas plantas de cana, o aumento em A foi de 47% e na g_s de 85%. Não houve diferença significativa na razão entre as concentrações interna e ambiente de CO₂ (C_i/C_a) (Figura 1C), na taxa de transpiração (E) (Figura 1D) ou na concentração interna de CO₂ (C_i) (Figura 1E).

A análise da fluorescência da clorofila a é ferramenta importante na identificação de fatores capazes de alterar, direta ou indiretamente, o desempenho do fotossistema II (FSII). Os resultados dos parâmetros de fluorescência da clorofila a encontram-se na Figura 2. Não foi observada diferença significativa em nenhum dos parâmetros analisados: rendimento quântico máximo do FSII (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do FSII (ϕ FSII), dissipação de energia não-fotoquímica via ciclo das xantofilas (NPQ) e taxa de transporte de elétrons (ETR).

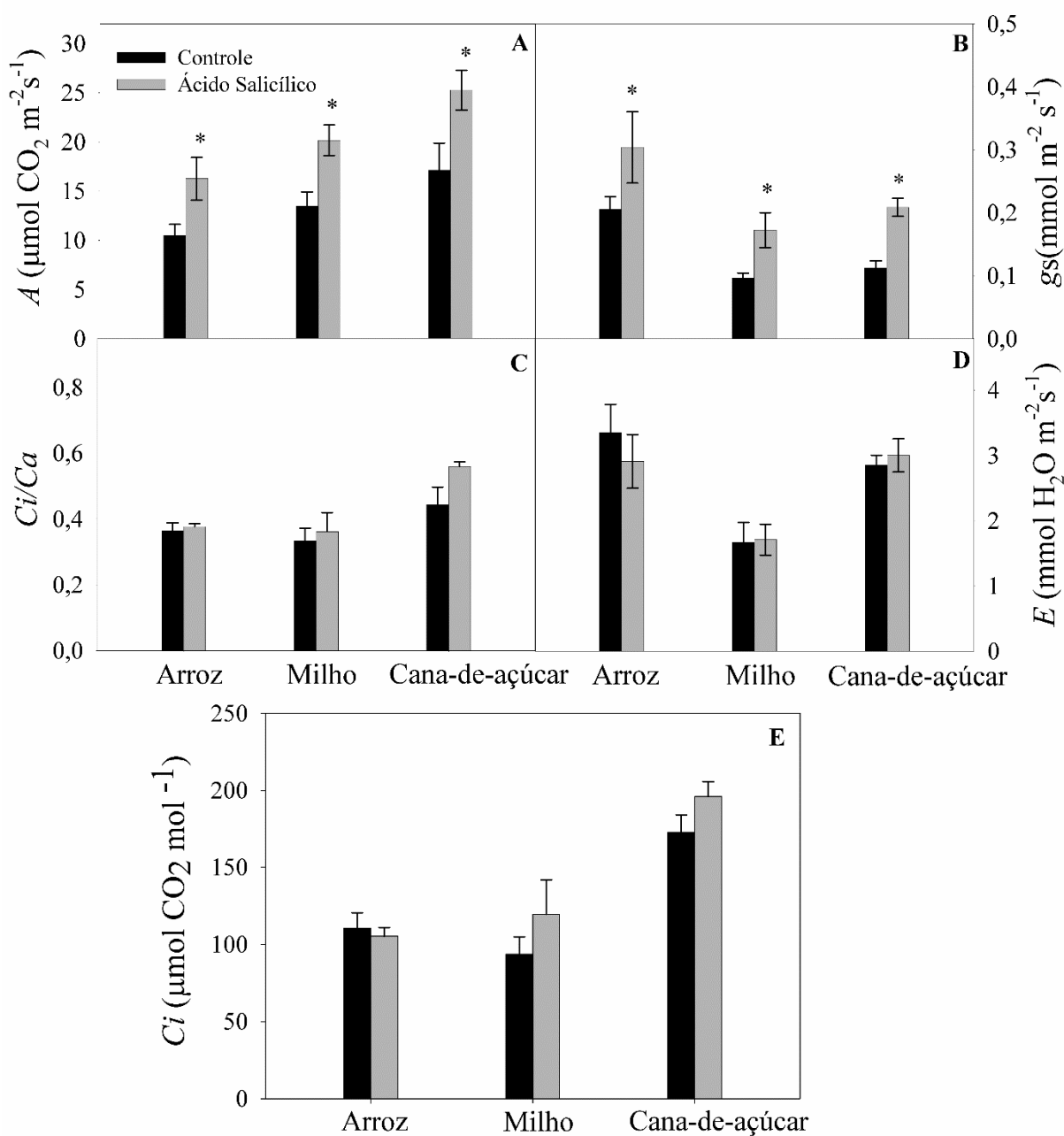


Figura 1. Parâmetros de trocas gasosas de plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar após duas semanas de tratamento com ácido salicílico. A, taxa de assimilação líquida de CO₂, com radiação fotossinteticamente ativa de 1000 μmol de fótons m⁻²s⁻¹ (A). B, condutância estomática (g_s). C, razão entre as concentrações interna e ambiente de CO₂ (C_i/C_a). D, taxa de transpiração (E). E, concentração interna de CO₂ (C_i). Valores representam a média ± erro padrão (arroz e milho, n=3; cana-de-açúcar, n=6), e os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle pelo teste t de Student (p < 0,05).

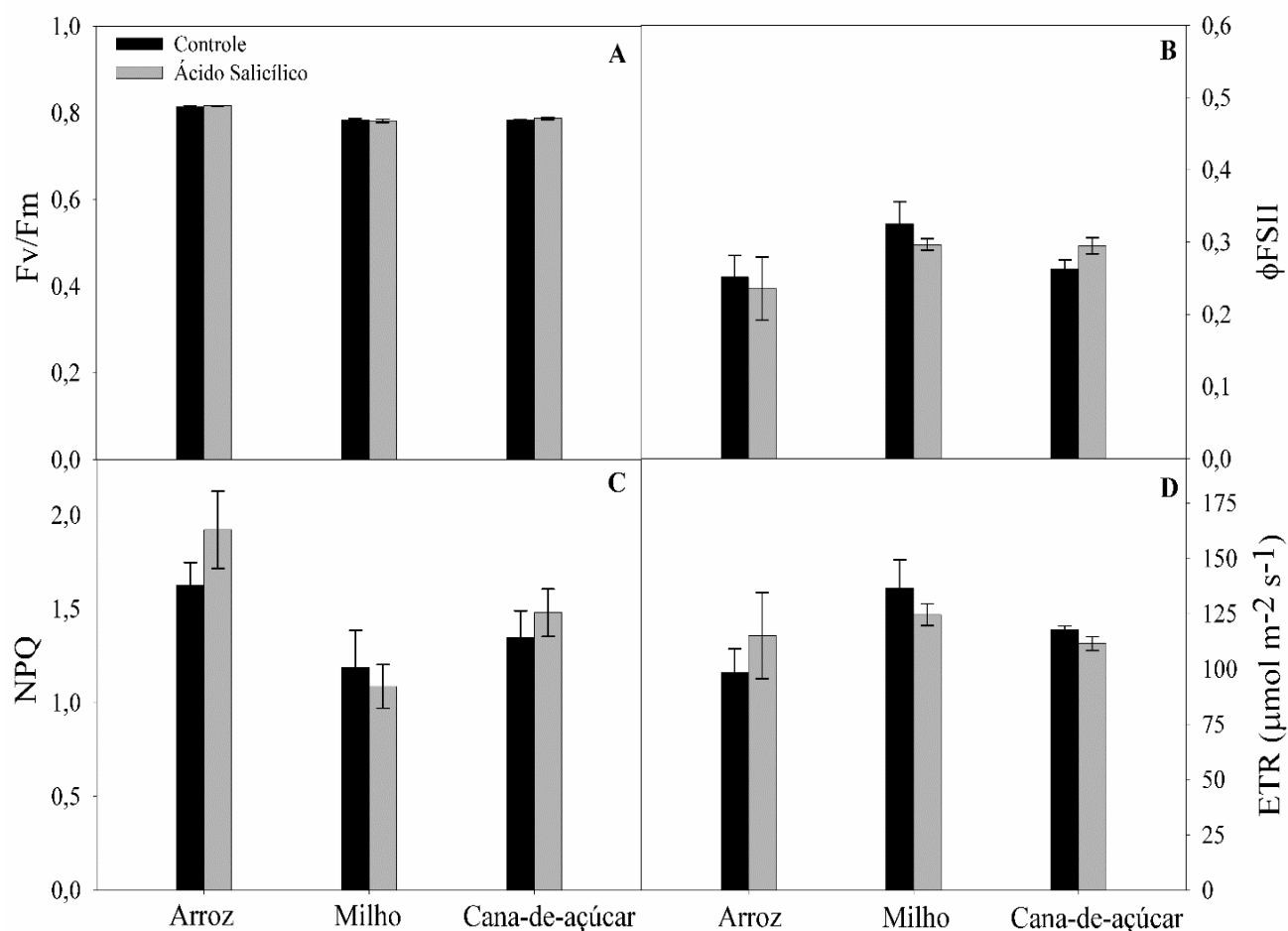


Figura 2. Análise da fluorescência da clorofila a de plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar após duas semanas de tratamento com ácido salicílico. A, rendimento quântico máximo do FSII (F_v/F_m). B, rendimento quântico efetivo do FSII (ϕ_{FSII}). C, dissipação de energia não-fotoquímica via ciclo das xantofilas (NPQ). D, taxa de transporte de elétrons (ETR). Valores representam a média \pm erro padrão (arroz e milho, n=3; cana-de-açúcar, n=6).

Os valores apresentados na Tabela 1 referem-se aos teores de pigmentos foliares analisados. Para as três espécies, não foram observadas diferenças estatísticas nos teores de clorofila a, clorofila b, clorofilas totais e na proporção clorofila a/b após o tratamento com o AS. No entanto, é interessante destacar que as plantas de arroz e milho, cultivadas em câmaras de crescimento, acumularam maiores teores de clorofila b do que as plantas de cana-de-açúcar, cultivadas em casa de vegetação, mas não houve diferença no teor de clorofila a entre as espécies. Como consequência, a razão clorofila a/b foi seis vezes superior nas plantas de cana, se comparadas às de arroz ou milho.

Tabela 1: Teor de pigmentos foliares (mg g^{-1} massa fresca) de arroz, milho e cana-de-açúcar, após tratamento por duas semanas com ácido salicílico: clorofila a, clorofila b, acúmulo de clorofilas totais (a+b) e razão clorofila a/clorofila b.

Espécies	Tratamento	Clorofila a	Clorofila b	a + b	a/b
Arroz	Controle	$1,457 \pm 0,131$	$2,416 \pm 0,415$	$3,874 \pm 0,302$	$0,603 \pm 0,128$
	AS	$1,361 \pm 0,029$	$2,651 \pm 0,126$	$4,012 \pm 0,105$	$0,513 \pm 0,030$
Milho	Controle	$1,256 \pm 0,035$	$2,842 \pm 0,125$	$4,099 \pm 0,118$	$0,442 \pm 0,002$
	AS	$1,267 \pm 0,025$	$2,838 \pm 0,035$	$4,105 \pm 0,010$	$0,446 \pm 0,005$
Cana-de-açúcar	Controle	$1,142 \pm 0,088$	$0,314 \pm 0,053$	$1,457 \pm 0,077$	$3,632 \pm 0,045$
	AS	$1,310 \pm 0,136$	$0,397 \pm 0,047$	$1,707 \pm 0,106$	$3,336 \pm 0,119$

Valores representam a média \pm erro padrão (arroz e milho, n=3; cana-de-açúcar, n=6).

3.2 Análise de metabólitos primários

Dentre as respostas de defesa das plantas, é provável que o metabolismo primário sofra alterações para suprir as necessidades celulares frente às adversidades ambientais. Por isso, a quantificação de alguns intermediários metabólicos foi realizada após a aplicação de AS. Os resultados dos teores de glicose, frutose, sacarose, amido, aminoácidos e proteínas encontram-se na Figura 3. Não foram observadas alterações nas quantidades desses metabólitos, após a aplicação de AS, nas plantas de arroz e milho. Porém, as plantas de cana-de-açúcar tratadas com AS apresentaram reduções de 54% tanto no teor de

glicose (Figura 3A) como no de aminoácidos (Figura 3E), e de 11% no teor de sacarose (Figura 3C).

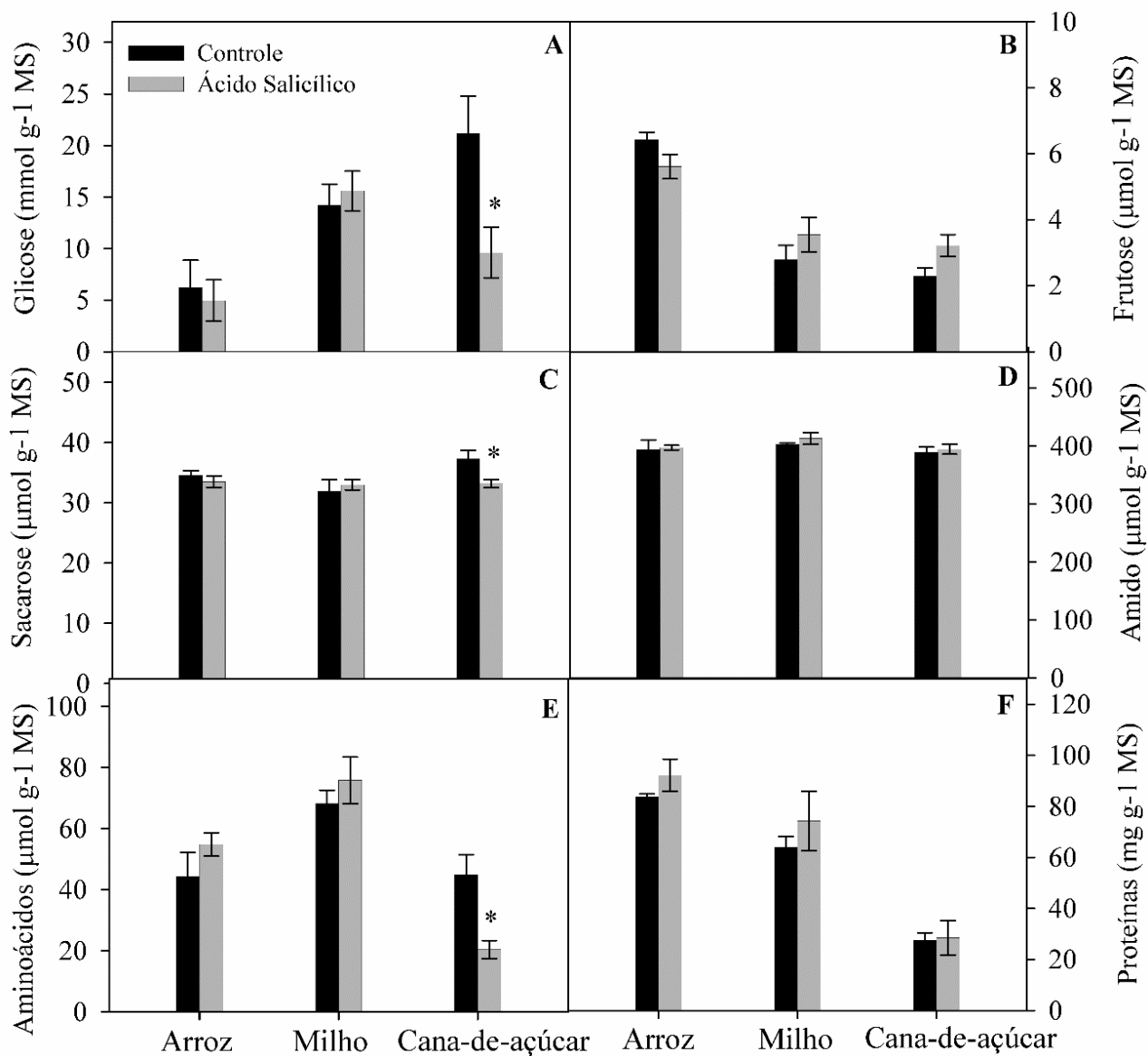


Figura 3. Teor de metabólitos em plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar após duas semanas de tratamento com ácido salicílico. A, glicose. B, frutose. C, sacarose. D, amido. E, aminoácidos. F, proteínas. Valores representam a média ± erro padrão (arroz e milho, n=3; cana-de-açúcar, n=6), e os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle pelo teste t de Student ($p < 0,05$). MS: massa seca.

3.3 Avaliação do sistema antioxidante e danos celulares

Para investigar se a aplicação de AS causou danos oxidativos, foram determinados os teores de $O_2^{\bullet-}$ (Figura 4A), H_2O_2 (Figura 4B) e malonaldeído (Figura 4C), e também as atividades das enzimas removedoras de EROs (Figura 5).

Os resultados indicam que a aplicação de AS não influenciou a produção de EROs nas plantas de milho, que também não apresentaram variação nos valores de malonaldeído (MDA). As plantas de cana-de-açúcar apresentaram aumento de 50% no teor de $O_2^{\bullet-}$ após o tratamento com AS, mas não houve mudanças nos níveis de H_2O_2 e MDA. Curiosamente, as plantas de arroz reduziram os níveis de $O_2^{\bullet-}$ em 55%, de H_2O_2 em 17% e de MDA em 27%, após o tratamento com AS.

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) não variou em nenhuma das espécies. Após a aplicação de AS, houve redução na atividade da catalase (CAT) de 30% no arroz, e de 37% na atividade da peroxidase do ascorbato (APX) no milho. As plantas de cana apresentaram aumento de 52% na atividade da peroxidase inespecífica (POX), enquanto nas outras espécies não houve diferença significativa.

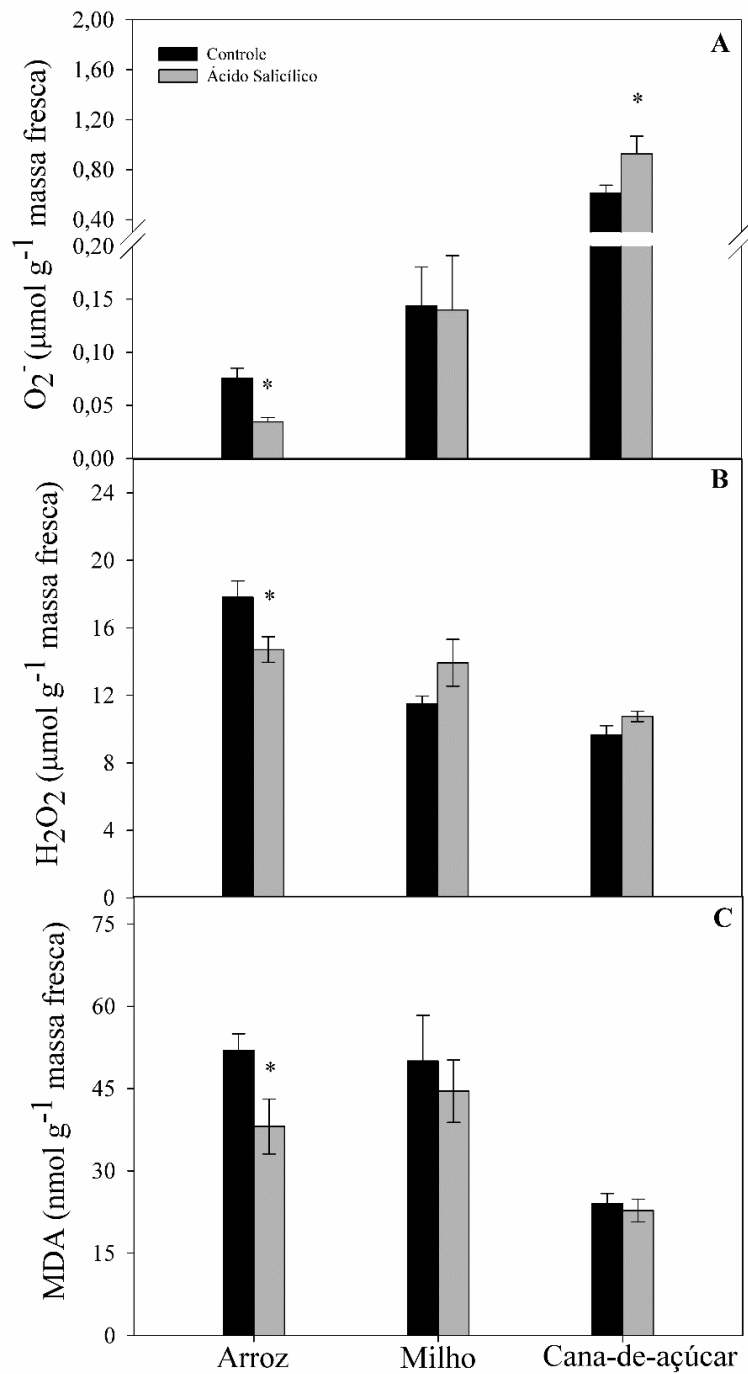


Figura 4. Determinação de espécies reativas de oxigênio e malonaldeído em plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar após duas semanas de tratamento com ácido salicílico. A, ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$). B, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). C, malonaldeído (MDA). Valores representam a média \pm erro padrão (arroz e milho, n=3; cana-de-açúcar, n=6), e os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

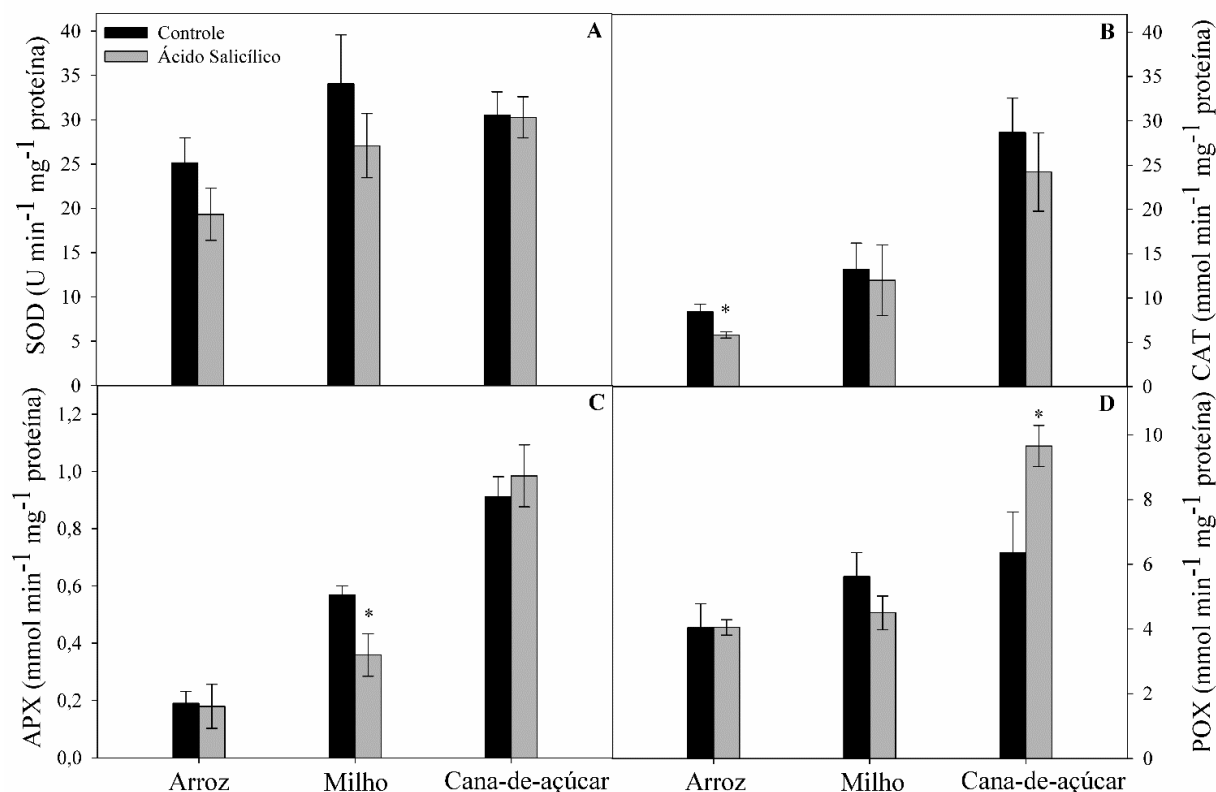


Figura 5. Atividade de enzimas do sistema antioxidante em plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar após duas semanas de tratamento com ácido salicílico. A, dismutase do superóxido (SOD). B, catalase (CAT). C, peroxidase do ascorbato (APX). D, peroxidase inespecífica (POX). Valores representam a média ± erro padrão (arroz e milho, n=3; cana-de-açúcar, n=6), e os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

3.4 Fenólicos totais e atividades da FAL e TAL

A influência da aplicação de AS na rota dos fenilpropanóides foi investigada pela determinação do teor de fenólicos totais e das atividades das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) e tirosina amônia-liase (TAL). O teor de fenólicos totais não variou nas plantas de milho e cana-de-açúcar, mas reduziu em 15% nas plantas de arroz tratadas com AS (Figura 6).

Os valores de atividade das enzimas FAL e TAL não se alteraram nas plantas de arroz, mas foram significativamente inferiores nas plantas de milho e cana tratadas com AS (Figura 7). Em cana-de-açúcar, foi observada redução de 40% na atividade da FAL e de 47% na da TAL. Em milho a redução foi de aproximadamente 60% na atividade das duas enzimas.

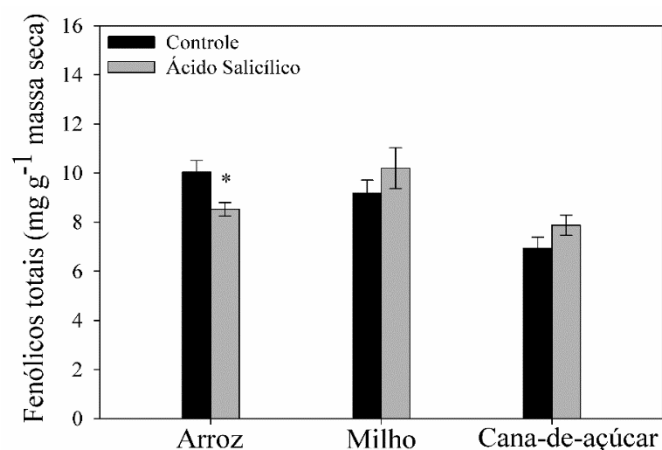


Figura 6. Teor de fenólicos totais em plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar após duas semanas de tratamento com ácido salicílico. Valores representam a média \pm erro padrão (arroz e milho, n=3; cana-de-açúcar, n=6), e os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

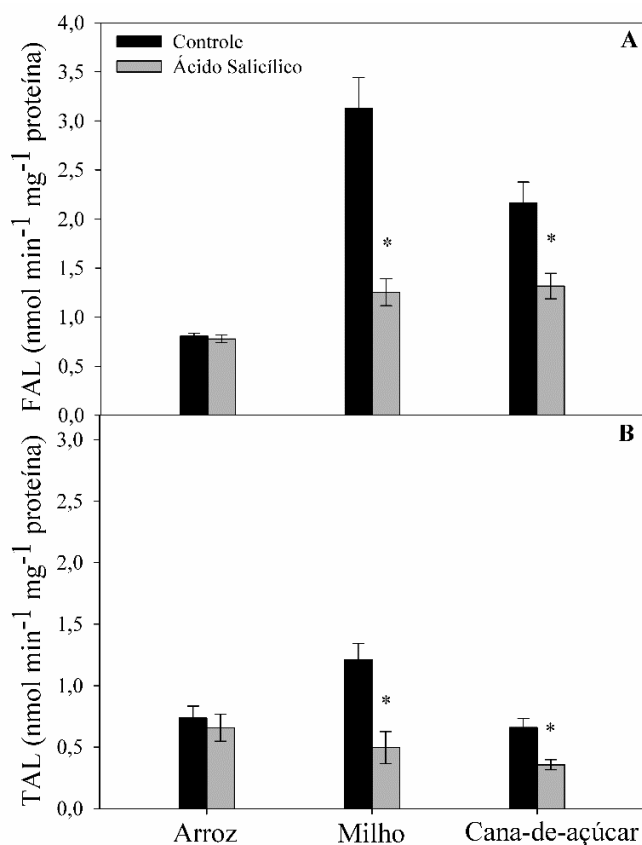


Figura 7. Atividade de enzimas da rota dos fenilpropanóides em plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar após duas semanas de tratamento com ácido salicílico. A, fenilalanina amônia-liase (FAL). B, tirosina amônia-liase (TAL). Valores representam a média \pm erro padrão (arroz e milho, n=3; cana-de-açúcar, n=6), e os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

3.5 Análise da parede celular

Os principais componentes químicos da parede celular foram determinados ao final do tratamento com AS. Os resultados dos teores de lignina e celulose encontram-se na Figura 8. Não foram observadas diferenças nas proporções desses compostos em nenhuma das espécies.

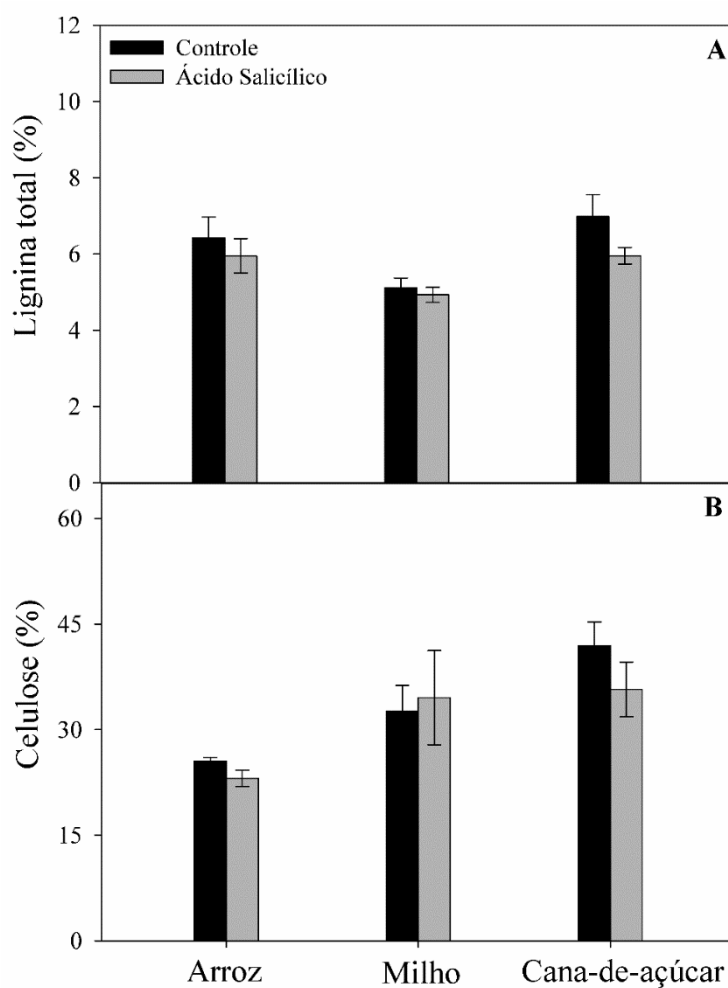


Figura 8. Compostos químicos da parede celular de plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar após duas semanas de tratamento com ácido salicílico. A, lignina. B, celulose. Valores representam a média \pm erro padrão (arroz e milho, n=3; cana-de-açúcar, n=6).

Também foram quantificados os monossacarídeos arabinose, galactose e glicose presentes nas cadeias de hemicelulose (Figura 9). O conteúdo desses compostos não se

alterou nas plantas de arroz e milho, mas as plantas de cana-de-açúcar apresentaram aumento de 82% no teor de glicose, após a aplicação de AS.

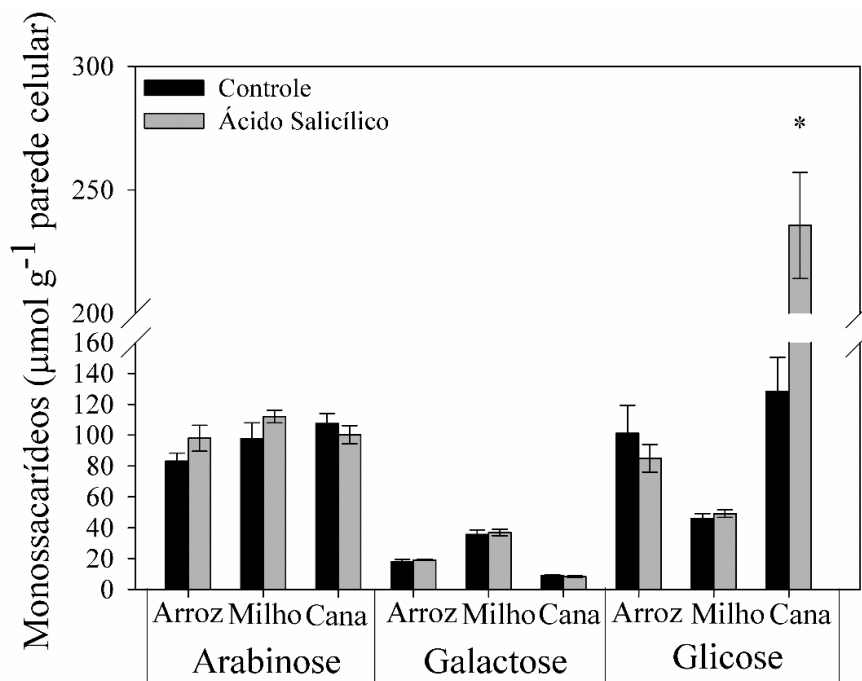


Figura 9. Monossacarídeos da fração hemicelulósica da parede celular de plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar após duas semanas de tratamento com ácido salicílico. Valores representam a média \pm erro padrão (arroz e milho, $n=3$; cana-de-açúcar, $n=6$), e os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

Os valores de parede celular/massa seca indicam que o tratamento com AS não alterou o fluxo de carbono para a parede celular nas folhas +3 das três espécies, mesmo com o aumento do teor de glicose observado nas plantas de cana (Tabela 2). Observa-se também que não houve alteração na relação celulose/lignina, o que indica que as ligações na parede entre a matriz de polissacarídeos com a lignina não foram alteradas em nenhuma das espécies.

Tabela 2: Relações de parede celular/massa seca (parede/MS) e celulose/lignina em plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar, após tratamento com ácido salicílico

Espécies	Tratamento	Parede/MS	Celulose/Lignina
Arroz	Controle	0,6563 ± 0,028	3,873 ± 0,375
	AS	0,6628 ± 0,084	3,881 ± 0,561
Milho	Controle	0,3680 ± 0,049	6,442 ± 0,520
	AS	0,4262 ± 0,016	7,010 ± 0,820
Cana-de-açúcar	Controle	0,4828 ± 0,079	6,598 ± 0,675
	AS	0,5897 ± 0,076	6,276 ± 0,826

Valores representam a média ± erro padrão (arroz e milho, n=3; cana-de-açúcar, n=6).

O efeito do AS sobre a recalcitrância da parede celular foi avaliado pelo rendimento de sacarificação, ou seja, pela liberação de açúcares (glicose) presentes na parede. A sacarificação foi avaliada após o pré-tratamento inicial. Foram empregados dois tipos de pré-tratamento: ácido (0,5% H₂SO₄) ou básico (4% NaOH). Os resultados mostram que não foram observadas diferenças significativas nos rendimentos de sacarificação, nas três espécies, após o tratamento com AS, independente do pré-tratamento realizado na parede (Figura 10).

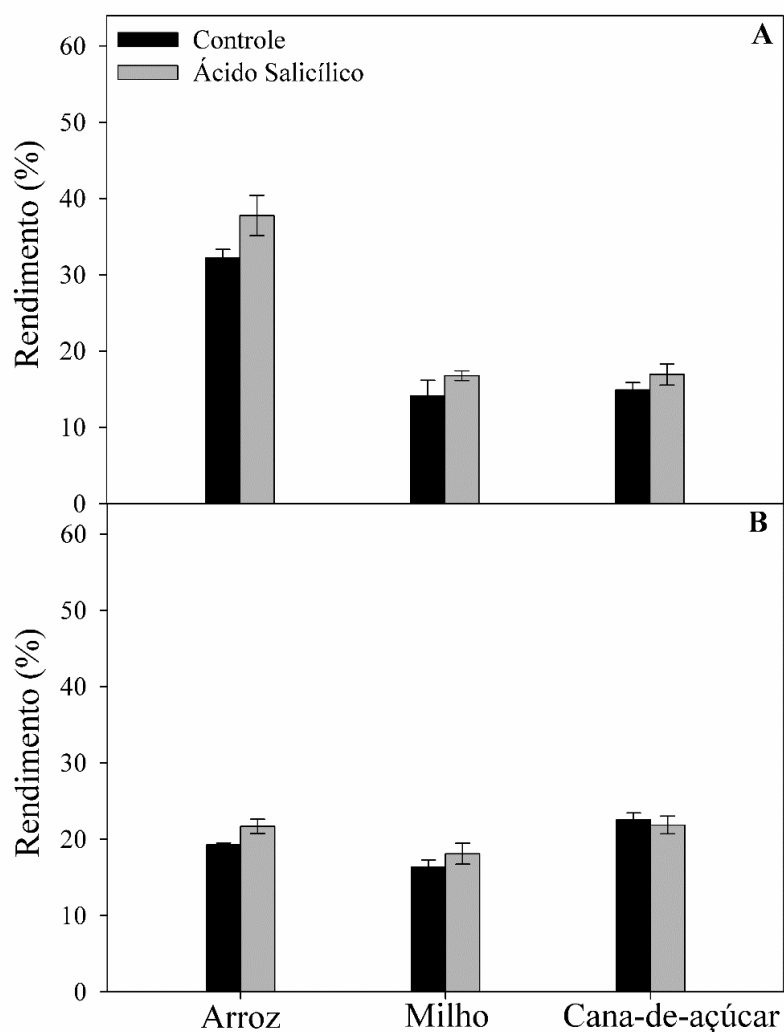


Figura 10. Rendimento de sacarificação (%) da parede celular de plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar após duas semanas de tratamento com ácido salicílico. A, rendimento de sacarificação após pré-tratamento da parede com 0,5% H₂SO₄. B, rendimento de sacarificação após pré-tratamento da parede com 4% NaOH. Valores representam a média ± erro padrão (arroz e milho, n=3; cana-de-açúcar, n=6).

3.6 Análise de componentes principais

As três componentes principais (PC1, PC2 e PC3) são responsáveis por 67,1% da informação contida no conjunto das 24 variáveis originais analisadas. O PC1 explicou 34% da variação total dos dados, o PC2 contribuiu com 23% e o PC3 com 10,2%.

A dispersão gráfica dos componentes principais possibilitou a formação de três grupos entre os tratamentos: arroz, milho e cana-de-açúcar (Figura 11). É possível observar que, apesar da variação apresentada entre os tratamentos controle e ácido salicílico,

diferenças no metabolismo das três espécies foram essenciais para a separação dos pontos.

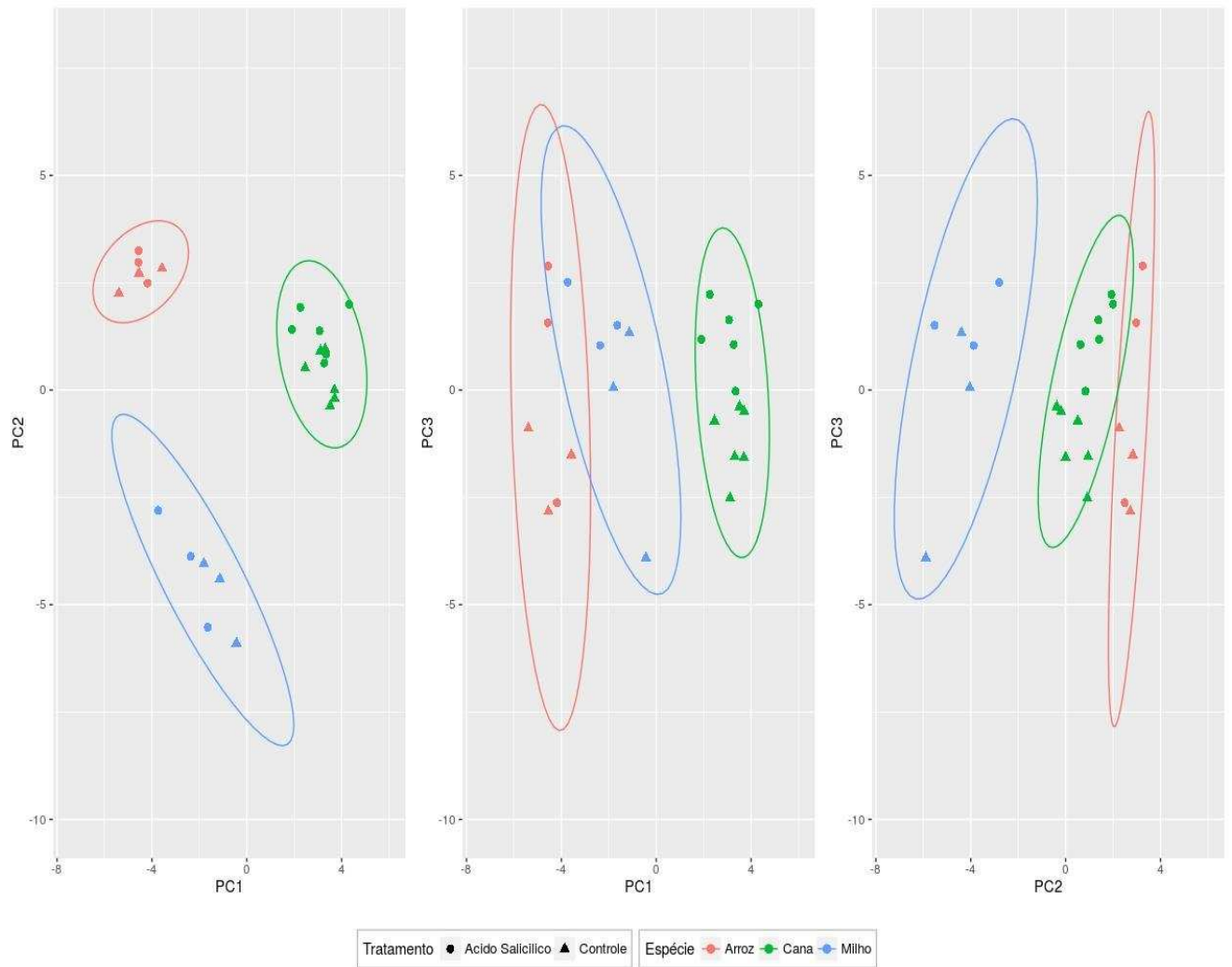


Figura 11. Dispersão gráfica dos tratamentos em função das três primeiras componentes principais.

4. DISCUSSÃO

Uma importante consideração a ser feita quando se aplica elicitores em plantas, como o AS, é garantir que o tratamento promova um aumento nos níveis endógenos do composto, e que ele seja suficiente para gerar uma resposta. De acordo com Horváth et al. (2007), o uso do AS, em concentrações entre 50–500 μM , pode ser considerado como a indução de um estresse moderado, pois são observadas alterações no estado oxidativo das plantas muito similares às observadas durante a aclimação a estresses. Mas, em elevadas concentrações, o AS pode causar um estresse oxidativo muito severo, a ponto de prejudicar a sobrevivência das plantas (Kováčik et al. 2009; War et al. 2011).

O uso do AS como elicitor produz diversos efeitos nas plantas, de modo que a natureza dessas repostas depende da espécie, do estágio de desenvolvimento da planta, da dosagem utilizada e do tempo de exposição ao tratamento (Campos-Vargas e Saltveit 2002; Hayat et al. 2012; Engelberth et al. 2011; Akbulut 2014).

Neste trabalho, investigou-se o efeito do AS (100 μM) como elicitor na indução do sistema de defesa de plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar, por meio de análises fisiológicas e bioquímicas após duas semanas de tratamento. As características metabólicas, inerentes a cada espécie, influenciaram profundamente as repostas obtidas ao tratamento com AS. Não houve, por exemplo, agrupamento das repostas observadas em milho e cana-de-açúcar, duas gramíneas do tipo C4, nem a separação dessas com o arroz, que é do tipo C3.

O teor das clorofilas a e b não foi alterado em nenhuma das espécies após o tratamento com o AS. Porém, há exemplos na literatura de que o conteúdo de pigmentos foliares pode variar de acordo com a dosagem utilizada. Foram observados aumento no teor de clorofilas totais (a + b), após aplicação de baixas dosagens de AS (50–100 μM), em folhas de caupi (Chandra e Bhatt 1998), mostarda (Fariduddin et al. 2003) e *Brassica napus* (Ghai et al. 2002); e redução desses pigmentos em folhas de *Arabidopsis thaliana* (Rao et al. 1997), trigo (Moharekar et al. 2003) e *Matricaria chamomilla* (Kováčik et al. 2009), após aplicação de AS em elevadas dosagens (0,25–1 mM).

As plantas de cana-de-açúcar cresceram em casa de vegetação (aproximadamente $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e apresentaram resultados de pigmentos foliares condizentes à espécie (Silva et al. 2013). No entanto, as plantas de arroz e milho cresceram em câmaras de

crescimento com $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e apresentaram elevados teores de clorofila b e reduzida razão clorofila a/clorofila b, que são características de plantas crescidas em condição de sombreamento, que também foram observadas por Drozak e Romanowska (2006) em milho, e por Zhu et al. (2008) em arroz. O acúmulo de uma maior proporção de clorofila b é uma característica importante que plantas sombreadas apresentam, pois possibilita a captação e transferência de energia de outros comprimentos de onda para a molécula de clorofila a, que efetivamente participa das reações fotoquímicas da fotossíntese (Thornber 1975). No entanto, os autores daqueles estudos relataram que as plantas de arroz e milho sombreadas apresentaram reduzida capacidade fotossintética. Em nosso trabalho, os valores médios de A de arroz e milho foram similares aos observados por outros autores que trabalharam com plantas dessas espécies sem restrição de luz (Sanglard et al. 2014; Zhong et al. 2014). Assim, caso a irradiância utilizada no experimento com arroz e milho tenha sido limitante, pode-se inferir que a fotossíntese nessas plantas foi insensível a esta condição.

A fotossíntese pode sofrer limitação por processos de ordem difusiva ou bioquímica. A primeira refere-se às resistências estomáticas e mesofílicas que o CO_2 encontra à sua difusão, desde a atmosfera até os sítios de carboxilação nos cloroplastos; e a segunda à fixação de CO_2 , pela Rubisco (Flexas et al. 2008). Além disso, uma vez que a fotossíntese envolve uma série de componentes, como pigmentos fotossintéticos, fotossistemas, cadeia de transporte de elétrons e reações de redução do CO_2 , qualquer tipo de dano gerado por um fator estressante pode restringir a capacidade fotossintética da planta (Ashraf and Harris 2013). Os resultados indicam que o AS não prejudicou o aparato fotossintético das plantas de arroz, milho e cana-de-açúcar, baseado na análise dos resultados de fluorescência da clorofila a. Além disso, o AS promoveu o aumento da atividade fotossintética e da condutância estomática das três espécies. Se o aumento da g_s fosse a principal causa do aumento dos valores de A, era de se esperar que a concentração intracelular de CO_2 fosse superior, mas isso não foi observado.

A função da fotossíntese no sistema de defesa das plantas é uma questão que ainda exige elucidação fisiológica e molecular. Diferentes patógenos, baseados em seu ciclo de vida (biotrófico ou necrotófico), impactam diferencialmente a eficiência fotossintética das plantas (Ashraf e Harris 2013). Em algumas infecções ocorre a indução de morte celular programada nos locais da lesão, com a formação de regiões necróticas rodeadas de tecidos saudáveis, que persistem para fornecer fontes de carbono ao patógeno. Essas

áreas apresentam elevadas taxas fotossintéticas (Selvaraj e Fofana 2012). Não se sabe, ao certo, quais são os sinais envolvidos na indução da fotossíntese nesses casos, mas foi sugerido que o AS possa participar dessa sinalização, pois folhas de milho injetadas com solução de AS a 1 mM aumentaram sua taxa fotossintética (Zhou et al. 1999). No entanto, na literatura há diversos relatos que apontam que o tratamento com AS pode tanto aumentar quanto reduzir a taxa fotossintética de plantas (Fariduddin et al. 2003; Khan et al. 2003; Khodary 2004; Liu et al. 2011; Ghasemzadeh e Jaafar 2013; Vineeth et al. 2015). Isso pode parecer contraditório, mas, na verdade, indica que o efeito do AS sobre a fotossíntese não depende apenas de cada espécie, mas também das dosagens aplicadas, do modo de aplicação (injeção, aspersão foliar, adição na solução hidropônica, pré-embebição de sementes) ou duração do tratamento (Hayat et al. 2012; Janda et al. 2014).

Uma das primeiras respostas observadas em plantas que sofrem ataque de patógenos, ou que são tratadas com elicitores, é o aumento na produção de EROs, também conhecido por explosão oxidativa (Wojtaszek 1997). As EROs possuem um papel fundamental nas vias de sinalização celular durante a percepção do patógeno, alterando a expressão de diferentes genes e reprogramando rotas metabólicas que, enfim, produzirão respostas de defesa (Van Loon et al. 2006; Sewelam et al. 2016). Dentre os mecanismos de defesa mediados pelas EROs podem ser citados a atuação direta dessas moléculas sobre o patógeno, inibindo seu desenvolvimento; o fortalecimento da parede celular, através de alterações nas ligações cruzadas entre os compostos químicos da parede celular; indução da morte celular programada nas regiões infectadas, de modo a restringir a invasão do patógeno; ativação da biossíntese de outros mensageiros secundários que regulam a produção de compostos de defesa, como o ácido jasmônico ou o ácido salicílico (Zurbriegen et al. 2010).

Por serem moléculas altamente reativas, é necessário que as plantas mantenham os níveis homeostáticos das EROs para proteger a integridade do metabolismo celular. Assim, as plantas desenvolveram mecanismos antioxidantes cuja regulação possui um ajuste fino para balancear os níveis de EROs nas células (Gill e Tuteja 2010). A enzima SOD é a primeira a atuar no sequestro das EROs, realizando a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , que em seguida é convertido em H_2O e O_2 por enzimas como a CAT, APX ou POX (Asada 2006).

A ativação do metabolismo antioxidante pela aplicação exógena de AS já foi estudada em outros trabalhos (Rao et al., 1997; He et al., 2005; (He et al. 2005; Shi et al. 2006; Ghasemzadeh e Jaafar 2013). A dosagem aplicada, e o tempo de exposição parecem ser críticos para a indução de mecanismos antioxidantes. Por exemplo, plantas de camomila tratadas com AS a 50 μM , por 7 dias, foram capazes de neutralizar as EROs induzidas com o tratamento, e danos oxidativos não foram observados. Quando tratadas com AS a 250 μM , pelo mesmo período, a atividade de peroxidases chegou a triplicar, mas isso não foi suficiente para evitar os efeitos tóxicos do acúmulo de EROs, pois o aumento na produção de MDA (40% superior ao controle) foi acompanhado da redução do crescimento, da degradação de clorofilas e da murcha foliar (Kováčik et al. 2009). Em cultura de células de *Salvia miltiorrhiza*, foi verificado que após 8 horas de exposição ao AS a 100 μM , as enzimas CAT e POX apresentaram um pico de atividade, que decaiu ao nível do tratamento controle nas 16 horas seguintes (Dong et al. 2010). Neste trabalho, os resultados da análise do metabolismo antioxidante em resposta ao AS foram diferentes para cada espécie estudada. É preciso destacar que os dados de MDA indicam que as cinco aplicações de AS, nas duas semanas de tratamento, não causaram danos oxidativos nas folhas analisadas. A coleta do material foliar, para todas as análises, foi realizada 48 horas após a última aplicação de AS. É provável que o período entre a aplicação e a coleta tenha sido extenso demais para capturar a dinâmica de liberação das EROs, e os componentes envolvidos no metabolismo antioxidante, principalmente nas plantas de milho e arroz, cujos níveis de EROs já se encontravam balanceados no momento da coleta. Nas plantas de cana-de-açúcar, é possível especular que o aumento no teor $\text{O}_2^{\bullet-}$, após o tratamento com AS, tenha sido efetivamente neutralizado pela atividade basal da SOD. Aliás, dentre as enzimas responsáveis pela remoção do excesso de H_2O_2 gerado, a POX foi provavelmente a mais atuante.

É interessante notar que as respostas de defesa que as plantas apresentam não são uniformemente expressas em todos os órgãos ou tecidos. Ao contrário, tem-se que a qualidade e a quantidade de estratégias de defesa são continuamente ajustadas por sinais ambientais ou do desenvolvimento do vegetal. Segundo a teoria da defesa ótima, o fornecimento de compostos de defesa se concentra nas regiões que mais contribuirão com o futuro fitness das plantas, como tecidos em desenvolvimento com elevada força-dreno ou estruturas reprodutivas (Meldau et al. 2012). Apesar dessas diferenças, neste trabalho foram estudadas apenas folhas maduras.

Os compostos fenólicos dão base para que as plantas utilizem diferentes mecanismos para garantir sua defesa, como modificações físicas, a partir da lignificação e suberização da parede celular; mudanças metabólicas, como síntese de novo de proteínas RP, e síntese e acúmulo de fenilpropanóides, como as fitoalexinas (Daayf et al. 2012). A habilidade das plantas de conter a infecção de patógenos depende do quão rápida é a produção desses metabólitos secundários, o que, pelo menos em parte, depende diretamente da agilidade de mobilização de fontes de carbono para o local da infecção (Christiansen et al., 1987).

O aumento no teor de fenólicos totais é uma resposta bastante reportada por estudos que utilizaram o AS como elicitor (Campos-Vargas e Saltveit, 2002; Fariduddin et al. 2003; Kováčik et al. 2009; Neelam et al. 2014). No trabalho de Napoleão (2015), a aplicação de AS 100 μ M dobrou o teor de fenólicos totais nas folhas de *Brachypodium distachyon*. Pela análise de cromatografia líquida de alta performance (CLAE), foi verificado aumento significativo nos níveis dos ácidos ferúlico, p- cumárico e caféico, e também de naringerina (fitoalexina), importantes compostos envolvidos nas respostas de defesa (Dixon e Paiva 1995; Bhattacharya et al. 2010). Neste trabalho, a aplicação de AS reduziu o teor de fenólicos totais nas folhas +3 de arroz, mas não houve diferença nas folhas avaliadas no milho e na cana. Era de se esperar que o aumento da fotossíntese, nas três espécies, refletisse em maior investimento de carbono para a produção de compostos fenólicos, para amparar a defesa das folhas. Mas isso não foi observado, pelo contrário, o decréscimo nas atividades das enzimas FAL e TAL, em milho e cana, indicam que houve redução do influxo de compostos intermediários para a rota dos fenilpropanóides. Assim, pela análise conjunta dos resultados de trocas gasosas e dos metabolismos primário e secundário, sugere-se que nas plantas de arroz, milho e cana, o estímulo dado com o AS induziu o sistema de defesa das plantas, que priorizaram, como estratégia de propagação, defender outros órgãos nas plantas. Uma vez que esses órgãos não possuíam estoque de fotoassimilados suficiente para montar a defesa, para compensar essa necessidade, as folhas maduras (p. ex. folha +3) aumentaram sua taxa fotossintética para translocar fontes de carbono a eles. Uma outra possibilidade seria que o aumento do carbono fixado foi direcionado para o crescimento das plantas, mas não há dados biométricos que comprovem essa sugestão.

Alguns estudos indicam que o acúmulo de açúcares solúveis, nos locais de infecção na folha, represente uma maior capacidade de montar repostas de defesa (Goicoechea

et al. 2000; Guérard et al. 2007). Em tomate, foi observado aumento significativo no conteúdo de glicose nas folhas, um dia após a aplicação de AS a 100 μ M (Poór et al. 2011). Isso também foi observado em plântulas de pepino, após seis dias de tratamento com AS a 100 μ M (Dong et al. 2011). Os resultados de metabólitos primários indicam que talvez a força-dreno de outros órgãos de plantas de cana-de-açúcar tenha sido superior à das plantas de arroz e milho, uma vez que na cana foi observado o consumo não apenas de carboidratos, mas também de aminoácidos, cuja degradação produz uma série de subprodutos utilizados no ciclo dos ácidos tricarboxílicos como fonte de energia (Pratelli e Pilot 2014). Como não houve diferença na taxa respiratória dessas plantas após o tratamento com AS (dados não apresentados), sugere-se que as folhas maduras de cana lançaram mão de suas reservas para enviar fontes de carbono a outros órgãos.

A visão tradicional de que a parede celular seja uma barreira estrutural passiva evoluiu para um conceito que a considera como uma estrutura dinâmica, que participa da regulação de mecanismos de defesa constitutivos e induzidos, além de ser responsável pela liberação de moléculas sinalizadoras que acionam o sistema de defesa (Zhao e Dixon 2014). A percepção dos fatores estressantes parece envolver diferentes proteínas cinases, que transmitem um sinal para a célula ao perceber alterações no espaço extracelular, através de mensageiros secundários, como as EROs e fitohormônios, ou da fosforilação de fatores de transcrição ou proteínas sinalizadoras (Tenhaken 2015). Em resposta a estresses bióticos, em geral, as plantas investem em alterações para reforçar a parede, como aumento da deposição de lignina, deposição de calose, modificações estruturais de polissacarídeos que compõem a parede, e síntese e acúmulo de fitoalexinas (Sasidharan et al. 2011; Malinovsky et al. 2014; Bellincampi et al. 2014).

A parede celular primária, abundante em células em crescimento, é composta, basicamente, por celulose, hemiceluloses, pectina e proteínas. A parede celular secundária é depositada entre a membrana plasmática e a parede primária, apenas quando o crescimento é cessado. Em gramíneas, a parede secundária é composta por celulose, hemiceluloses (glucuronoarabinoxilanos), lignina e elevado teor de ácidos hidróxicinâmicos (p. ex. ácidos ferúlico e p-cumárico) (Vogel 2008). Foi devido a essas diferenças de composição química que as folhas +3 foram coletadas para as análises, pois se tratam de órgãos maduros com parede secundária formada, cujo teor de lignina, celulose e alguns monômeros de hemicelulose foram quantificados aqui. Os resultados obtidos neste trabalho são condizentes com os citados na literatura, sobre o teor dos compostos químicos da parede

celular de arroz (Yokoyama e Nishitani 2004), milho (Santiago et al. 2013) e cana-de-açúcar (de Carli Poelking et al. 2015).

A recalcitrância da parede celular refere-se às propriedades químicas que naturalmente conferem resistência à parede contra a degradação, por microorganismos ou enzimas (McCann e Carpita 2008). Embora a lignina seja tida como sendo um dos principais componentes envolvidos na recalcitrância da parede (Gilbert 2010), alguns trabalhos mostram que a cristalinidade da celulose (Harris et al. 2009; Papa et al. 2012) e o teor e composição química das hemiceluloses (Cook et al. 2012; Xu et al. 2012) também influenciam nessa propriedade. No trabalho de Napoleão (2015) com *B. distachyon*, o tratamento com AS reduziu em 10% o teor de lignina, mas promoveu o aumento de 15% na recalcitrância na parede, que foi correlacionado com aumento nos níveis dos ácidos ferúlico e p-cumárico nas folhas. Neste trabalho, não foram observadas alterações nos teores dos compostos químicos da parede, após o tratamento com AS, a não ser pelo aumento da glicose na fração hemicelulósica da parede das plantas de cana-de-açúcar. Apesar disso, a recalcitrância da parede das três espécies não alterou. Aliás, não houve investimento na alocação de carbono para a parede. Esses resultados corroboram a sugestão apresentada, de que não foi constatado investimento para a proteção das folhas +3 de arroz, milho e cana, em resposta ao tratamento com AS.

Além da proposição construída a partir dos resultados obtidos neste trabalho, é necessário fazer duas ponderações. A primeira diz respeito ao possível sombreamento não intencional que as plantas de arroz e milho experimentaram. Plantas sombreadas acumulam maiores proporções de moléculas de fitocromo na sua forma inativa (Li et al. 2011). Em um estudo com *Arabidopsis*, foi verificado que plantas duplo-mutantes phyA-phyB (não possuem os receptores dos fitocromos A e B), quando tratadas com AS na concentração de 250 μ M, apresentaram 48 horas depois um décimo da expressão do gene que codifica a proteína RP1 (antifúngica), quando comparadas ao tipo selvagem (Genoud et al. 2002). Os autores do trabalho concluíram que, em *Arabidopsis*, respostas de defesa induzidas pelo AS parecem ser correlacionadas com vias de sinalização reguladas por fitocromos. Por essa razão, não se pode desconsiderar a possibilidade de que o sombreamento tenha reduzido a sensibilidade das plantas de arroz e milho ao tratamento com AS.

A segunda consideração é relativa ao estágio de desenvolvimento das folhas coletadas para a realização das análises. Foi observado que a capacidade de desenvolver

respostas de defesa, contra o ataque de patógenos, decresce com a idade das folhas (Koch and Mew 1991; Kus 2002). Em alface, verificou-se que a atividade basal da enzima FAL foi correlacionada com a idade das folhas avaliadas (Campos-Vargas e Saltveit, 2002). Folhas jovens apresentaram o dobro de atividade enzimática se comparadas às maduras. Além disso, 24 horas após a aplicação de AS 100 μ M, houve aumento significativo na atividade da FAL nas folhas jovens, enquanto as folhas maduras tratadas não diferiram do controle. Os autores inferiram que talvez as folhas maduras possuam maior capacidade de inativar, conjugar ou compartimentalizar o AS aplicado, se comparadas às folhas jovens; ou, que talvez órgãos de idades diferentes possuam limites distintos acima do qual o nível endógeno de AS deva alcançar para induzir as respostas de defesa. Dessa maneira, não se pode rejeitar a possibilidade de as folhas +3 terem sido pouco sensíveis ao tratamento com AS, por se tratarem de órgãos maduros.

Os resultados sugerem que diferentes fatores possam influenciar as repostas que o sistema de defesa orchestra, em resposta ao uso do ácido salicílico como elicitador. Deve-se considerar, em estudos futuros: conduzir o experimento em casa de vegetação; testar outras dosagens de AS, além da utilizada no presente estudo; coletar amostras após diferentes tempos de exposição; coletar amostras de diferentes órgãos (p. ex. folhas jovens e maduras); quantificar os níveis endógenos de AS; quantificar outros intermediários dos metabolismos primário e secundário, para investigar outros compostos relacionados com as repostas de defesa; e investigar se há diferenças nas repostas de defesa quando o AS é aplicado nas fases vegetativa ou reprodutiva das plantas.

5. CONCLUSÕES

Em arroz, milho e cana-de-açúcar, o ácido salicílico induziu o metabolismo primário nas folhas avaliadas, mas não houve investimento de carbono para o metabolismo secundário dessas folhas. Diferenças metabólicas inerentes a cada espécie influenciaram a resposta ao tratamento com ácido salicílico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbulut GB (2014) Investigation of the Effects of Salicylic Acid on Some Biochemical Parameters in *Zea mays* to Glyphosate Herbicide. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*. doi: 10.4172/2161-0525.1000271
- Arimura G, Kost C, Boland W (2005) Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1734:91–111. doi: 10.1016/j.bbalip.2005.03.001
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82:1227–1238.
- Asada K (2006) Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology* 141:391–396. doi: 10.1104/pp.106.082040
- Ashraf M, Harris PJC (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51:163–190. doi: 10.1007/s11099-013-0021-6
- Baxter HL, Stewart CN (2013) Effects of altered lignin biosynthesis on phenylpropanoid metabolism and plant stress. *Biofuels* 4:635–650. doi: 10.4155/bfs.13.56
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44:276–287.
- Bellincampi D, Cervone F, Lionetti V (2014) Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00228
- Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V (2010) The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection: Phenolics in *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology*. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00625.x
- Boveris A (1984) [57] Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 429–435
- Cakmak I, Horst WJ (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83:463–468. doi: 10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x
- Campos-Vargas R, Saltveit ME (2002) Involvement of putative chemical wound signals in the induction of phenolic metabolism in wounded lettuce. *Physiologia Plantarum* 114:73–84.
- Cesarino I, Araújo P, Domingues Júnior AP, Mazzafera P (2012) An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance. *Brazilian Journal of Botany* 35:303–311.

- Chance B, Maehly AC (1955) [136] Assay of catalases and peroxidases: In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 764–775
- Chandra A, Bhatt RK (1998) Biochemical and Physiological Response to Salicylic Acid in Relation to the Systemic Acquired Resistance. *Photosynthetica* 35:255–258. doi: 10.1023/A:1006966908357
- Cook CM, Daudi A, Millar DJ, et al (2012) Transcriptional changes related to secondary wall formation in xylem of transgenic lines of tobacco altered for lignin or xylan content which show improved saccharification. *Phytochemistry* 74:79–89. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.10.009
- Daayf F, El Hadrami A, El-Bebany AF, et al (2012) Phenolic Compounds in Plant Defense and Pathogen Counter-Defense Mechanisms. In: *Recent Advances in Polyphenol Research*. Wiley-Blackwell, pp 191–208
- de Carli Poelking VG, Giordano A, Ricci-Silva ME, et al (2015) Analysis of a Modern Hybrid and an Ancient Sugarcane Implicates a Complex Interplay of Factors in Affecting Recalcitrance to Cellulosic Ethanol Production. *PloS one* 10:e0134964.
- Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant Defences under Hyperoxygenic and Hyperosmotic Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with Differential Sensitivity to Drought. *Plant and Cell Physiology* 34:1023–1028.
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7:1085.
- Dixon R, Harrison M, Lamb C (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* 32:479–501.
- Dong C-J, Wang X-L, Shang Q-M (2011) Salicylic acid regulates sugar metabolism that confers tolerance to salinity stress in cucumber seedlings. *Scientia Horticulturae* 129:629–636. doi: 10.1016/j.scienta.2011.05.005
- Dong J, Wan G, Liang Z (2010) Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of Biotechnology* 148:99–104. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.05.009
- Drozak A, Romanowska E (2006) Acclimation of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize to different irradiances during growth. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1757:1539–1546. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.09.001
- Durango D, Pulgarin N, Echeverri F, et al (2013) Effect of Salicylic Acid and Structurally Related Compounds in the Accumulation of Phytoalexins in Cotyledons of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Cultivars. *Molecules* 18:10609–10628. doi: 10.3390/molecules180910609

- Engelberth J, Viswanathan S, Engelberth MJ (2011) Low Concentrations of Salicylic Acid Stimulate Insect Elicitor Responses in *Zea mays* Seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 37:263–266. doi: 10.1007/s10886-011-9926-3
- Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A (2003) Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica* 41:281–284.
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2, 6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212:250–263.
- Flexas J, Ribas-Carbó M, Diaz-Espejo A, et al (2008) Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. *Plant, Cell & Environment* 31:602–621. doi: 10.1111/j.1365-3040.2007.01757.x
- Foster CE, Martin TM, Pauly M (2010a) Comprehensive Compositional Analysis of Plant Cell Walls (Lignocellulosic biomass) Part I: Lignin. *Journal of Visualized Experiments*. doi: 10.3791/1745
- Foster CE, Martin TM, Pauly M (2010b) Comprehensive Compositional Analysis of Plant Cell Walls (Lignocellulosic biomass) Part II: Carbohydrates. *Journal of Visualized Experiments*. doi: 10.3791/1837
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, et al (2006) Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *MPMI* 19:711–724. doi: 10.1094/MPMI-19-0711
- Genoud T, Buchala AJ, Chua N, Métraux J (2002) Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 31:87–95.
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta -General Subjects* 990:87–92.
- Ghai N, Setia R, Setia N (2002) Effects of paclobutrazol and salicylic acid on chlorophyll content, hill activity and yield components in *Brassica napus* L.(CV GSL-1). *Phytomorphology* 52:83–87.
- Ghasemzadeh A, Jaafar H (2013) Interactive Effect of Salicylic Acid on Some Physiological Features and Antioxidant Enzymes Activity in Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules* 18:5965–5979. doi: 10.3390/molecules18055965
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, et al (2004) A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in *Arabidopsis* Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness. *The Plant Cell* 16:3304–3325. doi: 10.1105/tpc.104.025973
- Gilbert HJ (2010) The Biochemistry and Structural Biology of Plant Cell Wall Deconstruction. *Plant Physiology* 153:444–455. doi: 10.1104/pp.110.156646

- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Goicoechea N, Aguirreolea J, Cenoz S, Garcia-Mina JM (2000) *Verticillium dahliae* modifies the concentrations of proline, soluble sugars, starch, soluble protein and abscisic acid in pepper plants. *European Journal of Plant Pathology* 106:19–25.
- Gomez LD, Whitehead C, Roberts P, McQueen-Mason SJ (2011) High-throughput Saccharification Assay for Lignocellulosic Materials. e3240. doi: 10.3791/3240
- Goyal S, Lambert C, Cluzet S, et al (2012) Secondary Metabolites and Plant Defence. In: Méryllon JM, Ramawat KG (eds) *Plant Defence: Biological Control*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 109–138
- Guérard N, Maillard P, Bréchet C, et al (2007) Do trees use reserve or newly assimilated carbon for their defense reactions? A ¹³C labeling approach with young Scots pines inoculated with a bark-beetle-associated fungus (*Ophiostoma brunneo ciliatum*). *Annals of Forest Science* 64:601–608. doi: 10.1051/forest:2007038
- Harris D, Stork J, Debolt S (2009) Genetic modification in cellulose-synthase reduces crystallinity and improves biochemical conversion to fermentable sugar. *GCB Bioenergy* 1:51–61. doi: 10.1111/j.1757-1707.2009.01000.x
- Hatfield RD, Marita JM, Frost K, et al (2009) Grass lignin acylation: p-coumaroyl transferase activity and cell wall characteristics of C3 and C4 grasses. *Planta* 229:1253–1267. doi: 10.1007/s00425-009-0900-z
- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 84:450–455.
- Hayat S, Irfan M, Wani AS, et al (2012) Salicylic acids: Local, systemic or inter-systemic regulators? *Plant Signaling & Behavior* 7:93–102. doi: 10.4161/psb.7.1.18620
- He Y, Liu Y, Cao W, et al (2005) Effects of Salicylic Acid on Heat Tolerance Associated with Antioxidant Metabolism in Kentucky Bluegrass. *Crop Science* 45:988. doi: 10.2135/cropsci2003.0678
- Horváth E, Szalai G, Janda T (2007) Induction of Abiotic Stress Tolerance by Salicylic Acid Signaling. *Journal of Plant Growth Regulation* 26:290–300. doi: 10.1007/s00344-007-9017-4
- Janda T, Gondor OK, Yordanova R, et al (2014) Salicylic acid and photosynthesis: signalling and effects. *Acta Physiologiae Plantarum* 36:2537–2546.
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology* 57:315–319.

- Kawano T, Bouteau F (2013) Salicylic Acid-Induced Local and Long-Distance Signaling Models in Plants. In: Baluška F (ed) Long-Distance Systemic Signaling and Communication in Plants. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 23–52
- Khan W, Prithiviraj B, Smith DL (2003) Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Journal of Plant Physiology* 160:485–492. doi: 10.1078/0176-1617-00865
- Khodary SEA (2004) Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants. *International Journal of Agriculture and Biology* 6:5–8.
- Koch MF, Mew TW (1991) Effect of plant age and leaf maturity on the quantitative resistance of rice cultivars to *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Plant Disease* 901–904.
- Kováčik J, Grúz J, Bačkor M, et al (2009) Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Reports* 28:135–143. doi: 10.1007/s00299-008-0627-5
- Kus JV (2002) Age-Related Resistance in *Arabidopsis* Is a Developmentally Regulated Defense Response to *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell Online* 14:479–490. doi: 10.1105/tpc.010481
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Biology* 48:251–275.
- Li J, Li G, Wang H, Wang Deng X (2011) Phytochrome Signaling Mechanisms. *The Arabidopsis Book* 9:e0148. doi: 10.1199/tab.0148
- Li Q, Song J, Peng S, et al (2014) Plant biotechnology for lignocellulosic biofuel production. *Plant Biotechnology Journal* 12:1174–1192. doi: 10.1111/pbi.12273
- Lichtenthaler HK (1987) [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 350–382
- Liu C, Guo J, Cui Y, et al (2011) Effects of cadmium and salicylic acid on growth, spectral reflectance and photosynthesis of castor bean seedlings. *Plant and Soil* 344:131–141. doi: 10.1007/s11104-011-0733-y
- Malinovsky FG, Fangel JU, Willats WGT (2014) The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00178
- Mauch-Mani B, Métraux J-P (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* 82:535–540.
- Mccann M, Carpita N (2008) Designing the deconstruction of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11:314–320. doi: 10.1016/j.pbi.2008.04.001

- Mehta PM, Bhavnarayana K (1981) Role of phenylalanine and tyrosine ammonia lyase enzymes in the pigmentation during development of brinjal fruit. *Proceedings: Plant Sciences* 90:293–297.
- Meldau S, Erb M, Baldwin IT (2012) Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns. *Annals of Botany* 110:1503–1514. doi: 10.1093/aob/mcs212
- Michalak A (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15:523.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405–410. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9
- Mohammadi M, Karr AL (2001) Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *Journal of Plant Physiology* 158:1023–1029. doi: 10.1078/S0176-1617(04)70126-1
- Moharekar ST, Lokhande SD, Hara T, et al (2003) Effect of salicylic acid on chlorophyll and carotenoid contents of wheat and moong seedlings. *Photosynthetica* 41:315–317.
- Montesano M, Brader G, Palva ET (2003) Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology* 4:73–79.
- Nafisi M, Fimognari L, Sakuragi Y (2015) Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. *Phytochemistry* 112:63–71. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.11.008
- Napoleão, T. A. (2015). Efeitos do metil jasmonato e do ácido salicílico na composição da parede celular, metabolismo secundário e recalcitrância em *Brachypodium distachyon*. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22:867–880.
- Neelam M, Rahul M, Ajiboye M, et al (2014) Salicylic Acid Alters Antioxidant and Phenolics Metabolism in *Catharanthus roseus* Grown Under Salinity Stress. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 11:118. doi: 10.4314/ajtcam.v11i5.19
- Nicholson RL, Hammerschmidt R (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30:369–389.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology* 49:249–279.
- Nürnbergger T (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 55:167–182.
- Nürnbergger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198:249–266.

- Papa G, Varanasi P, Sun L, et al (2012) Exploring the effect of different plant lignin content and composition on ionic liquid pretreatment efficiency and enzymatic saccharification of *Eucalyptus globulus* L. mutants. *Bioresource Technology* 117:352–359. doi: 10.1016/j.biortech.2012.04.065
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5:308–316. doi: 10.1038/nchembio.164
- Poór P, Gémes K, Horváth F, et al (2011) Salicylic acid treatment via the rooting medium interferes with stomatal response, CO₂ fixation rate and carbohydrate metabolism in tomato, and decreases harmful effects of subsequent salt stress: Effects of salicylic acid on photosynthesis. *Plant Biology* 13:105–114. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00344.x
- Pratelli R, Pilot G (2014) Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany* 65:5535–5556. doi: 10.1093/jxb/eru320
- R Development Core Team (2011). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org/>
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, et al (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂). *Plant Physiology* 115:137–149.
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Tzin V, Mysore KS (2014) Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00017
- Sanglard LMVP, Martins SCV, Detmann KC, et al (2014) Silicon nutrition alleviates the negative impacts of arsenic on the photosynthetic apparatus of rice leaves: an analysis of the key limitations of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 152:355–366. doi: 10.1111/ppl.12178
- Santiago R, Barros-Rios J, Malvar R (2013) Impact of Cell Wall Composition on Maize Resistance to Pests and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 14:6960–6980. doi: 10.3390/ijms14046960
- Sasidharan R, Voeselek LA, Pierik R (2011) Cell Wall Modifying Proteins Mediate Plant Acclimatization to Biotic and Abiotic Stresses. *Critical Reviews in Plant Sciences* 30:548–562. doi: 10.1080/07352689.2011.615706
- Sattler SE, Funnell-Harris DL (2013) Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens? *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2013.00070
- Selvaraj K, Fofana B (2012) An overview of plant photosynthesis modulation by pathogen attacks. *Advances in Photosynthesis-Fundamental Aspects* 465–487.

- Sewelam N, Kazan K, Schenk PM (2016) Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2016.00187
- Seyfferth C, Tsuda K (2014) Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00697
- Shi Q, Bao Z, Zhu Z, et al (2006) Effects of Different Treatments of Salicylic Acid on Heat Tolerance, Chlorophyll Fluorescence, and Antioxidant Enzyme Activity in Seedlings of *Cucumis sativa* L. *Plant Growth Regulation* 48:127–135. doi: 10.1007/s10725-005-5482-6
- Silva M de A, Jifon JL, Santos CM dos, et al (2013) Photosynthetic capacity and water use efficiency in sugarcane genotypes subject to water deficit during early growth phase. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56:735–748.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 152–178
- Somssich IE, Hahlbrock K (1998) Pathogen defence in plants—a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 3:86–90.
- Sundar AR, Viswanathan R, Nagarathinam S (2009) Induction of systemic acquired resistance (SAR) using synthetic signal molecules against *Colletotrichum falcatum* in sugarcane. *Sugar tech* 11:274–281.
- Tamaoki D, Seo S, Yamada S, et al (2013) Jasmonic acid and salicylic acid activate a common defense system in rice. *Plant Signaling & Behavior* 8:e24260. doi: 10.4161/psb.24260
- Tavares EQP, De Souza AP, Buckeridge MS (2015) How endogenous plant cell-wall degradation mechanisms can help achieve higher efficiency in saccharification of biomass. *Journal of Experimental Botany* 66:4133–4143. doi: 10.1093/jxb/erv171
- Tenhaken R (2015) Cell wall remodeling under abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00771
- Thakur M, Sohal BS (2013) Role of Elicitors in Inducing Resistance in Plants against Pathogen Infection: A Review. *ISRN Biochemistry* 2013:1–10. doi: 10.1155/2013/762412
- Thornber JP (1975) Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants. *Annual Review of Plant Physiology* 26:127–158.
- Underwood W (2012) The Plant Cell Wall: A Dynamic Barrier Against Pathogen Invasion. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2012.00085

- Van Acker R, Vanholme R, Storme V, et al (2013) Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnology for Biofuels* 6:46.
- van Kooten O, Snel JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25:147–150. doi: 10.1007/BF00033156
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44:135–162.
- Vineeth TV, Kumar P, Yadav S, Pal M (2015) Optimization of bio-regulators dose based on photosynthetic and yield performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Indian Journal of Plant Physiology* 20:177–181. doi: 10.1007/s40502-015-0150-y
- Vogel J (2008) Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 11:301–307. doi: 10.1016/j.pbi.2008.03.002
- War AR, Paulraj MG, War MY, Ignacimuthu S (2011) Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signaling & Behavior* 6:1787–1792. doi: 10.4161/psb.6.11.17685
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322:681–692.
- Wu J, Baldwin IT (2010) New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores. *Annual Review of Genetics* 44:1–24. doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163500
- Xu N, Zhang W, Ren S, et al (2012) Hemicelluloses negatively affect lignocellulose crystallinity for high biomass digestibility under NaOH and H₂SO₄ pretreatments in *Miscanthus*. *Biotechnology for Biofuels* 5:58.
- Yokoyama R, Nishitani K (2004) Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 45:1111–1121.
- Zhao Q, Dixon RA (2014) Altering the Cell Wall and Its Impact on Plant Disease: From Forage to Bioenergy. *Annual Review of Phytopathology* 52:69–91. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102237
- Zhong XM, Shi ZS, Li FH, Huang HJ (2014) Photosynthesis and chlorophyll fluorescence of infertile and fertile stalks of paired near-isogenic lines in maize (*Zea mays* L.) under shade conditions. *Photosynthetica* 52:597–603. doi: 10.1007/s11099-014-0071-4
- Zhou XM, Mackenzie AF, Madramootoo CA, Smith DL (1999) Effects of stem-injected plant growth regulators, with or without sucrose, on grain production, biomass and photosynthetic activity of field-grown corn plants. *Journal of Agronomy and Crop Science* 183:103–110.

Zhu P, Yang S-M, Ma J, et al (2008) Effect of shading on the photosynthetic characteristics and yield at later growth stage of hybrid rice combination. *Acta Agronomica Sinica* 34:2003–2009.

Zurbriggen MD, Carrillo N, Hajirezaei M-R (2010) ROS signaling in the hypersensitive response: when, where and what for? *Plant Signaling & Behavior* 5:393–396.