



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

CIBELLE GOMES GADELHA

BASES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE
SALINO EM CULTIVARES DE ARROZ

FORTALEZA

2020

CIBELLE GOMES GADELHA

BASES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE
SALINO EM CULTIVARES DE ARROZ

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G12b Gadelha, Cibelle Gomes.
Bases bioquímicas e moleculares para a tolerância ao estresse salino em cultivares de arroz / Cibelle Gomes Gadelha. – 2020.
106 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.
1. Salinidade. 2. Aclimação. 3. Oryza sativa. 4. Expressão gênica. 5. Homeostase iônica. I. Título.
CDD 572
-

CIBELLE GOMES GADELHA

BASES BIOQUÍMICAS E MOLECULARES PARA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE
SALINO EM CULTIVARES DE ARROZ

Tese submetida à coordenação do programa de pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Aprovada em: 27/01/2020

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Enéas Gomes Filho (orientador)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Dr. Humberto Henrique de Carvalho
Universidade Federal do Ceará- UFC

Dr. José Hélio Costa
Universidade Federal do Ceará- UFC

Dr. Rafael de Souza Miranda
Universidade Federal do Piauí- UFPI

Dr. Fabricio Eulálio Leite Carvalho
Universidade Federal do Ceará- UFC

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora, por toda a proteção, pelas graças concedidas por terem me permitido chegar ao final dessa difícil jornada.

À minha família, pelo amor incondicional e por terem sido meus alicerces em todos os momentos de vitórias e derrotas.

Aos meus amigos, que foram meus companheiros quando eu me senti sozinha, que tornaram esse fardo mais leve e que me ajudaram a entender que não importa em quantos pedaços meu coração tenha se partido, eu tenho força para vencer qualquer obstáculo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Enéas Gomes Filho, pela confiança depositada, orientação, apoio e incentivo durante esses poucos mais de 10 anos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, especialmente àqueles de quem tive a oportunidade de ser aluna, pelas experiências e pelos ensinamentos compartilhados comigo, bem como aos demais membros do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (estudantes e funcionários).

Aos professores Dr. Humberto Henrique de Carvalho, Dr. José Hélio Costa, Dr. Rafael de Souza Miranda e ao Dr. Fabrício Eulálio Leite Carvalho, por aceitarem participar de minha banca examinadora, pela compreensão e pelas críticas e sugestões a este trabalho.

Aos professores Emílio de Castro Miguel e Ítalo Antonio Cotta Coutinho pelas contribuições e orientação durante as análises de microscopia.

Aos colegas Daniel Farias, Gyedre Araújo e Stelamaris de Oliveira, por toda a paciência (de escutar meus problemas, principalmente), pelo companheirismo e pela ajuda durante esses cinco exaustivos anos de doutorado.

Aos demais colegas que compõem ou compuseram o Laboratório de Fisiologia Vegetal, pela convivência e por terem me ajudado direta ou indiretamente no decorrer deste trabalho.

À Raíssa Bret e ao Roberto Nascimento por terem me auxiliado e orientado durante a execução das análises de expressão gênica.

Aos meus companheiros de trabalho das escolas por onde passei, que sempre foram pacientes com minha rotina maluca e que sempre me incentivaram a não desistir.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O meu muito obrigada!!!

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar” (Josué 1:9)

RESUMO

O arroz (*Oryza sativa*) é uma gramínea que se destaca por ser um dos cereais mais consumidos no mundo. Por conta do crescimento da população mundial e da demanda por alimentos, qualquer cenário que cause perda de produtividade nessa cultura, gera impactos econômicos graves. Desse modo, a salinidade dos solos e da água de irrigação constitui fator limitante para o cultivo de arroz, uma vez que prejudica vários de seus processos fisiológicos e afeta negativamente o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Entretanto, a extensão dessa sensibilidade é genótipo-dependente e algumas cultivares dispõem de mecanismos que as permitem se aclimatar ao estresse salino e assim evitar grandes prejuízos em sua produção. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar como o estresse salino influencia o metabolismo de diferentes cultivares de arroz, estabelecendo conexões entre as alterações no crescimento e na eficiência fotossintética e os mecanismos iônicos, osmóticos e oxidativos envolvidos na tolerância e na susceptibilidade ao estresse salino. Para isso, estabeleceram-se duas etapas experimentais. Na primeira, foram avaliados o crescimento, as trocas gasosas e o acúmulo de íons em cinco cultivares de arroz (BRS Pepita, BRS Sertanejo, BRS Esmeralda, BRS São Francisco e BRS Primavera) a fim de determinar quais delas eram mais sensíveis ou tolerantes ao estresse salino. Os resultados mostraram que o estresse salino promoveu reduções severas no crescimento das plantas, contudo, na cultivar BRS São Francisco, essas reduções pela salinidade foram menores, além dessa cultivar apresentar maiores taxas de assimilação de CO₂ e menor acúmulo de Na⁺ nos tecidos. De modo oposto, a cultivar BRS Esmeralda foi aquela que mais sofreu com os danos causados pela salinidade. Após isso, a segunda etapa teve por finalidade comparar e explicar as respostas fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e moleculares das cultivares BRS Esmeralda (considerada mais sensível à salinidade) e BRS São Francisco (mais tolerante à salinidade) quando submetidas ao estresse salino. Confirmando os achados da etapa 1, a cultivar BRS São Francisco foi mais eficiente em reduzir os efeitos adversos da salinidade no crescimento e nas trocas gasosas. Sob estresse salino, essa cultivar apresentou maior eficiência quântica efetiva de PSII, maior coeficiente de extinção fotoquímico e maior taxa de transporte de elétrons. Por outro lado, o excesso de energia relativa do PSII e o coeficiente de extinção não-fotoquímico foram menores em comparação à cultivar BRS Esmeralda sob salinidade. Embora a salinidade tenha promovido um aumento significativo nos teores de Na⁺ e Cl⁻, principalmente na cultivar BRS Esmeralda, os efeitos nocivos foram menos agressivos na cultivar mais tolerante. A regulação positiva das expressões dos genes *SOS* e *NHX* revelou que essa cultivar possui mecanismos de controle da acumulação de Na⁺ no citosol. A

capacidade fotossintética reduzida e os efeitos citotóxicos do Na^+ causaram danos à ultraestrutura dos cloroplastos na cultivar mais sensível. O excesso de sais promoveu também o aumento nos teores de H_2O_2 e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os quais foram em parte atenuados na cultivar BRS São Francisco. Apesar disso, a atividade das enzimas antioxidativas e o conteúdo de ascorbato e glutatona foram dependentes do tempo de exposição ao estresse, do órgão e da cultivar analisados, e apenas o aumento de atividade da peroxidase do ascorbato (em raízes) parece ter sido um mecanismo de aclimação ao excesso de sais utilizado pela cultivar BRS São Francisco. Em adição, a síntese de solutos compatíveis também foi inconsistente, não havendo correlação entre o acúmulo de solutos orgânicos (que poderia contribuir para o ajustamento osmótico), e a tolerância ou susceptibilidade da cultivar ao estresse salino. Baseado nos resultados obtidos, conclui-se que a tolerância ao estresse salino envolve alterações multifatoriais e que a maior capacidade de sobrevivência da cultivar BRS São Francisco parece estar mais relacionada à exclusão e compartimentalização de Na^+ e à aumentada capacidade fotossintética e menos às homeostases osmóticas e oxidativas.

Palavras-chave: Salinidade. Aclimação. *Oryza sativa*. Expressão gênica. Homeostase iônica

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa*) is a grass that stands out for being one of the most consumed cereals in the world. Due to the world population growth and the food demand, any scenario that causes loss of productivity in this crop generates serious economic impacts. Thus, salinity of soils and irrigation water is a limiting factor for rice cultivation, as it impairs many of its physiological processes and negatively affects plant growth and development. However, the extent of this sensitivity is genotype-dependent and some cultivars have mechanisms that allow them to acclimate to salt stress and thus avoid major losses in their production. Thus, the objective of this work was to investigate how salt stress influences the metabolism of different rice cultivars, establishing connections between changes in growth and photosynthetic efficiency and ionic, osmotic and oxidative mechanisms involved in salt stress tolerance and susceptibility. For this, two experimental steps were established. In the first one, growth, gas exchange and ion accumulation were evaluated in five rice cultivars (BRS Pepita, BRS Sertanejo, BRS Esmeralda, BRS São Francisco and BRS Primavera) in order to determine which are more salt stress sensitive or tolerant. The results showed that salinity promoted severe reductions in plant growth, however, a better biomass production was observed in BRS São Francisco, which coincided with higher CO₂ assimilation rates and lower Na⁺ accumulation in this cultivar. Conversely, the cultivar BRS Esmeralda was the one that suffered the most from the damage caused by salinity. After that, the second stage aimed to compare and explain the physiological, biochemical, morphological and molecular responses of the cultivars BRS Esmeralda (more sensitive to salinity) and BRS São Francisco (more tolerant to salinity) when subjected to saline stress. Confirming the findings of step 1, the cultivar BRS São Francisco was efficient in reducing the adverse effects of salinity on growth and gas exchange. In addition, under saline stress, the leaves of cultivar BRS São Francisco presented higher effective quantum efficiency of PSII, higher photochemical extinction coefficient and higher electron transport rate, while the relative excess energy in PSII and the non-photochemical quenching were reduced compared to BRS Esmeralda cultivar. Although salinity promoted a significant increase in Na⁺ and Cl⁻ levels, mainly in BRS Esmeralda cultivar, the harmful effects were less aggressive in the more tolerant cultivar. Positive regulation of SOS and NHX gene expressions revealed that this cultivar has mechanisms to control Na⁺ accumulation in cytosol. Reduced photosynthetic capacity and cytotoxic effects of Na⁺ caused damage to chloroplasts ultrastructure in the sensitive cultivar. The excess of salts also promoted the increase in the levels of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which were partially attenuated in the cultivar

BRS São Francisco. Nevertheless, the antioxidant enzymes activity and the content of ascorbate and glutathione were dependent on the time of stress exposure, organ and cultivar analyzed, and only the increase in ascorbate peroxidase activity (in roots) seems to have been a mechanism of acclimatation to excess salts used by the cultivar BRS São Francisco. In addition, the synthesis of compatible solutes was also inconsistent, with no correlation between the accumulation of organic solutes (which could contribute to osmotic adjustment), and the tolerance or susceptibility of the cultivar to saline stress. Based on these results, it can be concluded that salt stress tolerance involves multifactorial alterations and that the higher survivability of cultivar BRS São Francisco seems to be more related to Na⁺ exclusion and compartmentalization and to increased photosynthetic capacity and less to osmotic and oxidative homeostasis.

Keyword: Salinity. Acclimatization. *Oryza sativa*. Gene expression. Ionic homeostasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Área foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pepita, BRS Sertanejo, BRS Esmeralda, BRS São Francisco e BRS Primavera crescidas por 10 dias sob condições controle ou de estresse salino.....	36
Figura 2	– Massa seca de folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares BRS Pepita, BRS Sertanejo, BRS Esmeralda, BRS São Francisco e BRS Primavera crescidas por 10 dias sob condições controle ou de estresse salino.....	37
Figura 3	– Fotossíntese líquida, condutância estomática, transpiração, eficiência de carboxilação da Rubisco de plantas de arroz das cultivares BRS Pepita, BRS Sertanejo, BRS Esmeralda, BRS São Francisco e BRS Primavera crescidas por 10 dias sob condições controle ou de estresse salino.....	38
Figura 4	– Teores de potássio e sódio em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares BRS Pepita, BRS Sertanejo, BRS Esmeralda, BRS São Francisco e BRS Primavera crescidas por 10 dias sob condições controle ou de estresse salino.....	40
Figura 5	– Phenotypical appearance of Esmeralda and São Francisco rice cultivars grown in absence and presence of 80 mM NaCl for 12 days.....	51
Figura 6	– CO ₂ assimilation rate, stomatal conductance, transpiration rate, and carboxylation efficiency of Rubisco of Esmeralda and São Francisco rice cultivars grown in absence and presence (gray bar) of 80 mM NaCl for 6 and 12 days.....	52
Figura 7	– Effective quantum yield of PSII, non-photochemical quenching, photochemical quenching, photosystem II maximum efficiency, energy excess at the PSII level, and electron transport rate of Esmeralda and São Francisco rice cultivars grown in absence and presence (gray bar) of 80 mM NaCl for 6 and 12 days.....	52
Figura 8	– Chloroplast ultrastructure by transmission electron microscopy of Esmeralda and São Francisco rice cultivars grown in absence and presence of 80 mM NaCl for 6 and 12 days.....	55

Figura 9	– Concentrations of K ⁺ and Na ⁺ of leaves, roots and xylem sap of Esmeralda and São Francisco rice cultivars grown in absence and presence of 80 mM NaCl for 6 and 12 days.....	56
Figura 10	– Subcellular localization of sodium in Esmeralda and São Francisco rice cultivars grown in absence and presence of 80 mM NaCl for 6 and 12 days.....	58
Figura 11	– Relative gene expression profile of the <i>OsSOS1</i> , <i>OsSOS2</i> , <i>OsSOS3</i> , <i>OsNHX1</i> , <i>OsNHX2</i> , <i>OsNHX3</i> and <i>OsNHX5</i> genes in roots of Esmeralda and São Francisco rice cultivars grown in absence and presence of 80 mM NaCl for 6 and 12 days.....	59
Figura 12	– Teores de Cl ⁻ em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	76
Figura 13	– Teores de carboidratos solúveis, carboidratos redutores, carboidratos não-redutores em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	78
Figura 14	– Teores de N-aminossolúveis e proteínas solúveis em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	79
Figura 15	– Teores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	81
Figura 16	– Teores de peróxido de hidrogênio em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	83
Figura 17	– Atividade da dismutase do superóxido em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	84
Figura 18	– Atividade da peroxidase do ascorbato em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	85

Figura 19	– Atividade da catalase em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	86
Figura 20	– Atividade da peroxidase do guaiacol em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	87
Figura 21	– Teores de ascorbato reduzido e de ascorbato oxidado em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	88
Figura 22	– Teores de ascorbato reduzido e de ascorbato oxidado em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	90
Figura 23	– Teores de glutaciona reduzida e de glutaciona oxidada em folhas e raízes de plantas de arroz das cultivares Esmeralda e São Francisco aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle ou de estresse salino.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Leaf area and dry masses of leaves, roots, stems and total of Esmeralda and São Francisco rice cultivars grown in the absence and presence of 80 mM NaCl for 6 and 12 days.....	49
Tabela 2	– Concentrations of chlorophyll <i>a</i> , <i>b</i> and <i>total</i> and carotenoids of Esmeralda and São Francisco rice cultivars grown in the absence and presence of 80 mM NaCl for 6 and 12 days.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

APX	Peroxidase do ascorbato
AsA	Ascorbato reduzido
CAT	Catalase
DHA	Desidroascorbato
ETR	Taxa de transporte de elétrons
EXC	Excesso de energia relativa no PSII
Fv/Fm	Eficiência máxima do PSII
GPOD	Peroxidase do guaiacol
GR	Redutase da glutatona
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
<i>NHX</i>	Gene que codifica o transportador NHX
NHX	Transportador do tipo antiporte Na ⁺ /H ⁺ de tonoplasto
NPQ	Coefficiente de extinção não-fotoquímica
PSII	Fotossistema II
qP	Coefficiente de extinção fotoquímica
qPCR	PCR quantitativa
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT	Reação da transcriptase reversa
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
SOD	Dismutase do superóxido
<i>SOS</i>	Gene que codifica o transportador SOS1 e as proteínas SOS2 e SOS3, componentes da rota SOS
SOS	Rota de sinalização (do inglês, Salt Overly Sensitive)
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
ΦPSII	Eficiência quântica efetiva do PSII
·O ₂ ⁻	Radical superóxido
·OH	Radical hidroxil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	HIPÓTESE	21
3	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	21
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
4.1	O estresse salino.....	22
4.2	Tolerância das plantas à salinidade.....	24
4.2.1	<i>Ajustamento osmótico e iônico</i>	25
4.2.2	<i>Ajustamento redox</i>	28
4.3	Organismo modelo: o arroz.....	30
5	TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ESTRESSE SALINO EM CINCO CULTIVARES DE ARROZ.....	31
5.1	Introdução.....	32
5.2	Materiais e métodos.....	34
5.2.1	<i>Material vegetal e condições de cultivo</i>	34
5.2.2	<i>Trocas gasosas e parâmetros de crescimento</i>	34
5.2.3	<i>Determinação dos íons K^+ e Na^+</i>	35
5.2.4	<i>Delineamento experimental</i>	35
5.3	Resultados e discussões	35
5.4	Conclusões.....	41
6	SODIUM UPTAKE AND TRANSPORT REGULATION AND PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY MAINTENANCE AS THE BASIS OF DIFFERENTIAL SALT TOLERANCE IN RICE CULTIVARS.....	41
6.1	Introduction.....	43
6.2	Materials and Methods.....	45
6.2.1	<i>Plant material and growth conditions</i>	45
6.2.2	<i>Growth parameters</i>	45
6.2.3	<i>Gas exchange and chlorophyll a fluorescence</i>	45
6.2.4	<i>Photosynthetic pigments</i>	46
6.2.5	<i>Chloroplast ultrastructure</i>	46
6.2.6	<i>Ions contents and Na^+ and K^+ loading in xylem sap</i>	47
6.2.7	<i>Detection of Na^+ by confocal microscopy</i>	47
6.2.8	<i>Gene expression analysis</i>	47

6.2.9	<i>Experimental design and statistical analysis</i>	48
6.3	Results	48
6.3.1	<i>Effects of salt stress in growth</i>	48
6.3.2	<i>Effects of salt stress in photosynthesis parameters</i>	50
6.3.3	Effects of salt stress in ionic homeostasis	54
6.4	Discussion	60
6.5	Conclusion	64
6.6	Author contribution statement	64
6.7	Acknowledgments	64
6.8	Compliance with ethical standards	65
7	TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ESTRESSE SALINO EM DUAS CULTIVARES DE ARROZ: ASPECTOS IÔNICOS, OSMÓTICOS E OXIDATIVOS	65
7.1	Introdução	66
7.2	Material e métodos	68
7.2.1	<i>Material vegetal e condições de cultivo</i>	68
7.2.2	<i>Preparação de extratos</i>	68
7.2.3	<i>Determinação dos teores de Cl⁻</i>	69
7.2.4	<i>Determinação dos teores de carboidratos solúveis, redutores e não-redutores</i>	69
7.2.5	<i>Determinação dos teores de N-aminossolúveis</i>	70
7.2.6	<i>Concentração de proteínas solúveis</i>	70
7.2.7	<i>Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</i>	71
7.2.8	<i>Determinação dos teores de peróxido de hidrogênio</i>	71
7.2.9	<i>Determinação da atividade das enzimas antioxidativas</i>	71
7.2.9.1	<i>Dismutase do superóxido</i>	71
7.2.9.2	<i>Peroxidase do Ascorbato</i>	72
7.2.9.3	<i>Catalase</i>	72
7.2.9.4	<i>Peroxidase do Guaiacol</i>	72
7.2.9.5	<i>Redutase da Glutathione</i>	73
7.2.10	<i>Determinação dos teores de ascorbato e glutathione</i>	73
7.2.11	<i>Delineamento experimental</i>	75
7.3	Resultados e discussões	75
7.4	Conclusão	92

8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
	REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

Por serem organismos sésseis, as plantas estão mais facilmente expostas a uma variedade de estresses ambientais que alteram as suas condições ótimas e limitam o seu desenvolvimento, reduzindo, assim, sua possibilidade de sobrevivência (LIU et al., 2017). O estresse salino é um dos mais relevantes, uma vez que afeta cerca de 1 bilhão de hectares em mais de 100 países do mundo, e com isso, compromete gravemente a produtividade agrícola mundial (FAO, 2015).

O excesso de sais no solo ou na água de irrigação prejudicam várias funções fisiológicas das plantas, como o equilíbrio hídrico e nutricional, a atividade enzimática, a síntese proteica, a expressão gênica, dentre outros (HASEGAWA, 2013; ACOSTA-MOTOS et al., 2017). Particularmente, a fotossíntese é um dos principais processos bioquímicos afetados negativamente pela salinidade e, na maioria das vezes, a redução do crescimento das plantas é associada a reduções nas taxas fotossintéticas (MAHLOOJI et al., 2018; NAJAR et al., 2019). O estresse salino, por sua vez, causa diminuição da abertura estomática, limitando as trocas gasosas, como também danifica os fotossistemas, o transporte de elétrons e a estrutura dos cloroplastos, reduz os pigmentos fotossintéticos e inibe as enzimas envolvidas com a fixação de CO₂ (NEGRÃO et al., 2018; SHAHZAD et al., 2019).

Todos esses distúrbios são decorrentes da redução do potencial hídrico no ambiente radicular (efeito osmótico) e/ou do acúmulo de Na⁺ e Cl⁻ citotóxicos (efeito iônico) (SHAHZAD et al., 2019). Secundariamente, os efeitos osmótico e iônico geram um ambiente oxirredutor instável, devido à superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), que, em altas concentrações, causam danos aos componentes celulares (NATH et al., 2019). Porém, o grau de severidade com que esse estresse atinge as plantas dependem da espécie, do genótipo, da idade, do tipo de sal, do tempo de exposição, dentre outros (PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016).

Plantas tolerantes conseguem prevenir ou minimizar os efeitos deletérios do excesso de sais no meio, através do rearranjo ordenado do seu metabolismo, com o intuito de manter a homeostase celular (SINGH et al., 2017). Esse fenômeno é conhecido como aclimação e envolve ajustamentos que não são transmitidos às gerações futuras (PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016). No âmbito do estresse salino, os ajustamentos osmótico, iônico e redox são determinantes para a tolerância das espécies vegetais (DEINLEIN et al., 2014; NEGRÃO et al., 2018; SHAHZAD et al., 2019).

O ajustamento osmótico ocorre através da absorção de íons ou síntese de solutos orgânicos, como: açúcares, polióis, aminoácidos, proteínas. Tais solutos, chamados compatíveis (ou osmoprotetores), se acumulam no citosol e regulam o potencial osmótico e hídrico das raízes, mantendo o teor relativo de água nos tecidos, e assim, evitando danos às trocas gasosas e ao alongamento celular (XU et al., 2016; FAN et al., 2016). Além disso, para minimizar os danos oxidativos causados pelas EROs, as plantas ativam complexas vias de defesa, que envolvem enzimas, tais como: a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do guaiacol (GPX), a peroxidase do ascorbato (APX) e a redutase da glutatona (GR); ou antioxidantes de baixo peso molecular, como o ascorbato, o tocoferol e a glutatona (DEMIDCHIK, 2015; NOCTOR; FOYER, 2016; AHMAD et al., 2019).

Juntamente a esses, a regulação do fluxo iônico e a manutenção de baixas concentrações de íons citotóxicos são essenciais para a tolerância ao estresse salino (KEISHAM et al., 2018; WU, 2018). Essa regulação, compreende estratégias como: o efluxo de Na^+ de volta para o meio de crescimento ou para o apoplasto; a compartimentação de Na^+ no vacúolo; o controle do carregamento do xilema; a retenção de Na^+ nas células do caule; a recirculação de Na^+ pelo floema; a alocação de sais para as folhas velhas; e/ou a excreção de Na^+ para a superfície das folhas (exclusivo de halófitas) (YAMAGUCHI et al., 2013). Esse ajustamento iônico é mediado por canais ou transportadores do tipo antiporte como o SOS1 e o NHX, localizados na membrana plasmática ou no tonoplasto (KHAN; AHMAD; KHAN, 2015; WU, 2018).

O arroz (*Oryza sativa*) se destaca entre as culturas alimentares, por fazer parte da dieta de mais da metade da população mundial (SINGH et al., 2019). É nutricionalmente rico em fibras, minerais e vitaminas, fornecendo 21 % da energia total e 15 % de proteína per capita (GUPTA et al., 2018). Essa cultura é considerada sensível ao estresse salino, no entanto, nem todas as variedades de arroz respondem igualmente ao estresse salino, e alguns estudos já apontaram que algumas cultivares têm mecanismos distintos de tolerância à salinidade (CHANG et al. 2019; GERONA et al. 2019; LIU et al. 2019; SINGH et al. 2019; FRUKH et al. 2020).

Portanto, o entendimento das complexas e contrastantes respostas que permitem às plantas de arroz sobreviverem em meio salino é essencial para o desenvolvimento de cultivares que mantenham sua produtividade sob essas condições e, assim atendam a crescente demanda global por alimentos. Diante disso, no presente estudo, abordagens fisiológicas, bioquímicas, anatômicas e moleculares foram empregadas para compreender e elucidar os mecanismos envolvidos na tolerância ou susceptibilidade de diferentes cultivares de arroz ao estresse salino.

2 HIPÓTESE

A tolerância ao estresse salino em cultivares de arroz é atribuída a mecanismos eficientes de efluxo e compartimentalização de Na^+ , síntese de solutos compatíveis e ativação de enzimas e compostos antioxidativos, que resultam na manutenção da homeostase celular e, conseqüentemente, na maior eficiência fotossintética e no maior crescimento das plantas tolerantes em comparação àquelas sensíveis à salinidade.

3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Esse estudo foi dividido em dois experimentos dependentes. Inicialmente, foi feito um experimento preliminar (Experimento I), que teve como principal objetivo avaliar a tolerância diferencial de cinco cultivares de arroz (Pepita, Sertanejo, Esmeralda, São Francisco e Primavera), a fim de determinar aquelas que eram mais contrastantes quanto à sensibilidade e tolerância ao estresse salino. Nessa etapa foram avaliados os parâmetros de crescimento (área foliar- AF e massa seca- MS de folhas e raízes), as trocas gasosas (fotossíntese líquida- A ; condutância estomática- g_s ; transpiração- E ; e eficiência de carboxilação da Rubisco- A/C_i) e os teores dos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+). Todas as análises foram feitas em plantas após dez dias sob condições controle (solução nutritiva) ou de estresse (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM).

Estabelecidas as cultivares tolerantes e sensíveis ao estresse salino, foram realizados experimentos (Experimento II), os quais tiveram por finalidade comparar e explicar as respostas fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e moleculares dessas cultivares quando submetidas a estresse salino. Com exceção da análise da expressão gênica (com coletas após 0, 12, 24 e 48 h de exposição ao estresse), todas as outras variáveis foram determinadas após 6 e 12 dias do início do tratamento salino. Essa pesquisa foi dividida em etapas sequenciais e dependentes, as quais contemplavam as principais variáveis relacionadas à tolerância de plantas a situações de estresse ambiental. A primeira etapa abrangeu as medidas de crescimento, que incluíam a AF; as MS de folhas, raízes, colmos; e a aparência fenotípica das cultivares sensível e tolerante de arroz anteriormente determinadas. A segunda, avaliou as alterações causadas pela salinidade nos parâmetros fotossintéticos (trocas gasosas, fluorescência da clorofila, teores de pigmentos e ultraestrutura dos cloroplastos). Já a terceira etapa considerou as alterações na homeostase osmótica e iônica, através dos conteúdos de carboidratos solúveis, redutores e não redutores; prolina; N-aminossolúveis e proteínas; nos teores de íons sódio (Na^+); potássio (K^+) e cloreto

(Cl⁻), bem como na expressão dos genes SOS e NHX, enquanto que a quarta etapa avaliou as alterações nas variáveis redox celulares, incluindo: teor de peróxido de hidrogênio; teor de TBARS; atividades das enzimas antioxidativas: dismutase do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato, peroxidase do guaiacol e redutase da glutatona; teores dos antioxidantes não enzimáticos: ascorbato e glutatona.

Os dados estão apresentados ao longo de quatro capítulos. O primeiro corresponde à fundamentação teórica e encontra-se formatado conforme a ABNT, 2019, enquanto os demais foram organizados na forma de três outros capítulos, nos quais, de modo independente são apresentados: resumo, introdução, metodologia, resultados, discussões, conclusões e referências específicas. O segundo capítulo contempla os resultados do experimento I e foi formatado segundo a ABNT, 2019. O terceiro contém os principais resultados da tese (homeostases iônicas e eficiência fotossintética), sendo formatado e submetido à revista *Plant Cell Report*. Já o quarto capítulo abrange outros resultados do experimento II, mas que não foram apresentados no artigo científico anteriormente destacado. Nesse último, a formatação seguiu as normas da ABNT, 2019.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 O estresse salino

Por serem organismos sésseis, as plantas estão mais facilmente expostas a uma variedade de estresses ambientais que alteram as suas condições ótimas e limitam o seu desenvolvimento, reduzindo, assim, sua possibilidade de sobrevivência. Esses distúrbios podem ser impostos por organismos vivos (o estresse biótico), ou decorrentes do excesso/deficiência nos âmbitos químicos ou físicos do meio (estresse abiótico) (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015; PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016). Condições ambientais que causam danos às plantas incluem: metais pesados (EL-MEIHY et al., 2019), radiação ultravioleta (KARVANSARA; RAZAVI, 2019), seca (SILVA et al., 2019), frio (ASHRAF; RAHMAN, 2019), altas temperaturas (HINOJOSA; MATANGUIHAN; MURPHY, 2019) e salinidade (ELSHEERY et al., 2020).

Dentre os estresses abióticos, o salino é um dos mais relevantes, uma vez que afeta cerca de 1 bilhão de hectares em mais de 100 países do mundo, e com isso, compromete gravemente a produtividade agrícola mundial (FAO, 2015). A salinidade do solo pode ter origem do intemperismo natural de minerais e rochas, os quais liberam sais solúveis de vários

tipos, principalmente os cloretos de sódio, cálcio e magnésio, e, em menor extensão, sulfatos e carbonatos (YADAV et al., 2011). Outro fator que contribui para os processos naturais de salinização é a deposição de sais do oceano, que são transportados pelo vento e pela chuva, podendo difundir-se a outros ambientes (TURKAN; DEMIRAL, 2009).

Nos últimos anos, o problema da salinidade tem sido intensificado pela atividade humana, através do emprego de condutas inadequadas na gestão agrícola, como: o desmatamento, a aplicação de fertilizantes de forma excessiva e o uso de água de irrigação de baixa qualidade (PLAUT; EDELSTEIN; BEN-HUR, 2013). O manejo inadequado da água e do solo, associados às poucas chuvas, à alta evapotranspiração e às temperaturas extremas, típicas de regiões áridas e semiáridas, tornam os efeitos da salinidade mais evidentes nessas regiões (CEITA et al., 2017).

O estresse salino afeta direta e indiretamente o ambiente, uma vez que induz alterações significativas na cobertura vegetal e nas propriedades físicas e químicas do solo, gerando distúrbios aos ciclos biogeoquímicos e propiciando perda de biodiversidade (YADAV et al., 2011). Nas plantas, a salinidade pode interferir em várias funções fisiológicas, dependendo do estágio de desenvolvimento e do nível de salinidade (RIAZ et al., 2019). Estas alterações levam à redução do crescimento vegetativo, seguida de inibição/cessação da expansão celular, que por sua vez, culmina na perda de produtividade das culturas (PARIDA; DAS, 2005).

Os prejuízos do estresse salino no crescimento e desenvolvimento das plantas são resultado dos efeitos primários dos sais, que podem ser de natureza osmótica, iônica ou de ambas (HASEGAWA, 2013). O estresse osmótico é decorrente do acúmulo de íons na solução do solo, que provocam diminuição do potencial osmótico, reduzindo o potencial hídrico do ambiente radicular e dificultando, portanto, a absorção de água pelas plantas. Esse déficit hídrico é rapidamente transmitido a partir das raízes para outras partes da planta, causando redução do turgor e diminuição da expansão celular (SINGH et al., 2015). Baixos potenciais hídricos também induzem a produção de ácido abscísico (ABA) e sua sinalização nos vegetais resulta na despolarização das células-guarda e redução da abertura e condutância estomática, prejudicando assim, a fotossíntese e o metabolismo do carbono (YOO et al., 2009; KIM et al., 2010).

O estresse iônico, por sua vez, resulta dos efeitos tóxicos dos íons Na^+ e Cl^- , que, ao se acumularem no citosol das células, desestabilizam as membranas e prejudicam a atividade de muitas enzimas, afetando o metabolismo primário e secundário (KEISHAM et al., 2018; WU, 2018). Outro resultado do estresse iônico é o desequilíbrio do estado nutricional da planta,

devido à competição entre os altos níveis de Na^+ e Cl^- e outros nutrientes essenciais absorvidos pelas raízes, tais como o Ca^+ , o K^+ , o NO_3^- e o Mg^{2+} (LODEYRO; CARRILLO, 2015). Esse desequilíbrio causa diminuição no crescimento e no desenvolvimento da planta, podendo levar à morte celular (ALEMAN et al., 2011; ALQAHTANI; ROY; TESTER, 2019).

O déficit hídrico e a citotoxicidade iônica também perturbam o metabolismo aeróbico, ao provocarem o desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de desintoxicação natural das células. A falha no controle da homeostase redox leva ao fenômeno conhecido como estresse oxidativo (NOCTOR et al., 2015; DEMIDCHIK, 2015; AHMAD et al., 2019). Em razão da salinidade e outros estresses bióticos ou abióticos serem considerados agentes estressores primários, o estresse oxidativo é considerado um estresse secundário (GILL; TUTEJA, 2010). A superprodução de ROS, tais como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^\cdot), são prejudiciais às células vegetais e a de outros seres vivos em geral (NOCTOR et al., 2015), principalmente devido aos seus efeitos reativos e tóxicos. Essas ROS podem causar danos às estruturas celulares, bem como a carboidratos, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Dentre essas injúrias, pode-se destacar a desintegração da clorofila, a fragmentação do DNA, o extravasamento iônico, a peroxidação lipídica, a inibição da síntese de proteínas, a inibição enzimática e, finalmente, a morte celular (GILL et al., 2013; NOCTOR et al., 2015; AHMAD et al., 2019). A peroxidação lipídica da membrana celular desencadeia alterações na fluidez da membrana, assim como a destruição de canais e receptores celulares importantes. Além disso, as modificações nas proteínas e no material genético podem implicar em mutações, ocasionando efeitos fisiológicos e bioquímicos prejudiciais (GILL; TUTEJA, 2010).

4. 2 Tolerância das plantas à salinidade

As interações entre alguns fatores e/ou características, como a espécie, o genótipo, o tipo de sal, o tempo de exposição ao estresse, o estado de desenvolvimento da planta, podem resultar em tolerância ou susceptibilidade à salinidade em plantas (SHINOZAKI et al. 2015; PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016). A maioria das espécies cultivadas são consideradas sensíveis (glicófitas), contudo existem espécies que apresentam elevada tolerância ao estresse salino (halófitas), requerendo, inclusive, um ambiente rico em sais para que seu ciclo de vida seja completado (SHABALA, 2013).

Para sobreviver ao estresse salino, as plantas ativam respostas coordenadas a nível de planta inteira, que comumente envolvem o controle do acúmulo de Na^+ no citosol, a síntese

de osmoprotetores e a indução de enzimas e compostos antioxidativos, os quais são, respectivamente, conhecidos como ajustamento iônico, osmótico e redox (ISLAM et al., 2018; GUPTA et al., 2018; SHAHZAD et al., 2019). Todas essas estratégias envolvem o restabelecimento da homeostase celular e são divididas em dois tipos. O primeiro é de baixa complexidade e envolve mudanças em vias bioquímicas e o segundo são mecanismos de alta complexidade que fornecem proteção à maioria dos processos, como a fotossíntese e a respiração, regulação da estrutura do cromossomo e da cromatina, metilação do DNA, amplificação de sequências específicas ou eliminação do DNA (SINGH et al., 2017).

Por essa razão, a tolerância ao estresse salino é um fenômeno multigênico e multifatorial que envolve a ação sincronizada de componentes fisiológicos, bioquímicos, morfológicos e moleculares que reprogramam o metabolismo das plantas e as permitem crescer e se desenvolver mesmo sob alta salinidade. Plantas incapazes de ativar essas complexas redes regulatórias tem sensibilidade aumentada e sofrerão invariavelmente mais danos (CABELLO; LODEYRO; ZURBRIGGEN, 2014; MUCHATE et al., 2016).

4.2.1 Ajustamento osmótico e iônico

A salinidade afeta o status hídrico dos vegetais, causando diminuição no potencial osmótico, perda de água das raízes para o solo e redução do turgor celular. Tais alterações implicam em danos à fotossíntese, condutância estomática, equilíbrio redox e sinalização celular, levando à inibição do crescimento (SINGH et al., 2015).

Para recuperar o turgor, e conseqüentemente, o crescimento, plantas tolerantes ao estresse salino conseguem restabelecer o gradiente de potencial hídrico através de um processo conhecido como ajustamento osmótico (PAN et al., 2016; ROY; CHAKRABORTY et al., 2018; KHALID et al., 2020). Durante o período de ajuste, as células acumulam solutos orgânicos que reduzem o potencial osmótico, tornando o potencial hídrico das raízes menor que o do solo, o que mantém o teor relativo de água nos tecidos (BERNSTEIN, 2019).

Esses compostos ou substâncias químicas que se acumulam nas plantas sob estresse salino são denominados osmólitos ou solutos compatíveis. Os osmólitos não são tóxicos às células, mesmo sob altas concentrações e não possuem carga líquida em pH fisiológico (FAROOQ et al., 2017). Sua concentração dentro da célula é mantida pela síntese irreversível desses compostos ou por uma combinação da síntese e degradação, e informações sobre a regulação dessas vias são importantes para entender a tolerância das plantas à salinidade. (SHAHZAD et al., 2019). Além disso, o acúmulo de solutos compatíveis pode desempenhar

funções protetivas, contribuindo para a manutenção da integridade das macromoléculas, para a eliminação de várias EROs e para a estabilização de enzimas e proteínas (FAROOQ et al., 2017).

Os solutos compatíveis mais comuns em plantas podem ser classificados em três grupos principais: aminoácidos (por exemplo, prolina), aminas quaternárias (por exemplo, glicina betaína, dimetilsulfoniopropionato) e poliol/açúcares (por exemplo, manitol, trealose) (BERNSTEIN, 2019). Plantas transgênicas com capacidade de superexpressar genes relacionados à síntese desses solutos compatíveis, por exemplo, apresentam tolerância aumentada ao estresse salino (ISLAM et al., 2019).

Em folhas de *Atriplex canescens*, uma halófito, os teores de glicina betaína e prolina foram significativamente maiores com o aumento da concentração de NaCl e contribuíram em até 12 % para a redução do potencial osmótico foliar sob estresse salino. Esses achados sugerem que, em ambientes salinos, *A. canescens* é capaz de ajustar osmoticamente e contribuir para a melhoria do status hídrico na planta (PAN et al., 2016).

Além dos solutos orgânicos, os inorgânicos também estão relacionados ao ajustamento osmótico e, na maioria das vezes, podem contribuir até de modo mais significativo (PAN et al., 2016; ROY; CHAKRABORTY et al., 2018). A distribuição dos íons entre o vacúolo e o citosol é importante para a tolerância das plantas ao estresse salino (HASEGAWA, 2013, NASCIMENTO et al., 2015; FAN et al., 2016). E diferentemente do que acontece com os solutos compatíveis, que se acumulam no citosol, íons como o Na^+ e o Cl^- são citotóxicos, e para atuarem no restabelecimento do status hídrico das plantas, são estocados em compartimentos subcelulares, como vacúolos e vesículas endocíticas (ORLOVA et al., 2019; WANG et al., 2019).

Altas concentrações de Na^+ e Cl^- no citosol, por sua vez, causam danos à atividade de muitas enzimas, alteram o potencial de membrana, prejudicam o status nutricional e induzem a produção de espécies reativas de oxigênio, dentre outros (KEISHAM et al., 2018; WU, 2018). Mecanismos que regulam o fluxo iônico e o acúmulo excessivo desses íons tóxicos são determinantes para a tolerância das plantas à salinidade (ALQAHTANI; ROY; TESTER, 2019; KOTULA et al., 2019; WANG et al., 2019; BAGHOUR et al., 2019).

Plantas tolerantes ao estresse salino são aquelas capazes de manter uma alta razão K^+/Na^+ citosólica, principalmente nas folhas (VAN BEZOUW et al., 2019). Estas plantas promovem o ajustamento iônico através do efluxo de Na^+ de volta para o meio de crescimento ou para o apoplasto; da compartimentação de Na^+ no vacúolo; do controle do carregamento de Na^+ no xilema; da retenção de Na^+ nas células do caule; da recirculação de Na^+ pelo floema; da alocação de sais para folhas velhas; e/ou da excreção de Na^+ para a superfície das folhas

(exclusivo de halófitas) (YAMAGUCHI et al., 2013). Esses processos ocorrem por meio de canais e transportadores, associados à membrana plasmática ou ao tonoplasto, e são fortemente regulados (SHINOZAKI et al. 2015).

O efluxo de Na^+ de volta ao apoplasto é atribuído a um transportador do tipo antiporte Na^+/H^+ , denominado SOS1 (do inglês, **S**alt-**O**verly-**S**ensitive 1). SOS1 é uma proteína de membrana plasmática que catalisa o transporte de Na^+ contra um potencial eletroquímico, por meio de um transporte ativo secundário (HASEGAWA, 2013; KHAN; AHMAD; KHAN, 2015). Esse transportador faz parte de uma via (rota SOS) que é regulada por fosforilação e pela concentração de cálcio (Ca^{2+}) citoplasmático, bem como por sinalizadores do estresse, como o ácido abscísico (ABA) e as EROs (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005).

O excesso de Na^+ no ambiente radicular promove a ativação de canais de Ca^{2+} e o seu acúmulo no citosol. Então, a proteína de ligação ao Ca^{2+} , SOS3, interage e ativa SOS2, uma proteína quinase serina/treonina. O complexo SOS2-SOS3 fosforila SOS1, que expulsa Na^+ para fora da célula (LIN et al., 2009).

Uma forte correlação entre a exclusão de Na^+ , atividade das proteínas SOS1-3 (ou a expressão dos genes *SOS1-3* e a tolerância ao estresse salino tem sido relatada para muitas culturas (MIRANDA et al., 2017; ZHANG et al., 2018; BAGHOUR et al., 2019). Para Zhang et al. (2018) a expressão do gene *OsSOS1* foi fortemente induzida pelo estresse salino em espécies de arroz tolerantes aos sais, o que resultou em um significativo aumento na capacidade das plantas em evitar a acumulação de Na^+ e a redução de K^+ . A superexpressão do gene *SOS1* em tomate aumentou, consideravelmente, a tolerância das linhagens transgênicas ao estresse salino, possibilitando a manutenção da homeostase do K^+/Na^+ , a melhora do crescimento, do status hídrico e a produção aumentada de frutos em plantas sob estresse com NaCl (BAGHOUR et al., 2019).

A compartimentação do excesso de Na^+ nos vacúolos é uma estratégia eficiente na manutenção de baixos níveis de Na^+ citosólico, a qual evita seus efeitos deletérios sobre o metabolismo (KRISHNAMURTHY et al., 2019). É realizada por proteínas transportadoras, chamadas de NHX (do inglês, Na^+/H^+ exchanger), localizadas na membrana vacuolar, o tonoplasto (MAATHUIS; AHMAD; PATISHTAN, 2014). Essa proteína catalisa a entrada de Na^+ no vacúolo ou em endossomos (BASSIL; COKU; BLUMWALD, 2012; KRISHNAMURTHY et al., 2019). A atividade do transportador NHX é regulada por calmodulina (CaM), pela concentração de Ca^{2+} e pelo pH. Sob condições de estresse salino, o aumento do pH do vacúolo favorece o rompimento do complexo NHX-CaM e a ativação do antiporte Na^+/H^+ com a consequente compartimentação de Na^+ (YAMAGUCHI et al., 2005).

Muitos estudos têm evidenciado o papel do NHX no aumento da tolerância à salinidade (MIRANDA et al., 2017; ROY; CHAKRABORTY et al., 2018; KANDULA et al., 2019; WANG et al., 2019; WU et al., 2019). Em cevada, por exemplo, a tolerância ao estresse salino esteve mais relacionada ao sequestro de Na^+ radicular para o vacúolo, que ao processo de exclusão (WU et al., 2019). Semelhantemente, em repolho, a expressão de *BrNHX1-1* e *BrNHX1-2* foi significativamente maior em folhas da cultivar tolerante (WANG et al., 2019). Plantas de amendoim superexpressando o gene *NHX* de sorgo apresentavam melhora no crescimento, na homeostase iônica, no desempenho fotossintético e na capacidade antioxidante das plantas, o que, conseqüentemente, conferiu-lhes maior tolerância ao estresse salino (KANDULA et al., 2019).

4.2.2 Ajustamento redox

Os componentes osmóticos e iônicos do estresse salino desencadeiam falhas no controle da homeostase redox, ocasionadas pela produção elevada de EROs. As EROs são intermediários formados durante a redução do O_2 a H_2O como resultado de irregularidades na cadeia transportadora de elétrons. Estas causam danos aos principais constituintes celulares e conseqüentemente aos processos fisiológicos (PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016).

A tolerância ao estresse salino está intimamente relacionada com a ativação de robustas e complexas vias de defesa, que eliminam o excesso de EROs e causam proteção aos tecidos vegetais. Esse fenômeno conhecido como ajustamento redox, corresponde ao equilíbrio entre a produção e a remoção de O_2^- , H_2O_2 e OH^\bullet . Plantas tolerantes coordenam dois sistemas antioxidativos principais, os quais podem ser de natureza enzimática ou não (GILL; TUTEJA, 2010; CHAKRABORTY et al., 2016; AHMAD et al., 2019).

As principais enzimas antioxidativas ativadas em plantas tolerantes ao estresse salino são a catalase (CAT), a peroxidase do ascorbato (APX), a peroxidase da glutatona (GPX), dismutase do superóxido (SOD), redutase da glutatona (GR), dentre outras (NOCTOR; FOYER, 2016). A SOD constitui a primeira linha de defesa para a desintoxicação das plantas contra as ROS, pois ela catalisa a dismutação do O_2^- em H_2O_2 e O_2 . A CAT e outras peroxidases convertem o H_2O_2 em água, entretanto a CAT é mais eficiente que as outras, uma vez que é capaz de converter seis milhões de moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 por minuto. A GPX e a APX são peroxidases que decompõem o H_2O_2 pela oxidação de substratos, como o guaiacol e o ascorbato, respectivamente. A GR catalisa a redução da glutatona oxidada (GSSG), e regenera a glutatona reduzida (GSH) às custas de NADPH (GILL et al. 2013; BOSE et al., 2014; NATH et al., 2016).

Essas enzimas estão presentes no citosol e em alguns compartimentos subcelulares como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Muito embora essas enzimas atuem na eliminação direta de EROs, elas podem desempenhar outras funções importantes para a manutenção da homeostase redox, pois recuperam moléculas oxidadas e permitem à célula um ambiente redutor, o qual é importante para impedir a agregação e a inativação enzimática (GILL et al. 2013; KAPOOR et al., 2015).

Além das enzimas, alguns compostos de baixo peso molecular também atuam na eliminação de EROs. Estes podem ser de natureza lipofílica, como os tocoferóis e carotenoides, ou hidrofílica, como o ascorbato e a glutatona. Podem ter ação direta, neutralizando as EROs, ou participarem da regulação de muitos processos fisiológicos, como crescimento, diferenciação, ciclo das xantofilas, divisão celular, expressão gênica, fotossíntese, dentre outros (GALLIE, 2013; SHARMA et al., 2019).

O ascorbato e a glutatona são considerados os mais importantes para a tolerância de plantas ao estresse salino, pois juntamente com a GR e a APX participam do ciclo do ascorbato-glutatona (HASANUZZAMAN et al., 2019). O ascorbato é sintetizado principalmente pela via da D-manose/L-galactose e pode ser encontrado na forma reduzida (AsA), semi-oxidada (monodesidroascorbato - MDHA) e totalmente oxidada (desidroascorbato - DHA). A glutatona é um tripeptídeo de baixa massa molecular, constituído por glutamato, cisteína e glicina (γ -Glu-Cys-Gly) e pode existir sob duas formas: a reduzida (GSH), que possui um grupo tiol livre; e a oxidada (GSSG), que possui uma ligação dissulfeto entre duas moléculas de GSH (GILL et al. 2013; TIMME-LARAGY et al., 2013; KAPOOR et al., 2015).

Tendo em vista isso, muitos estudos tem destacado que a indução da atividade de enzimas e a síntese aumentada de compostos antioxidantes são estratégias utilizadas por plantas tolerantes ao estresse salino (SHAFI et al., 2017; SHARMA; SHARMA, 2018; MUSHKE et al., 2019; ABDELAZIZ et al., 2019; KHALID et al., 2020; ELSHEERY et al., 2020). Khalid et al. (2020) demonstraram que a melhor tolerância de plantas de citrus ao estresse salino esteve diretamente relacionada com a atividade aumentada das enzimas CAT, APX, SOD e GR em folhas e raízes, as quais foram essenciais para a redução do acúmulo dos marcadores oxidativos (MDA e H_2O_2). Adicionalmente, Gadelha et al. (2017) encontraram que a tolerância de plântulas de pinhão-manso ao estresse salino estava relacionada à ativação da expressão dos genes *CAT* e *GR* e ao aumento de GSH e AsA.

4.3 Organismo modelo: o arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma espécie vegetal pertencente à família Poaceae, da qual pertencem também os cereais: trigo, arroz, sorgo, cana-de-açúcar, todos com importância econômica. Caracteriza-se por ser uma planta anual, semiaquática, com folhas herbáceas de metabolismo fotossintético do tipo C3, raízes adventícias, inflorescências do tipo panícula, e adaptada às mais diversas condições ambientais. (TERRA, 2013). É uma cultura nativa de países asiáticos, e mais de 90% da produção global de arroz ocorre nos países da China, Índia, Indonésia e Bangladesh (MUTHAYYA et al., 2014).

Atualmente, o arroz é o terceiro cereal mais produzido no mundo, perdendo apenas para o trigo e o milho. Em 2017, sua produção mundial atingiu, aproximadamente, 769 milhões de toneladas (FAO, 2019). No Brasil, é a terceira principal cultura mais produzida e vem ocupando posições crescentes quanto ao valor da produção agropecuária, atingindo rendimento médio de 6157 quilogramas por hectare. No Estado do Ceará, a produção média, na safra 2018/2019, foi de 6,1 mil de toneladas, sendo, atualmente, o sexto maior produtor da região Nordeste, com uma área estimada de 3,7 mil de hectares (CONAB, 2019).

O arroz destaca-se tanto no aspecto econômico quanto no social, pois representa 21 % das calorias e 15 % das proteínas que compõem a dieta humana de mais de três bilhões de pessoas. Além disso, é nutricionalmente rico em fibras, minerais (fosfato, ferro e cálcio) e vitaminas (B₁, B₂ e B₃), possui baixo teor de sódio e pequeno percentual de gorduras (BASSINELLO; CASTRO, 2004; GUPTA et al., 2018). Tem atuação na renda de populações de alto e baixo poder aquisitivo (SOSBAI, 2018).

Com o aumento da população mundial, será necessário cerca de 87 % a mais de alimentos, como arroz, trigo, soja e milho até 2050. Essa expansão, por sua vez, se torna limitada, haja vista que as terras aráveis se encontram sob influência de condições ambientais irregulares (KROMDIJK; LONG, 2016). Estudos tem mostrado que aproximadamente 20 % da área total do cultivo de arroz é afetada por excesso de sais (ISLAM et al., 2018). Embora exista variação genética intraespecífica para a resistência à salinidade, essa é uma cultura considerada sensível ao estresse salino (MIRDAR MANSURI et al., 2019).

A redução na produtividade do arroz se deve, principalmente, aos efeitos deletérios do estresse salino na germinação, no crescimento, nas relações hídricas, na absorção de nutrientes e seu transporte na planta, na fotossíntese e no desenvolvimento de grãos, que estão, em geral, relacionados a desbalanços nas homeostases osmótica, iônica, bioquímica e redox (RIAZ et al., 2019; GUPTA et al., 2018; ISLAM et al., 2018). Portanto, o arroz pode constituir

um bom modelo experimental para pesquisas que buscam compreender os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares da tolerância das plantas ao estresse salino. Esse entendimento é crucial para aperfeiçoar o manejo de culturas que satisfaçam a aumentada demanda por alimentos e que tem sua produtividade limitada pela salinidade.

5 TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ESTRESSE SALINO EM CINCO CULTIVARES DE ARROZ

(Artigo a ser submetido)

Cibelle Gomes Gadelha¹, Enéas Gomes Filho^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: cibellegadelha@outlook.com.br (CGG)

* Autor correspondente

E. Gomes-Filho

Tel.: +55 85 3366 9405

E-mail: egomesf@ufc.br

Resumo

O arroz (*Oryza sativa*) é uma espécie C3 pertencente à família Poaceae. Está entre os cereais mais produzidos no mundo, juntamente com o milho e o trigo. Apresenta grande importância por ser alimento básico de mais da metade da população mundial. A salinidade dos solos e da água de irrigação constitui fator limitante para o cultivo de arroz. O estresse salino reduz a produtividade dessa cultura por afetar negativamente o crescimento e o desenvolvimento vegetal. Entretanto, as cultivares de arroz apresentam distintos graus de tolerância a esse estresse, podendo algumas, se aclimatarem à salinidade e assim evitar grandes prejuízos em sua produção. Nesse estudo, foram avaliadas as alterações promovidas pela salinidade no crescimento, nas trocas gasosas e no acúmulo de íons em cinco cultivares de arroz (BRS Pepita, BRS Sertanejo, BRS Esmeralda, BRS São Francisco e BRS Primavera), a fim de estabelecer quais delas são mais sensíveis ou tolerantes ao estresse salino. Os resultados mostraram que o estresse salino promoveu reduções no crescimento das cultivares de arroz, contudo, uma menor redução na produção de biomassa sob estresse salino promovido pela aplicação de 80 mM de NaCl foi observada na cv. BRS São Francisco, o que coincidiu com maiores taxas de assimilação de CO₂ e com o menor acúmulo de Na⁺ nos tecidos. Em contrapartida, a cv. BRS

Esmeralda foi a que mais sofreu com os danos causados pela salinidade, exibindo grave comprometimento na eficiência fotossintética, bem como um acúmulo excessivo de Na^+ citotóxico, o que, conseqüentemente, restringiu o crescimento das plantas. As cultivares BRS Pepita, BRS Sertanejo e BRS Primavera apresentaram respostas intermediárias às das outras duas cultivares para os parâmetros analisados. Por essa razão, a cultivar BRS São Francisco foi considerada mais tolerante a salinidade, enquanto a cultivar BRS Esmeralda foi a mais sensível.

Palavras-chave: Salinidade. Crescimento. Trocas gasosas. Homeostase iônica. Aclimação.

5.1 Introdução

A produção agrícola é influenciada negativamente por mudanças ambientais que alteram as condições ótimas de crescimento e desenvolvimento das plantas (LIU et al., 2017). A salinização dos solos e das fontes de água é um dos mais relevantes estresses ambientais, uma vez que afeta cerca de 1 bilhão de hectares em mais de 100 países no mundo (FAO, 2015). Em regiões áridas e semiáridas, como o Nordeste brasileiro, esse problema se torna ainda mais crítico devido às altas taxas evaporativas e à escassez de chuvas (DÍAZ-LOPES et al., 2012; CEITA et al., 2017).

A salinidade afeta o crescimento e o desenvolvimento vegetal por prejudicar vários processos fundamentais para o metabolismo vegetal, tais como: o equilíbrio nutricional, a fotossíntese, a atividade enzimática, a síntese proteica, a expressão gênica, dentre outros (HASEGAWA, 2013; ACOSTA-MOTOS et al., 2017). Estes efeitos negativos são resultantes dos estresses osmótico e iônico simultâneos promovidos pela salinidade, assim como em alguns casos do estresse oxidativo secundário (LIU et al. 2019).

O estresse osmótico reduz o potencial hídrico do ambiente radicular e, assim, dificulta a absorção de água pelas plantas. Tal desidratação causa redução do turgor e da expansão celular, como a indução da produção de ácido abscísico (ABA), que leva a limitações estomáticas e ao declínio da fotossíntese (SHAHZAD et al., 2019). O estresse iônico, por sua vez, decorre de efeitos citóxicos dos próprios íons (Na^+ e Cl^-). O acúmulo desses íons desestabiliza as membranas e desequilibra os conteúdos de K^+ e Ca^{2+} no citosol, inibindo a atividade de enzimas e levando à superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) (NATH et al., 2019). Tais espécies, quando em altas concentrações, são prejudiciais à célula, podendo levar à peroxidação de lipídios de membrana e à inibição da síntese de proteínas, e de enzimas, dentre outros efeitos (GILL *et al.*, 2013). Além disso, a competição entre os íons Na^+ ,

Cl⁻ e outros nutrientes essenciais causa danos nutricionais e, com isso, diminuição no crescimento das plantas (LODEYRO; CARRILLO, 2015).

Muitos fatores determinam como as plantas respondem ao estresse salino e, obviamente, a espécie vegetal é um deles. Até mesmo, diferentes variedades de uma mesma espécie podem ter variados graus de tolerância ou susceptibilidade à salinidade (PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016). Plantas tolerantes são capazes de evitar ou minimizar os efeitos prejudiciais do estresse salino por reprogramar vários mecanismos bioquímicos e moleculares que as permitem crescer, mesmo sob alta salinidade. Estes incluem: o controle do acúmulo de Na⁺ no citosol, a síntese de osmoprotetores, alterações nas vias fotossintéticas, modificações na estrutura das membranas, indução de enzimas antioxidativas, e hormônios vegetais, ajuste gênico e de fatores de transcrição específicos, dentre outros (PARIDA; DAS, 2005; MUCHATE et al., 2016; PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016).

O arroz (*Oryza sativa*) é uma planta C3 pertencente à família Poaceae, sendo uma cultura considerada sensível ao estresse salino; porém a extensão dessa sensibilidade depende do tempo de exposição, da severidade do estresse, das variedades e do estágio de desenvolvimento (CHUNTHABUREE et al., 2016; RADANIELSON et al., 2018; MA et al., 2018; GERONA et al., 2019). Portanto, o entendimento das complexas e contrastantes respostas que permitem às plantas de arroz sobreviverem em meio salino é essencial para o desenvolvimento de cultivares que mantenham sua produtividade sob essas condições e, assim atendam a crescente demanda global por alimentos.

O arroz é o terceiro cereal mais produzido no mundo, perdendo apenas para o trigo e o milho (FAO, 2017), sendo uma cultura de grande importância econômica, desde que alimenta mais da metade da população mundial (SINGH et al., 2019). Além disso, sabe-se que sua tolerância à salinidade é genótipo-dependente, e que métodos de classificação das plantas quanto a tolerância, bem como a identificação dos mecanismos de tolerância ao excesso de sais, são a base das pesquisas biotecnológicas (MUCHATE et al., 2016; CHANG et al., 2019; MIRDAR MANSURI et al., 2019; SINGH et al., 2019), pretende-se, com esse estudo, comparar e classificar as cultivares de arroz BRS Pepita, BRS Sertanejo, BRS Esmeralda, BRS São Francisco e BRS Primavera quanto a sensibilidade ou tolerância ao estresse salino.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 *Material vegetal e condições de cultivo*

As sementes de arroz (*Oryza sativa*) utilizadas nesse estudo foram obtidas da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA). As cultivares estudadas foram: BRS Pepita (P), BRS Sertanejo (S), BRS Esmeralda (ES), BRS São Francisco (SF) e BRS Primavera (PR). O experimento foi conduzido em Casa de Vegetação e todas as análises fisiológicas e bioquímicas, foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, ambos pertencentes ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

As sementes foram inicialmente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1,0 % por 10 minutos e, em seguida, lavadas exaustivamente com água destilada. Em seguida, foram postas para germinar em copos descartáveis contendo vermiculita umedecida com água destilada. Após sete dias, plântulas de tamanho uniforme foram transferidas para bacias contendo 10,0 L de solução nutritiva completa (Clark, 1975). O pH da solução foi monitorado diariamente, e ajustado para 6,0 quando necessário. Além disso, as soluções nutritivas foram renovadas a cada três dias para evitar deficiência nutricional.

Após sete dias de aclimação, as plantas de cada cultivar foram novamente selecionadas pela uniformidade e transferidas para baldes de 3 L (duas plantas/balde), iniciando, assim, o tratamento salino, o qual foi imposto pela adição de NaCl de forma parcelada, de modo a concentração no segundo dia de tratamento foi de 80 mM de NaCl. As coletas foram realizadas após 10 dias da imposição do tratamento salino, quando as plantas tinham 24 dias desde a semeadura.

5.2.2 *Trocas gasosas e parâmetros de crescimento*

No dia da coleta, a fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s), a transpiração (E) e a concentração interna de CO_2 (C_i) foram determinadas na primeira folha completamente expandida, a contar do ápice, utilizando-se para isso um analisador de gás no infravermelho (IRGA, mod. LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, USA).

Feito isso, dez plantas de cada tratamento (totalizando cinco repetições) foram coletadas individualmente e imersas em água destilada para lavagem das raízes. Em seguida, as plantas foram divididas em folhas e raízes, e a área foliar foi determinada com o medidor de área foliar LI-3000 (LI-COR, Inc. Lincoln, NE, USA). O material vegetal foi então colocado

em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C e, após secagem completa, foram determinadas as massas secas (MS) de folhas e de raízes.

5.2.3 Determinação dos íons K^+ e Na^+

Os extratos para a determinação dos íons K^+ e Na^+ foram obtidos após homogeneização de 50 mg do pó macerado de folhas ou raízes com 5 mL de água deionizada em tubos de ensaio, os quais foram mantidos em banho-maria a 95 °C, durante 1 h, com agitações a cada 15 min. Passado esse tempo, os tubos foram centrifugados a 3.000 x g, por 15 min, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -25 °C até sua utilização, sendo o precipitado descartado. Os teores de Na^+ e K^+ foram determinados segundo Malavolta; Vitti; Oliveira (1989), com o auxílio de um fotômetro de chama (Micronal®, modelo B462).

5.2.4 Delineamento experimental

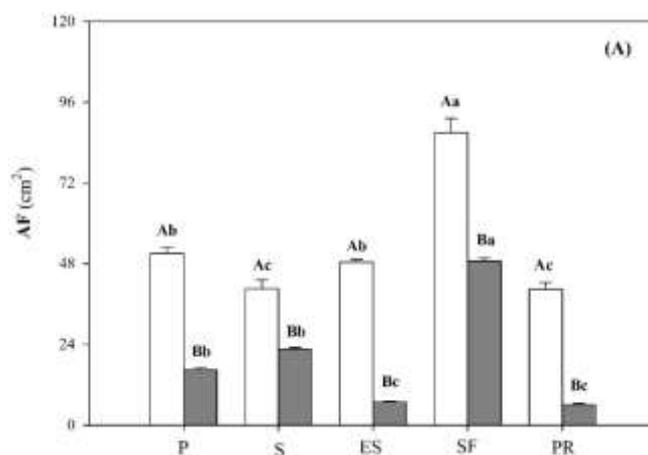
O delineamento foi inteiramente casualizado, seguindo esquema fatorial 5×2 , consistindo de cinco cultivares (P, S, ES, SF e PR) e dois tratamentos salinos (ausência e presença de estresse salino). Cada tratamento foi composto por cinco repetições, sendo a unidade experimental composta por duas plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo a $p \leq 0,05$, as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sisvar.

5.3 Resultados e discussões

A redução do crescimento e do desenvolvimento vegetal, o desequilíbrio na razão K^+/Na^+ e o comprometimento da fotossíntese são relatados como danos causados pelo estresse salino, em muitas espécies de plantas (LODEYRO; CARRILLO, 2015; NEGRÃO et al., 2017; GADELHA et al., 2017; MIRANDA et al., 2017, ARAÚJO et al., 2018; ABDELRAHEEM et al., 2019). Estes efeitos negativos que atingem as espécies vegetais servem para avaliar o quão essas são vulneráveis ao excesso de sais no ambiente radicular. Assim, nesse estudo, os parâmetros de crescimento, as trocas gasosas e o acúmulo de íons foram utilizados como indicadores de desempenho das plantas frente ao estresse salino, com o objetivo de confrontar as respostas de cinco cultivares de arroz e classificá-las em sensíveis e tolerantes à salinidade.

A área foliar (AF) de plantas de arroz foi significativamente reduzida pelo estresse salino nas cinco cultivares avaliadas (Figura 1). As maiores reduções, em comparação à condição controle, ocorreram nas cultivares ES e PR, em média 85 %. Essas cultivares, também, foram as que apresentaram menores AF em ambas as condições analisadas. Já a cultivar SF foi a que exibiu maiores valores de AF tanto na ausência quanto na presença de NaCl a 80 mM.

Figura 1- Área foliar de plantas de arroz das cultivares BRS Pepita (P), BRS Sertanejo (S), BRS Esmeralda (ES), BRS São Francisco (SF) e BRS Primavera (PR) crescidas por 10 dias sob condições controle (Solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (Solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM - colunas cinzas). Em uma mesma cultivar, médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si, enquanto que em um mesmo nível de salinidade, médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.

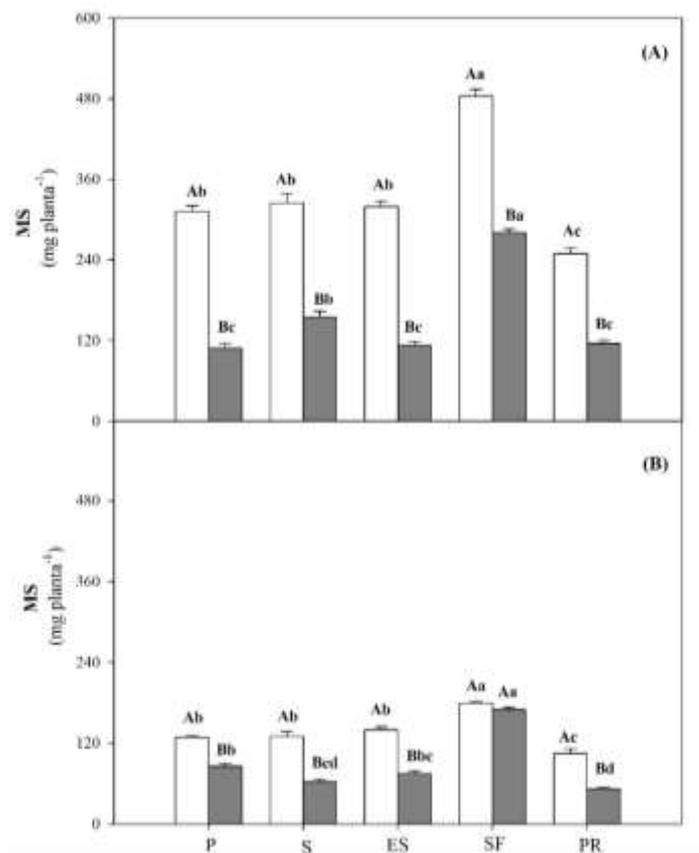


As massas secas (MS) de folhas e raízes também variaram de acordo com as diferentes cultivares (Figura 2). Sob condições controle, tanto em folhas (Fig 2A) como em raízes (Fig 2B), a cultivar SF apresentou maiores valores de MS em relação as outras quatro cultivares, enquanto PR expressou os menores. Similarmente ao ocorrido com a AF, as MS de folhas e raízes também foram reduzidas pela salinidade, e as cultivares que foram mais negativamente afetadas foram ES e PR. As reduções na massa seca causadas pelo excesso de sais na solução nutritiva foram mais evidentes nas folhas que nas raízes, nas folhas foram, em média, de 55 % (Fig 2A), e nas raízes de 37 % (Fig 2B). Novamente, foi possível observar que a cultivar SF foi a menos prejudicada pela salinidade, com uma redução de apenas 42 % na MS das folhas e nenhum prejuízo na MS das raízes.

Na literatura são reportadas reduções semelhantes à observada aqui na produção de biomassa de diversas culturas importantes, como o milho (RICHTER et al., 2015), o sorgo (SILVA et al., 2019), o feijão (MAHMOOD et al., 2016), o girassol (ARAÚJO et al., 2018), a cevada (FU et al., 2018), dentre outros. Nesses estudos, os genótipos considerados mais tolerantes foram aqueles que apresentaram menores reduções na AF, na MS de folhas e raízes,

no comprimento da planta além de menores alterações fenotípicas. De modo similar, o comprimento da parte aérea e o peso fresco da raiz foram afetados negativamente pela salinidade apenas na cultivar de arroz sensível ao sal (Nipponbare) (CHANG et al., 2019). Liu et al. (2017) também constatou que o crescimento de plântulas foi inibido pelo estresse salino em duas variedades de arroz e que o crescimento na variedade tolerante foi melhor que na variedade sensível.

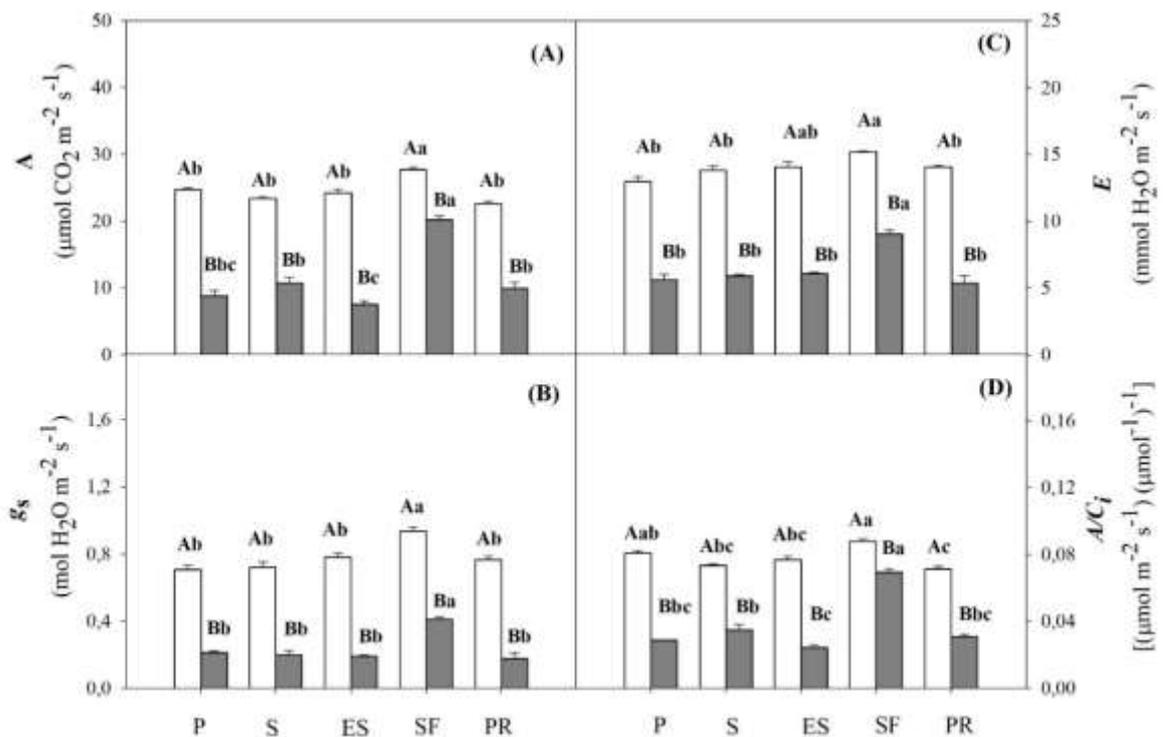
Figura 2- Massa seca de folhas (A) e raízes (B) de plantas de arroz das cultivares BRS Pepita (P), BRS Sertanejo (S), BRS Esmeralda (ES), BRS São Francisco (SF) e BRS Primavera (PR) crescidas por 10 dias sob condições controle (Solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (Solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM; colunas cinzas). Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.



Juntamente com o crescimento celular, a fotossíntese está entre os principais processos prejudicados pela salinidade (GOUSSI et al., 2018; IVANOVA et al., 2019; NAJAR et al., 2019). No presente estudo, a salinidade causou danos às trocas gasosas, levando a reduções significativas na fotossíntese líquida (A), na condutância estomática (*g_s*), na transpiração (*E*) e na eficiência de carboxilação da Rubisco (*A/C_i*) em todas as cinco cultivares analisadas (Figura 3). Mais uma vez, a cultivar SF foi a que menos sofreu os efeitos deletérios da salinidade. As reduções causadas pelo estresse salino nessa cultivar foram de 26 % na A (Fig 3A), de 56 % na *g_s* (Fig 3B), de 40 % na *E* (Fig 3C) e de 20 % na *A/C_i* (Fig 3D), enquanto que

nas outras cultivares, essas reduções médias foram de 63, 74, 58 e 65%, respectivamente em A , g_s , E e A/C_i . A cultivar ES apresentou reduções ainda mais severas na A , na g_s e na A/C_i que as das outras cultivares, atingindo valores de 70, 77 e 71 % menores que aqueles da condição controle, respectivamente. A cultivar PR expressou a maior redução na E , 64 %. Já sob condições controle, houve poucas diferenças nas trocas gasosas entre as cultivares, com exceção de que os valores de A e g_s foram superiores na cv. SF.

Figura 3- Fotossíntese líquida- A (A), condutância estomática- g_s (B), transpiração- E (C), eficiência de carboxilação da Rubisco- A/C_i (D) de plantas de arroz das cultivares BRS Pepita (P), BRS Sertanejo (S), BRS Esmeralda (ES), BRS São Francisco (SF) e BRS Primavera (PR) crescidas por 10 dias sob condições controle (Solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (Solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM; colunas cinzas). Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.



Desse modo, os dados evidenciam claramente que plantas de arroz da cultivar SF apresentaram melhor desempenho fotossintético quando submetidas à salinidade que as outras cultivares avaliadas, especialmente ES. Em adição, as taxas fotossintéticas das plantas SF e ES sob salinidade estão em concordância, respectivamente, com a maior e menor eficiência de carboxilação da Rubisco (Fig 3D). Como a fotossíntese é o principal processo responsável pela síntese de biomassa, pode-se correlacionar a maior fotossíntese com um maior investimento em massa vegetal, e assim, melhor crescimento/tolerância de plantas de arroz cv. SF às condições de estresse salino ao contrário das plantas da cv. ES.

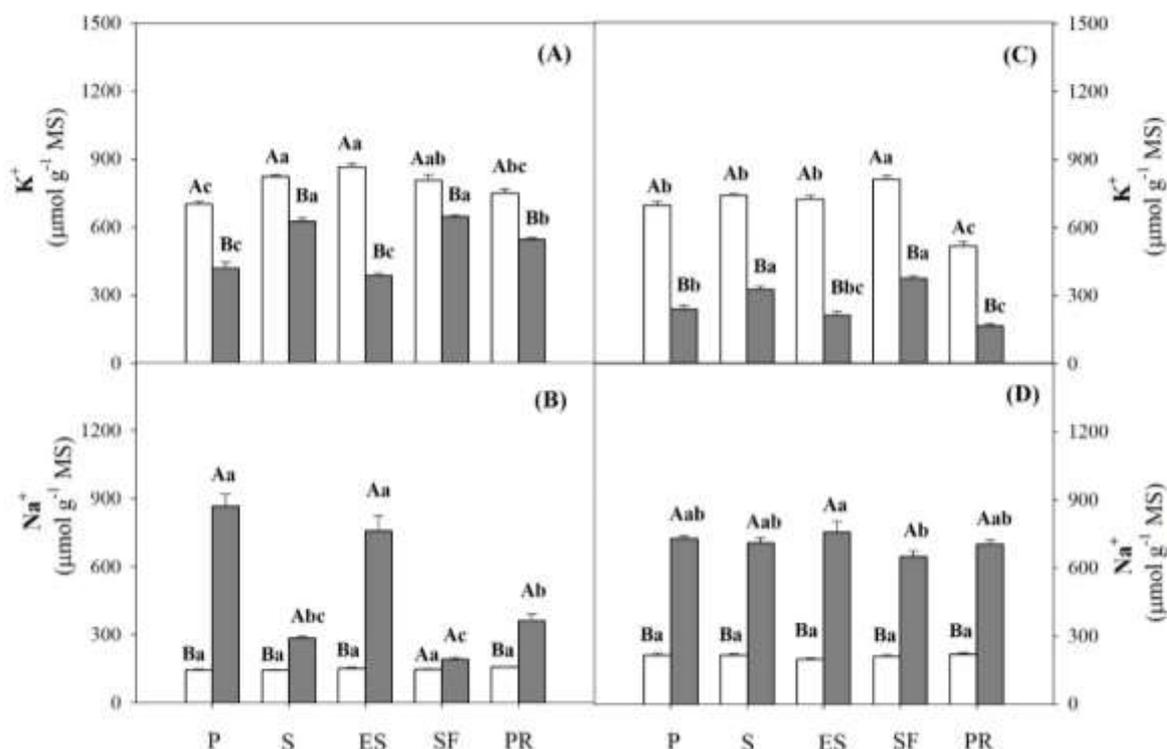
Assim como este estudo, muitos outros têm constatado que plantas tolerantes ao estresse salino apresentam uma maior eficiência fotossintética que plantas sensíveis

(MEDEIROS et al., 2013; RADANIELSON et al., 2018; ARAÚJO et al., 2018; IVANOVA et al., 2019; SILVA et al., 2019; SOUSA et al., 2019). Em plantas de sorgo sacarino irrigadas com águas salinas, por exemplo, apesar das inibições no crescimento e na fotossíntese ocasionados pela salinidade, a cultivar CSF 11 apresentou valores de AF , A , g_s e E superiores aos das cultivares CSF 15, P76 e P298 e foi, assim, considerada tolerante ao estresse salino (SILVA et al., 2019). Sousa et al. (2019) também reportou que, dentre seis cultivares de melão, a cultivar Natal foi a menos comprometida pela salinidade em termos de fotossíntese (A , g_s e E), o que coincidiu com o melhor índice de tolerância quando os níveis de condutividade elétrica da água de irrigação eram superiores a $2,5 \text{ dS m}^{-1}$.

A manutenção de uma alta razão K^+/Na^+ citosólica, especialmente em folhas, é considerada determinante para a tolerância de plantas à salinidade (HASEGAWA, 2013; REDWAN; SPINELLI; MANCUSO, 2016; MIRANDA et al., 2017; LIU et al., 2019). Os teores de potássio foram cultivar-dependentes (Figura 4). Sob condições controle, foram observadas pequenas variações nos teores de K^+ nas folhas, de modo que as cultivares que mais armazenaram K^+ foram S, ES e SF (Fig 4A). Por outro lado, a SF apresentou teor de K^+ nas raízes 21 % superior aos das outras cultivares avaliadas, enquanto a cv. PR apresentou teor de K^+ 30 % menor que a média dos valores das outras cultivares (Fig 4B). A salinidade, porém, reduziu significativamente os teores de K^+ e tais reduções foram menos severas nas cultivares Sertanejo (S) e SF, tanto em folhas quanto em raízes (Fig 4A, B). Em folhas, as maiores reduções nos teores de K^+ provocadas pela salinidade ocorreram nas cultivares P e ES, sendo respectivamente 40 % e 55 % menores que na condição controle, enquanto, nas raízes, as maiores reduções foram nas cultivares ES e PR, respectivamente, 70 e 67 %. Os teores de Na^+ entre as diversas cultivares foram semelhantes independentemente do órgão analisado (Fig 4B e D). A salinidade, contudo, provocou acúmulos excessivos desse íon tanto nas folhas quanto nas raízes. Nas folhas das cultivares P e ES, os teores de Na^+ foram 5 e 4 vezes superiores aos do controle, respectivamente. Nas raízes, os aumentos foram de aproximadamente 2,3 vezes, para as cultivares. No entanto, vale ressaltar que, sob estresse salino, a cv. SF acumulou menos Na^+ dentre as cultivares avaliadas, especialmente nas folhas, não sendo observada diferença entre os valores do controle e o do tratamento salino.

A manutenção de uma alta relação K^+/Na^+ citosólica é essencial para a continuidade dos processos celulares, principalmente as atividades enzimáticas e a integridade das membranas (RIAZ et al., 2019). De acordo com os nossos resultados, nas cultivares P, ES e PR a homeostase iônica foi rompida, devido às significativas reduções nos teores de K^+ e ao maior acúmulo de Na^+ . Na cv. SF, porém, menos danos à razão K^+/Na^+ foram exibidos.

Figura 4- Teores de potássio (K^+) e sódio (Na^+) em folhas (A e B) e raízes (C e D) de plantas de arroz das cultivares BRS Pepita (P), BRS Sertanejo (S), BRS Esmeralda (ES), BRS São Francisco (SF) e BRS Primavera (PR) crescidas por 10 dias sob condições controle (Solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (Solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM; colunas cinzas). Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.



Ao comparar dois genótipos de girassol crescidos sob excesso de sais, Araújo et al. (2018) observaram que a melhor homeostase K^+/Na^+ ocorreu na cv. BRS 321 (tolerante à salinidade) em comparação a cv. Catissol (sensível à salinidade). Em um estudo com variedades contrastantes de arroz sob estresse salino de 100 mM de NaCl, a cv. Reiziq, considerada tolerante, acumulou menos Na^+ e mais K^+ na parte aérea e em raízes em comparação à cv. Koshihikari, considerada sensível à salinidade (LIU et al., 2019). Esses mesmos autores também encontraram que variedades tolerantes tiveram uma reduzida translocação de Na^+ de raízes para parte aérea, que foi, em parte, mediado pela expressão do gene *OsSOS*. Tendo em vista isso, nossos achados sugerem, também, que a cv. SF restringe o acúmulo de Na^+ , especialmente nas folhas, e isso pode estar relacionado à ativação de transportadores do tipo SOS ou NHX, responsáveis pela exclusão e compartimentação desse íon que é tóxico ao citosol (ASSARA et al., 2017; FU et al., 2018; RAZZAKE et al., 2019).

Sendo assim, pode-se sugerir que a alta relação K^+/Na^+ na cv. SF está intimamente relacionado com menos danos ao aparato fotossintético, trocas gasosas mais eficientes e uma alta eficiência de carboxilação da Rubisco, contribuindo para maior investimento em massa vegetal e a habilidade de crescer mesmo sob estresse salino. Richter et al. (2015), por exemplo, observaram que baixas concentrações de NaCl (25 e 50 mM) já eram suficientes para reduzir a

biomassa da parte aérea de plantas de milho sensíveis ao estresse salino. Porém, em híbridos tolerantes, essa redução ocorria em menor grau e apenas a partir da concentração de 75 mM de NaCl. Ainda nesse trabalho, a tolerância de SR08 (híbrido tolerante) foi associada à menor absorção de Na^+ e a síntese de metabólitos do ciclo do ácido cítrico (RICHTER et al, 2015). Gerona et al. (2019) demonstraram que as cultivares de arroz sensíveis e tolerantes à salinidade diferiam tanto nas variáveis de crescimento, como na porcentagem de grãos cheios e a viabilidade do pólen, o que causava perdas consideráveis de produtividade nas sensíveis. Além disso, os ganhos de crescimento nas cultivares tolerantes (IR670 e Pokkali) foram correlacionados com baixa razão Na^+/K^+ , melhor homeostase oxidativa e menor redução no conteúdo de clorofila (GERONA et al., 2019).

Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que as cinco cultivares analisadas apresentaram tolerância diferencial ao estresse salino. E assim, nas condições experimentais adotadas, podem ser classificadas em sensíveis, moderadamente sensíveis e tolerantes. A redução do crescimento, os prejuízos às trocas gasosas e o rompimento da homeostase iônica foram mais evidentes nas cultivares ES e PR, e por isso, foram consideradas sensíveis à salinidade. De modo consistente, a cultivar SF foi a que menos sofreu com os efeitos deletérios do excesso de sais. Essa cultivar foi capaz de suportar ou se ajustar à condição estressante imposta, mantendo a homeostase iônica, o funcionamento das trocas gasosas, e consequentemente, o seu crescimento.

5.4 Conclusão

A cv. SF foi mais tolerante ao estresse salino em comparação as outras cultivares avaliadas, enquanto as cultivares P e S foram moderadamente sensíveis, e as cultivares ES e PR se mostraram as mais sensíveis, especialmente a cv. ES.

6 SODIUM UPTAKE AND TRANSPORT REGULATION AND PHOTOSYNTHETIC EFFICIENCY MAINTENANCE AS THE BASIS OF DIFFERENTIAL SALT TOLERANCE IN RICE CULTIVARS

(Artigo submetido no periódico *Plant Cell Report*)

Cibelle Gomes Gadelha¹, Ítalo Antonio Cotta Coutinho², Sergimar Kennedy de Paiva Pinheiro³, Emilio de Castro Miguel³, Humberto Henrique de Carvalho¹, Lineker de Sousa Lopes¹, Enéas Gomes Filho^{1*}

Affiliations:

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail addresses: cibellegadelha@outlook.com.br (CGG); humberto.carvalho@ufc.br (HHC); linekerlk@gmail.com (LSL).

² Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, 60440-554, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail addresses: italocoutinho@hotmail.com (IACC)

³ Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, 60440-554, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail addresses: sergimarkennedy@hotmail.com (SKPP); emilio.decastromiguel@gmail.com (ECM)

* Corresponding authors: E. Gomes-Filho; Tel.: +55 85 3366 9405; E-mail address: egomesf@ufc.br

Abstract

Key message: The salt stress tolerance in BRS São Francisco rice cultivars was partially explained by their ability to avoid tissues Na⁺ toxicity and photosynthetic apparatus damage. Rice (*Oryza sativa* L.) is among the most consumed cereals in the world. Its growth is severely affected by excessive salinity, could have serious economic impacts. Thus, to investigate how salt stress influences rice metabolism, both BRS Esmeralda and BRS São Francisco cultivars were evaluated based on ionic homeostasis and photosynthetic capacity. Phenotypic, physiological, molecular, and morphological results indicated that BRS São Francisco had an enhanced capacity to withstand salt stress compared to BRS Esmeralda. Although salinity promoted a significant increase in Na⁺ content, especially in BRS Esmeralda, the harmful effects were less severe in BRS São Francisco. The upregulation of SOS and NHX genes expressions reveal that BRS São Francisco has mechanisms of control of Na⁺ accumulation in cytosol. Also, BRS São Francisco plants were efficient in reducing the adverse effects of salinity on photosynthesis. Under salt stress, BRS São Francisco leaves showed higher effective quantum efficiency of PSII, photochemical extinction coefficient and electron transport rate, whereas excess relative energy in PSII and non-photochemical quenching were both reduced compared to BRS Esmeralda. Reduced photosynthetic capacity and Na⁺ cytotoxic effects had led to damage to chloroplast ultrastructure in BRS Esmeralda. Therefore, the salt stress

tolerance involves multifactorial alterations and that survivability of BRS São Francisco cultivar was resulted from efficient Na⁺ exclusion and maintenance of photosynthetic capacity, leading to lower growth losses. The findings are suitable for the understanding of salt responses and will be helpful in the development of functional markers associated with salt stress tolerance improvement in rice.

Keywords: Salt stress · *Oryza sativa* · Gene expression · Photosynthesis · Ionic homeostasis · Chloroplast ultrastructure

6.1 Introduction

Rice (*Oryza sativa* L.) is a cereal and staple food crop for more than half of the world's population (Singh et al., 2019). The importance of stimulating its production is closely related to the increasing demand for food from a growing population. However, the development and grain yield of this crop is negatively affected by a range of environmental stresses (Mantri et al. 2012). Among those abiotic stresses, salinity is one of the most relevant, since it affects about 1 billion hectares in more than 100 countries of the world, thus severely compromising world agricultural productivity (FAO 2015). The impact of salt stress on plant development is mainly a result of reduced osmotic potential in the root environment and excessive Na⁺ and Cl⁻ ions accumulation into cells. In addition, salt stress can lead to reactive oxygen species (ROS) overproduction, disrupting regular cell metabolism, and causing damage to cellular components (Gadelha et al. 2017).

Rice is considered a salt-sensitive crop, once this stress imposes a reduction of seed germination rate, inhibition of photosynthesis, ionic toxicity, reduction in water absorption, chlorosis and senescence, among others, culminating in oxidative stress, reduced growth and losses grain yield (Islam et al. 2018). However, not all rice varieties respond equally to salt stress, and some studies have already pointed out that some genotypes/cultivars have distinct salinity tolerance mechanisms (Chang et al. 2019; Gerona et al. 2019; Liu et al. 2019; Singh et al. 2019; Frukh et al. 2020).

Salinity can interfere with various plant physiological functions such as water and nutritional balance, enzymatic activity, protein synthesis and gene expression (Hasegawa 2013). Particularly, the reduction of plant growth is associated with reductions in photosynthetic rates (Mahlooji et al. 2018; Najjar et al., 2019). Saline stress, in turn, causes decreased stomatal opening, limiting gas exchange, as well as damaging photosystems, electron

transport, and chloroplast structure, reducing enzyme pigments and inhibiting the enzymes involved with CO₂ fixation (Negrão et al. 2018; Shahzad et al. 2019).

Some plants can prevent/minimize the harmful effects of salt stress by reprogramming various biochemical and molecular processes. These responses are mainly related to the restoration of cellular homeostasis, as strict control of Na⁺ accumulation in the cytosol, osmoprotectant accumulation, changes in both carbon metabolism and photosynthesis photochemistry, membrane structure modification, antioxidant enzymes activation, and plant hormones induction, among others. (Keisham et al. 2018; Wu, 2018; Shahzad et al. 2019).

Particularly, strategies such as Na⁺ efflux back to the growth medium or the apoplast, Na⁺ compartmentalization into vacuole; the control of xylem loading, Na⁺ retention in stem cells, Na⁺ recirculation by phloem, the allocation of salts to old leaves, and /or Na⁺ excretion to the leaf surface (halophytes only) are essential for salt stress tolerance (Yamaguchi et al. 2013). This ionic adjustment is mediated by channels or antiport carriers (Na/K), including SOS and NHX transporter families. The salt overly sensitive (SOS) signaling pathway located on the plasma membrane realizes Na⁺ root extrusion. Besides, NHX transporters located in tonoplast catalyzes the entry of Na⁺ into the vacuole or endosomes (Khan et al. 2015; Wu 2018). Both act to maintain low levels of Na⁺ cytosolic, which avoids its harmful effects on metabolism (Krishnamurthy et al. 2019).

Given this, the present work aimed to broaden the knowledge about the development of rice plants under saline stress, as well as to evaluate the differential tolerance to salinity of rice cultivars, seeking to understand and elucidate the regulatory mechanisms and the molecular routes involved in this process. In our preliminary studies, it was found that BRS São Francisco cultivar was the most tolerant compared to the other four rice cultivars analyzed, while BRS Esmeralda cultivar was one of the most sensitive when grown for 10 days in presence of 80 mM NaCl. Thereby, we hypothesized that plants of BRS São Francisco cultivar activate mechanisms to control the accumulation of sodium, which allow the maintenance of the efficiency in photosynthesis and the consequent growth of these plants under conditions of salt stress. Our findings allow us to analyze in an integrated manner the physiological, biochemical, anatomical and molecular changes of cultivars, which are differentially susceptible to salinity and thus contribute rice breeding program and to the future production of this food culture in stress conditions

6.2 Materials and Methods

6.2.1 *Plant material and growth conditions*

Seeds of BRS Esmeralda (ES) and BRS São Francisco (SF) rice cultivars, supplied from Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Recife, Brazil, were sown in vermiculite moistened with distilled water. After 7 days, the seedlings were transferred to a hydroponic system containing nutrient solution (Clark, 1975). After 7 days more, half of the plants were transferred to buckets (two plants per bucket) containing nutrient solution added NaCl (salt stress condition - 80 mM NaCl). The saline treatment was applied in two doses to avoid osmotic shock and reaching the final concentration of 80 mM NaCl. The other half of the plants remained in the nutrient solution without NaCl (control condition). The pH solution was monitored daily and adjusted to 6.0 as needed. In addition, nutrient solutions were renewed every three days to prevent nutritional deficiency. During the experiments, the greenhouse conditions were as following: midday photosynthetic photon flux density approximately $1,200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mean temperature of $32.2 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ during the day and $25.9 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ at night and mean relative humidity of $63.4 \pm 16\%$. The harvests were performed at 0, 12, 24, 48 h after exposure to NaCl only for real-time quantitative PCR (qPCR) analysis, and at 6 and 12 days for other biochemical analyses.

6.2.2 *Growth parameters*

Ten plants from each treatment (five repetitions) were individually harvested. The leaf area was measured using a LI-3000 leaf area meter (LI-COR, Inc. Lincoln, NE, USA). Subsequently, plant material was separated into two groups. In the first group, the plant material was divided into leaves, roots and stems for drying in a forced-air circulation oven at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ for 48 h, so the dry mass was determined. In the second group, the fresh leaves and roots tissues were frozen immediately in liquid nitrogen and kept at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ for biochemical analysis and qPCR assays.

6.2.3 *Gas exchange and chlorophyll a fluorescence*

Gas exchange and chlorophyll a fluorescence measurements were performed in fully expanded leaves under constant CO_2 concentration and photosynthetic photon flux density

(PPFD) of $400 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{CO}_2$ and $1.200 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. Before harvesting, gas exchange [stomatal conductance (g_s), CO_2 assimilation (A) and transpiration (E)] on the first fully expanded leaf from the apex was determined using an infrared gas analyzer - IRGA (LI-6400XT, LI-COR, USA) coupled with artificial light. The carboxylation efficiency of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) was estimated by the ratio A/C_i . Others parameters were also evaluated using a fluorometer (6400-40, LI-COR, USA) coupled to IRGA in dark-adapted leaves, as effective quantum yield of PSII [$\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$], non-photochemical quenching [$\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'$], photochemical quenching [$q_P = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$], maximum quantum yield of photosystem II (PSII) in dark-adapted leaves [$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$], energy excess at the PSII level [$\text{EXC} = (F_v/F_m) - (\Phi_{\text{PSII}})/(F_v/F_m)$], and electron transport rate [$\text{ETR} = (\Phi_{\text{PSII}} \times \text{PPFD} \times 0.5 \times 0.84)$] (Araújo et al. 2018).

6.2.4 Photosynthetic pigments

The chlorophyll *a* (Chl *a*), chlorophyll *b* (Chl *b*), and carotenoids were extracted in dimethyl sulfoxide (DMSO) saturated with CaCO_3 for 48 h at room temperature. Photosynthetic pigments were spectrophotometrically measured by absorbance reading at 480 nm, 649 nm and 665 nm, and the concentrations were calculated as reported by Wellburn (1994), through the following equations: Chl *a* = $12.47A_{665} - 3.62A_{649}$; Chl *b* = $25.06A_{649} - 6.50A_{665}$; total chlorophyll (Chl *total*) = $7.15A_{665} + 18.71A_{649}$, and carotenoids = $(1000A_{480} - 1.29 \text{ Chl } a - 53.78 \text{ Chl } b)/220$.

6.2.5 Chloroplast ultrastructure

For ultrastructure observation, fresh leaves (last fully expanded leaf) were cut into 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing 2.5% glutaraldehyde (v/v) and 4% paraformaldehyde. The fixed samples were washed in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), and post-fixed in 1% (w/v) osmium tetroxide (OsO_4). After dehydration in a graded series of acetone solutions, the samples were embedded in epoxy resin (EMbed 812) according to Yamane et al. (2012) with some modifications. Ultrathin cuts were collected on 300-mesh copper grids, then stained with 2% uranyl acetate and 0.5% lead citrate. Chloroplast structure was observed using a Transmission Electron Microscope (JEOL JEM 101) at 100 kV.

6.2.6 Ions contents and Na⁺ and K⁺ loading in xylem sap

Extracts were obtained after homogenization of 50 mg of the dry mass of leaves and roots in 5 mL deionized water at 95 °C for 1 h and centrifuged at 3.000 x g for 10 min. The Na⁺ and K⁺ contents were determined by flame photometry (Micronal®, model B462) according to Malavolta et al. (1989).

Xylem sap was collected from plants according to Pandolfi et al. (2012). The roots were cut about 2 cm above the shoot-root junction and placed in a pressure chamber (Scholander-PMS Instrument Company, USA), in which a sufficient pressure (10 to 25 bar) for xylem sap exudation was applied. Then, the K⁺ and Na⁺ were measured in crude exudate by flame photometry as described above.

6.2.7 Detection of Na⁺ by confocal microscopy

Leaf samples from both ES and SF rice cultivars subjected to control conditions and 80 mM NaCl were collected on 6 and 12 days. Free hand-sections of leaves of ~20 µm were made with aid of double-edged razor blades and dry pith petioles from *Cecropia* Loefl., used as support for sectioning (Silva et al. 2013). Sections were placed on 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4 (Sigma-Aldrich) and later subjected to Asante NaTRIUM Green-2 AM (cell membrane permeable cytosolic Na⁺ indicator) (Lamy and Chatton 2011; Roder and Hille 2014) for 1 h with a fluorophore at 5 µM final working solution. Sections were washed at least three times (5 min each) in PBS, mounted in 0.01 M phosphate-buffered saline at pH 7.4 and sealed with commercial nail polish. Imaging was pictured on an upright microscope (LSM710 NLO, Carl Zeiss, Jena) at Central Analítica – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil, with emission set at 540 nm and excitation at 488 nm.

6.2.8 Gene expression analysis

Total RNA was isolated from root tissues using an SV Total RNA isolation system (Promega, USA), according to the manufacturer's instructions. The concentration of total RNA was measured through a Nanodrop2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA), and its purity was checked by analyzing the A₂₆₀/A₂₈₀ and A₂₆₀/A₂₃₀ absorbance ratios. First-strand cDNA was synthesized employing the M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), according to the manufacturer's protocol. Specific primer (*OsSOS1-3* and *OsNHX1-6*) and

reference gene (*OsUBQ5*) were synthesized as described by Çelik et al. (2019), Passricha et al. (2019), Fu et al. (2018) and Zhang et al. (2018), respectively (Table S1). qPCR was performed on a Mastercycler ep realplex 4S (Eppendorf, Germany) using GoTaq®qPCR Master Mix. Relative expression was calculated employing the cycle threshold (CT) $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001).

6.2.9 Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized, with a 2×2 factorial scheme. Composed by two rice cultivars (ES and SF) and two growth conditions (control and salt stress). Each treatment was performed using five repetitions, except for gene expression analysis that was considered only three repetitions, and each repetition consisted of two plants. The data were submitted to a two-way analysis of variance (ANOVA), and the main values were compared by F-test ($p < 0.05$). Statistical analyses were performed using the Sisvar® 5.3 software.

6.3 Results

6.3.1 Effects of salt stress in growth

Plants of ES and SF rice cultivars were grown under salt stress in order to evaluate the main mechanisms that contribute to the differential tolerance to salinity. Salt stress limited the growth of rice plants (Table 1). The leaf area of both cultivars was severely reduced by salinity and this reduction was even more pronounced after 12 days under salt stress. The leaf area of ES cultivar was reduced by salinity by 51 and 87% at 6 and 12 days of stress, respectively, while in SF cultivar these reductions were smaller, 44 and 64%, respectively. Moreover, when grown in the presence of 80 mM NaCl, the leaf areas in SF cultivar were 85 and 325% higher than those in ES cultivar, at 6 and 12 days, respectively.

Similarly, dry masses of leaves, roots, and stems were also reduced by salt stress. Regarding the control, leaf dry mass of ES cultivar was reduced by salt stress by 60 and 82% at 6 and 12 days of stress, respectively, while in SF cultivar these reductions were 44 and 62%, respectively (Table 1). Also, in the roots, the largest reductions in dry mass due to salt stress were in ES cultivar, with reductions of 33 and 49% at 6 and 12 days of stress, while in SF cultivar these reductions were 17 and 25%, respectively. In the stem, at 6 days of stress, no

Table 1. Leaf area and dry masses of leaves, roots, stems, and total of BRS Esmeralda and BRS São Francisco rice cultivars grown under absence (Control) and presence of 80 mM NaCl (Salt stress) for 6 and 12 days

Days of treatments	Cultivars	Leaf area (cm ²)		Dry mass (g plant ⁻¹)							
				Leaves		Roots		Stems		Total	
		Control	Salt stress	Control	Salt stress	Control	Salt stress	Control	Salt stress	Control	Salt stress
6	BRS Esmeralda	39.89 Ab	19.52 Bb	0.40 Ab	0.16 Bb	0.15 Ab	0.10 Bb	0.13 Ab	0.14 Ab	0.68 Ab	0.40 Bb
	BRS São Francisco	64.40 Aa	36.10 Ba	0.57 Aa	0.32 Ba	0.18 Aa	0.15 Ba	0.19 Aa	0.20 Aa	0.94 Aa	0.67 Ba
12	BRS Esmeralda	173.18 Ab	23.21 Bb	1.12 Ab	0.20 Bb	0.35 Ab	0.18 Bb	0.34 Ab	0.18 Bb	1.81 Ab	0.56 Bb
	BRS São Francisco	270.25 Aa	98.70 Ba	1.81 Aa	0.68 Ba	0.51 Aa	0.38 Ba	0.64 Aa	0.37 Ba	2.96 Aa	1.43 Ba

On the same day, different capital letters denote significant changes due to salt stress and different lowercase letters represent significant changes due to rice cultivars according to F-test ($p \leq 0.05$). The data represent the mean of five replicates.

change in dry mass of the two cultivars were detected, but at 12 days the dry mass was reduced by salinity in 47 and 42% in cultivars ES and SF, respectively. As a result of these changes caused by salinity, the total dry mass of ES cultivar was reduced by 41 and 69% at 6 and 12 days, respectively, while in SF cultivar such reductions were 29 and 52%, respectively. These results were supported by the better phenotypic appearance of SF plants, which presented a higher number of tillers and invested more in aerial part than those of the ES cultivar (Fig. 5).

6.3.2 Effects of salt stress in photosynthesis parameters

Salinity promoted considerable reductions in A, gs, E, and A/Ci on both cultivars at all analyzed times (Fig. 6). Although this occurred, the reductions caused by salt stress were, in general, less severe in SF plants. The reductions in A (Fig. 6a), gs (Fig. 6b), E (Fig. 6c) and A/Ci (Fig. 6d) in ES cultivar were 64, 45, 55 and 62 %, respectively, at 6 days and 52, 66, 59 and 37 %, respectively, at 12 days. In SF cultivar, these reductions were 47, 28, 16 and 63 %, respectively, at 6 days and 33, 62, 38 and 22 %, respectively, at 12 days.

In general, salt excess in the root environment also reduced the ϕ PSII, qP, and ETR (Fig. 7a, c, f). Such reductions were less evident or did not occur in SF plants. At 6 days the reductions in ϕ PSII, qP, and ETR in ES cultivar were 27, 06 and 25 %, respectively, while in SF cultivar only ϕ PSII and ETR were reduced by 14 and 12 %, respectively. At 12 days the reductions in ϕ PSII, qP, and ETR in ES cultivar were 35, 17 and 39 %, respectively, while in SF cultivar only ϕ PSII and ETR were reduced by 08 and 11 %, respectively. Additionally, it was possible to observe that salinity caused increases in the NPQ, and EXC, mainly in ES plants (Fig. 7b, e). In ES cultivar, these increases in NPQ and EXC were 62 and 26%, respectively, at 6 days and 135 and 31%, respectively, at 12 days. On the other hand, the values of NPQ and EXC were 12 and 8% higher in SF plants under salinity than in those under control at 6 days, and 48 and 7% higher, respectively, at 12 days. There were no significant changes caused by salinity in the Fv/Fm (Fig. 7d).

Few changes occurred in the content of chlorophylls due to salinity (Table 2). At 6 days, when compared to controls, there was an increase in Chl a, Chl b and Chl total contents in ES cultivar of 16, 20 and 15 %, respectively; in SF cultivar, salt stress did not change chlorophyll content. At 12 days, only the Chl b content of SF cultivar was altered by salinity, with an increase of 22% compared to control. On the other hand, carotenoid contents were generally reduced by salinity, such losses were more significant in ES plants, especially at 6

Figure 5- Phenotypical appearance of BRS Esmeralda (ES) and BRS São Francisco (SF) rice cultivars grown under absence (control; **a, b**) and presence of 80 mM NaCl (salt stress; **c, d**) for 12 days. Scale bars (**a-d**), 10 cm.

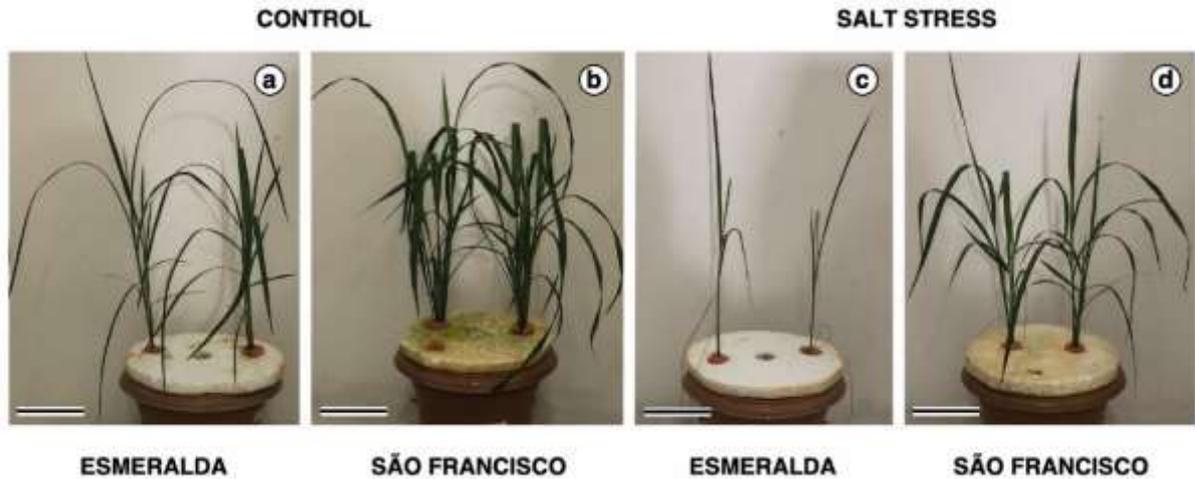


Figure 6- CO_2 assimilation rate (A , a), stomatal conductance (g_s , b), transpiration rate (E , c), and carboxylation efficiency of Rubisco (A/C_i , d) of BRS Esmeralda (ES- without hatch) and BRS São Francisco (SF- with hatch) rice cultivars grown under absence (white bar) and presence (gray bar) of 80 mM NaCl for 6 and 12 days. On the same day, different capital letters denote significant changes due to salt stress and different lowercase letters represent significant changes due to rice cultivars according to F-test ($p \leq 0.05$). The data represent the mean of five replicates.

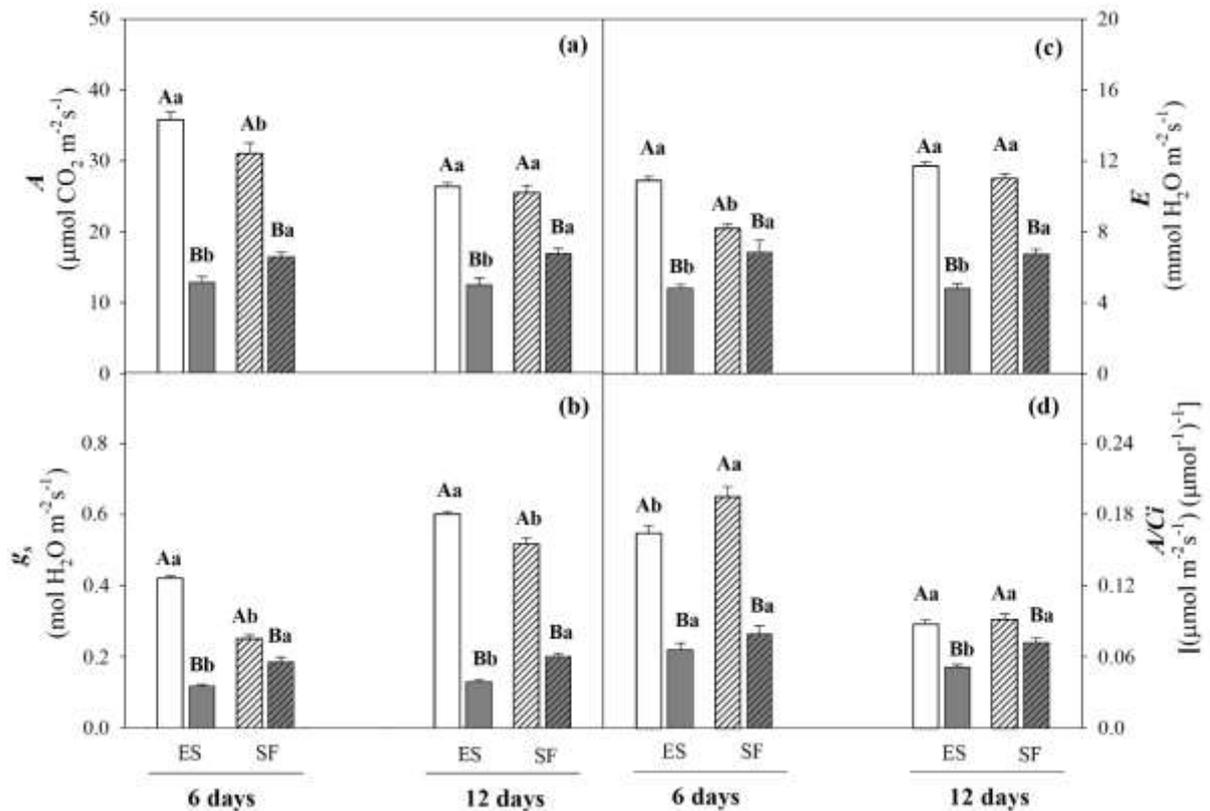


Figure 7- Effective quantum yield of PSII (ϕ PSII, a), non-photochemical quenching (NPQ, b), photochemical quenching (qP, c), photosystem II maximum efficiency (Fv/Fm, d), energy excess at the PSII level (EXC, e), and electron transport rate (ETR, f) of BRS Esmeralda (ES- without hatch) and BRS São Francisco (SF- with hatch) rice cultivars grown under absence (white bar) and presence (gray bar) of 80 mM NaCl for 6 and 12 days. The data represent the mean of five replicates. Statistical details same as in Fig. 6.

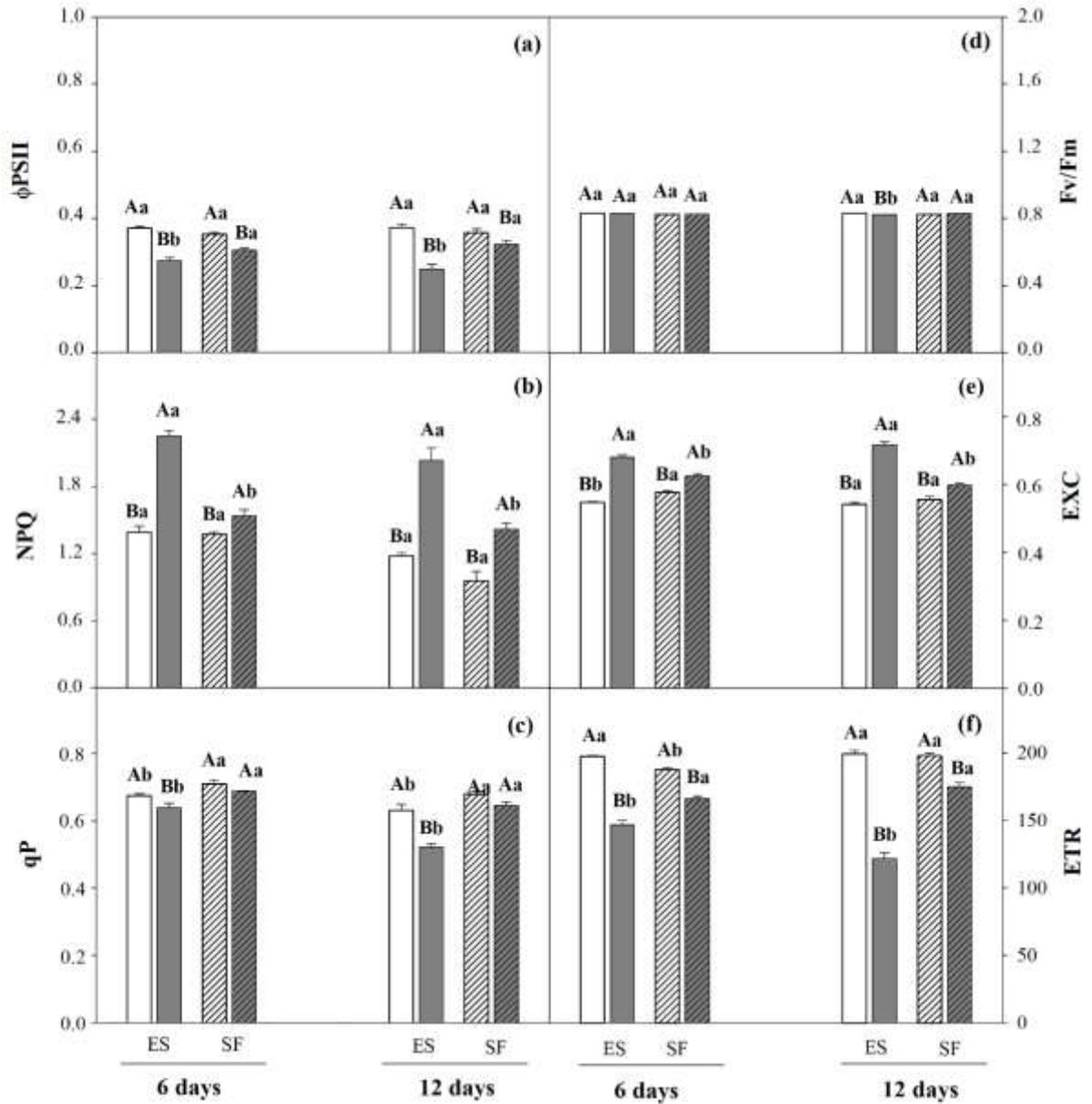


Table 2. Chlorophyll (Chl) *a*, *b* and *total*, and carotenoids content in BRS Esmeralda and BRS São Francisco rice cultivars grown under absence (Control) and presence of 80 mM NaCl (salt stress) for 6 or 12 days

Days of treatments	Cultivars	Concentration (mg g ⁻¹ DM)							
		Chl <i>a</i>		Chl <i>b</i>		Chl <i>total</i>		Carotenoids	
		Control	Salt stress	Control	Salt stress	Control	Salt stress	Control	Salt stress
6	BRS Esmeralda	14.30 Ba	16.53 Aa	4.62 Ba	5.55 Aa	19.32 Ba	22.19 Aa	12.99 Aa	6.18 Bb
	BRS São Francisco	10.86 Ab	11.55 Ab	3.38 Ab	3.41 Ab	14.38 Ab	15.09 Ab	12.35 Aa	10.08 Ba
12	BRS Esmeralda	13.46 Ab	12.99 Ab	4.65 Ab	4.80 Ab	18.28 Aa	17.83 Ab	65.18 Aa	60.53 Bb
	BRS São Francisco	14.35 Aa	14.27 Aa	5.29 Ba	6.43 Aa	19.69 Aa	20.82 Aa	66.21 Aa	66.56 Aa

On the same day, different capital letters denote significant changes due to salt stress and different lowercase letters represent significant changes due to rice cultivars according to F-test ($p \leq 0.05$). The data represent the mean of five replicates.

days of stress (52% reduction, in relation to control). When grown in salt stress condition, SF plants were 63 and 10% higher of carotenoids concentration than ES, at 6 and 12 days respectively.

In order to corroborate the results for the gas exchange and fluorescence parameters, changes in the ultrastructure of chloroplasts caused by salinity in rice leaves of the ES and SF cultivars by transmission electron microscopy (TEM) were evaluated (Fig. 8). There were salt stress-induced changes in the structure of chloroplasts and thylakoids. In general, salinity caused disorder in the lamellar system, with grana and lamellae becoming slightly swollen. There was also a reduction in thylakoid stacking, accumulation of starch grains and increased plastoglobules. These changes caused by salinity seem to have been more severe in ES plants, where it is possible to observe, especially at 12 days, the dissolution of grana and the disruption of the envelope.

6.3.3 Effects of salt stress in ionic homeostasis

Salinity significantly reduced the K^+ contents in leaves and roots of both cultivars at 6 and 12 days of salt stress (Fig. 9a, b). In general, the reductions caused by salt stress were less severe in SF plants. In ES cultivar, these reductions in K^+ content in leaves and roots were 40 and 13%, respectively, at 6 days, and 51 and 59%, respectively, at 12 days. While in SF cultivar, these reductions in leaves and roots were 14 and 31%, respectively, at 6 days, and 24 and 42% %, respectively, at 12 days. K^+ content in xylem sap was most reduced in ES by salinity, it was reduced by 54%, while in SF the reduction was only 22% at 6 days (Fig. 9c). At 12 days, the concentration of K^+ in ES was reduced by 26%, while in SF this concentration was not affected by salinity.

Also due to salt stress, more Na^+ were accumulated in the tissues and xylem sap (Fig. 9d-f). Nevertheless, the SF plants presented, in relation to control, smaller increases in Na^+ content in tissues or in the concentration of this ion in xylem sap than ES plants. In ES leaves, these increases were 512 and 537% at 6 and 12 days, respectively, while in SF leaves, they were 117 and 281% at 6 and 12 days, respectively (Fig. 9d). In ES roots, the salt stress increased Na^+ accumulation by 276 and 574% at 6 and 12 days, respectively, while in SF roots, they were 256 and 559% at 6 and 12 days, respectively (Fig. 9e). In xylem sap, the salinity proved increases most slight, they were 129 and 55% in ES at 6 and 12 days, respectively, while in SF xylem sap, they were 85 and 15%, respectively, on those same days and in relation to the controls (Fig. 9f).

Figure 8- Chloroplast ultrastructure of BRS Esmeralda (ES) and BRS São Francisco (SF) rice cultivars grown under absence (control) and presence of 80 mM NaCl (salt stress) for 6 and 12 days. **a – d** Note the disorder in the lamellar system of BRS Esmeralda rice cultivar plants when the control plants (**a, c**) are compared to the ones grown under salt stress (**b, d**). The disorder is most noticeable at day 12 (**d**) when thylakoid stacking clearly shows damage and plastoglobuli accumulation. **e – g** The same pattern of disorder in the lamellar system caused by the salinity is observed for the BRS São Francisco rice cultivar when the control plants (**e, g**) are compared to ones grown under salt stress (**f, h**). S, starch grain; arrow, grana; arrowhead, stroma thylakoid (stroma lamellae).

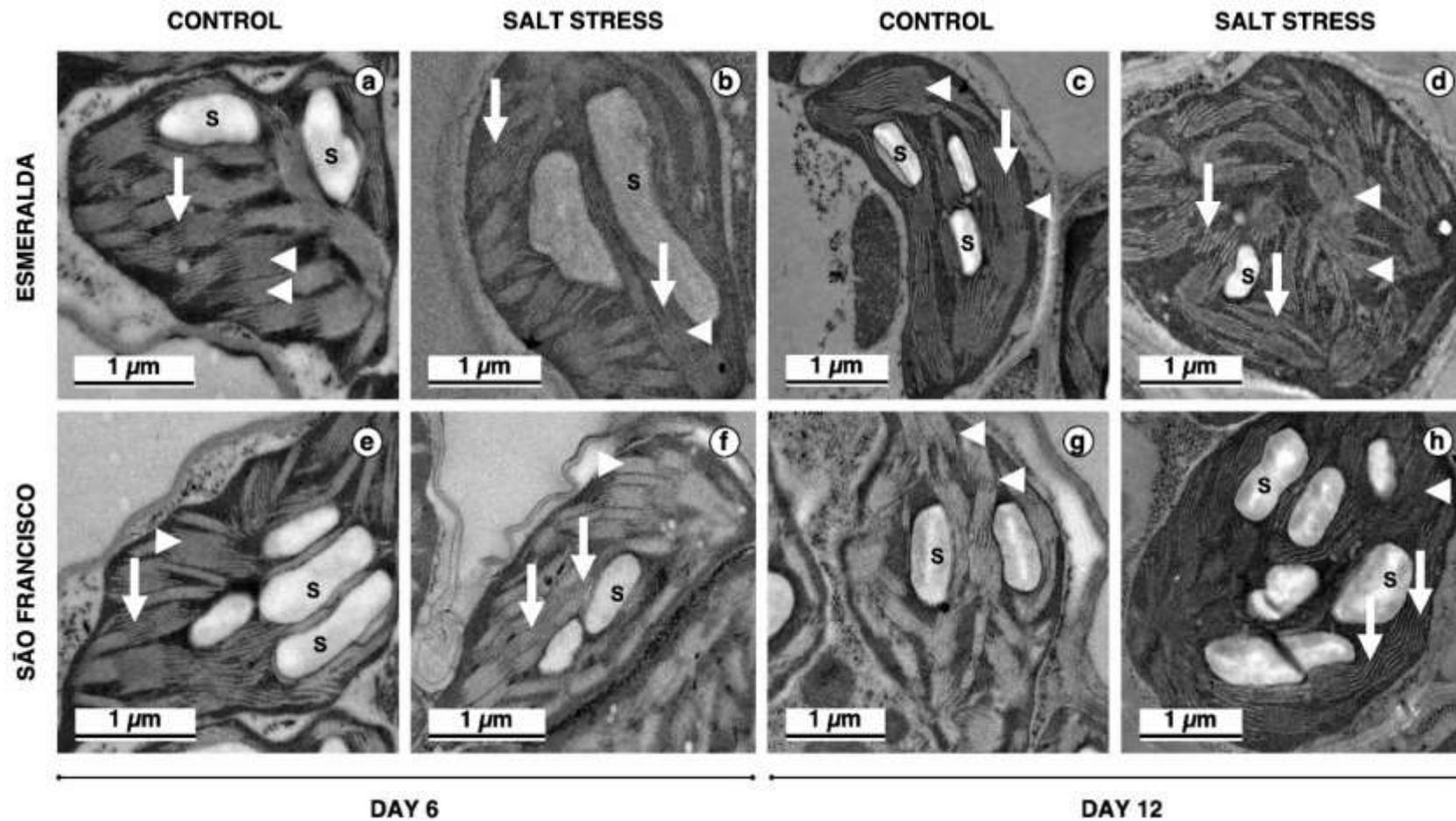
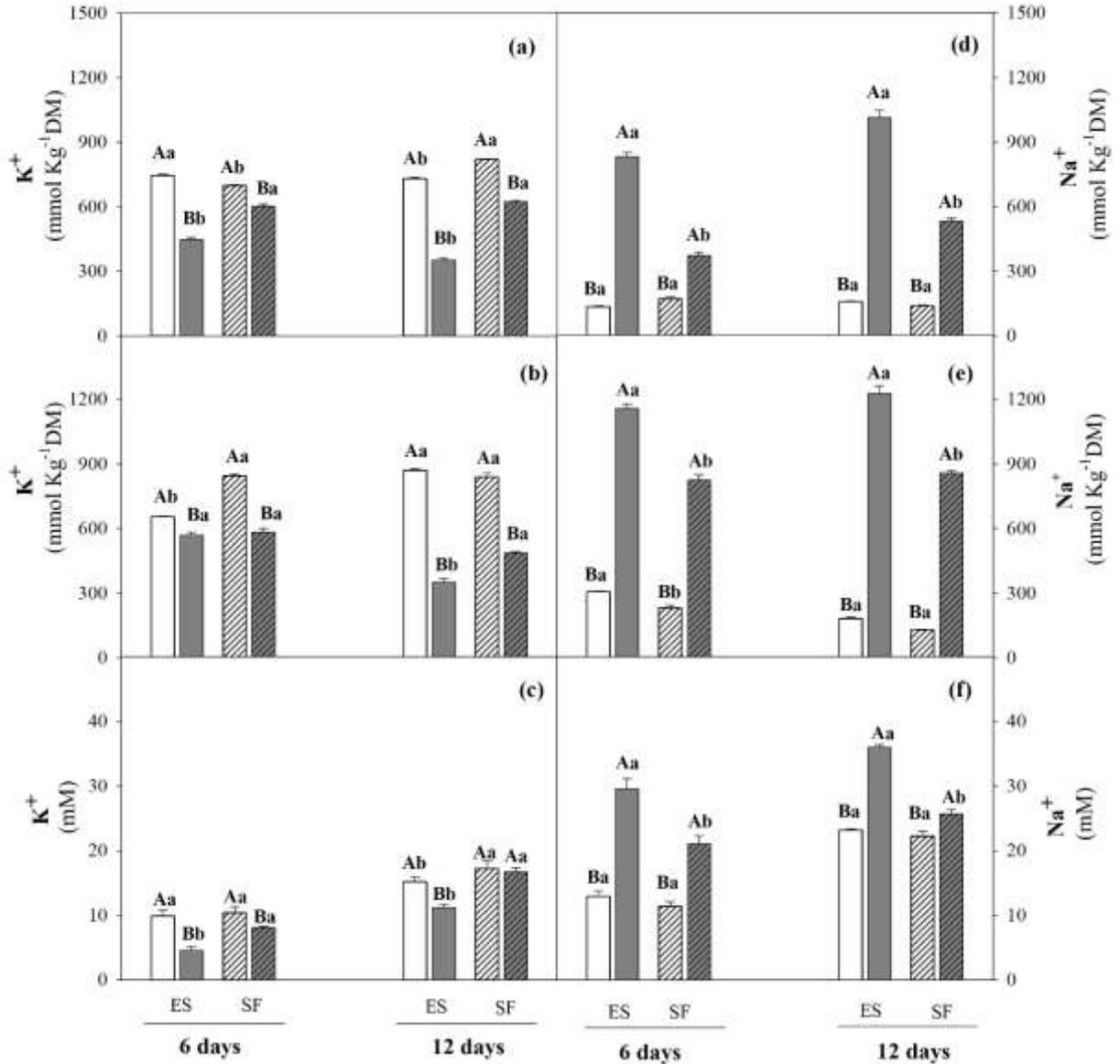


Figure 9- K^+ (a, b and c) and Na^+ (d, e and f) content in leaves (a and d), roots (b and e), and xylem sap (c and f) of BRS Esmeralda (ES - without hatch) and BRS São Francisco (SF - with hatch) rice cultivars grown under absence (white bar) and presence (gray bar) of 80 mM NaCl for 6 and 12 days. The data represent the mean of five replicates. Statistical details same as in Fig. 6.



For more information about the regulation of ionic homeostasis in cultivars with differential tolerance to salt stress, we investigated the accumulation of Na^+ in leaves by confocal microscopy, using a fluorescent Na^+ probe (Fig. 10). It was possible to notice that, in both days evaluated, the green coloration was relatively more intense in those plants influenced by the excess of salts than in those grown under control conditions. When comparing cultivars, SF cultivar seems to accumulate fewer Na^+ than ES cultivar, when both are under salt stress. Particularly, this distinction is notorious in the area of the vascular beam sheath and protoxylem.

To confirm the differential responses of the ES and SF cultivars in the accumulation of ions under salinity, the transcription level of nine genes (*OsSOS1*, *OsSOS2*, *OsSOS3*, *OsNHX1*, *OsNHX2*, *OsNHX3*, *OsNHX4*, *OsNHX5*, and *OsNHX6*) were studied, in which are related to the regulation of the Na⁺ transport and, consequently, with ionic homeostasis under salt stress (Fig. 11). In general, salinity induced the activation of the SOS pathway in rice plants. After 12, 24 and 48 h of the onset of salt stress, the relative expression of the *OsSOS1* and *OsSOS2* genes were markedly higher in SF cultivar, than ES cultivar (Fig. 11a, b). On average, the abundance of the *OsSOS1* gene in SF plants was 2.7 times higher than that of ES cultivar when both were grown in a saline environment, while that of the *OsSOS2* gene was 2.3 times higher. Differently, the relative expression of the *OsSOS3* gene was lower, or remained unchanged by salinity, except after 24 h of salt stress in SF plants, in which the gene abundance was 2 times greater than that of the control condition (Fig. 11c). Although changes in *OsSOS3* transcription levels were lower under salinity at all evaluated times, the expression of this gene was higher in SF plants compared to ES plants.

In this study, only the relative expression of the *OsNHX1*, *OsNHX2*, *OsNHX3*, and *OsNHX5* genes were presented (Fig. 11d-g), since *OsNHX4* and *OsNHX6* were not responsive to treatments (data not presented). In general, the expression of *OsNHX1* was little altered by treatments (Fig. 11d). One exception was the SF plants under salt stress, in which the abundance of *OsNHX1* was superior to the control plants or that of the ES plants under stress. Similarly, *OsNHX2* was overexpressed in SF plants after 24 and 48 h of the beginning of saline treatment (Fig. 11e). Its relative expression was, on average, 20 times higher than ES plants under the same conditions at 24 h. The transcription levels of *OsNHX3* and *OsNHX5* were dependent on time, cultivar and treatment (Fig. 11f, g). After 24 and 48 h of stress enforcement, the abundance of mRNA *OsNHX3* was 0,17 and 0,38 times higher in SF cultivar than in ES cultivar (Fig. 11f).

Figure 10- Cross-sections of the leaf blade taken halfway between the midrib and leaf margin of BRS Esmeralda (ES) and BRS São Francisco (SF) rice cultivars grown under absence (control) and presence of 80 mM NaCl (salt stress) for 6 and 12 days. **a, b** General anatomy of BRS Esmeralda cultivar's leaf blade as observed under the light microscope in an unstained section (**a**) and section stained with Astra blue and safranin (**b**). **c – j** Subcellular localization of sodium (Na^+) in both rice cultivars grown under absence (control) and presence of 80 mM NaCl (salt stress) for 6 and 12 days as observed under fluorescence microscopy. The samples were labeled with Asante NaTRIUM Green-2 AM. Green and blue fluorescence indicate the presence of Na^+ and cellulose, respectively. Bc, bulliform cell; Bs, bundle sheath cell; Ch, chlorenchyma; Epb, Epidermis on the abaxial side; Epd, Epidermis adaxial side; Mx, metaxylem; Ph, phloem; Px, protoxylem; Pxl, protoxylem lacunae; Sc, sclerenchyma. *Scale bars (a–j), 50 μm .*

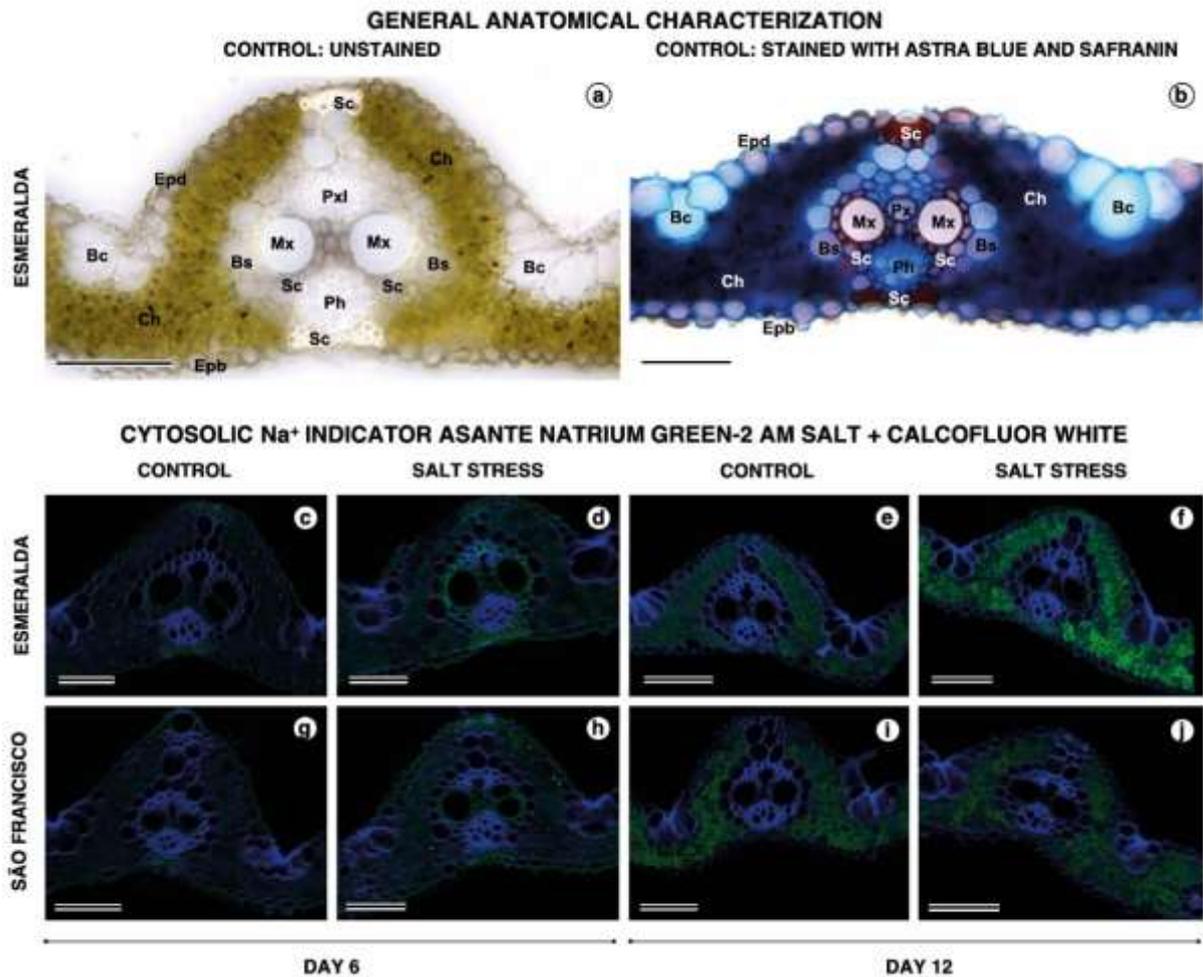
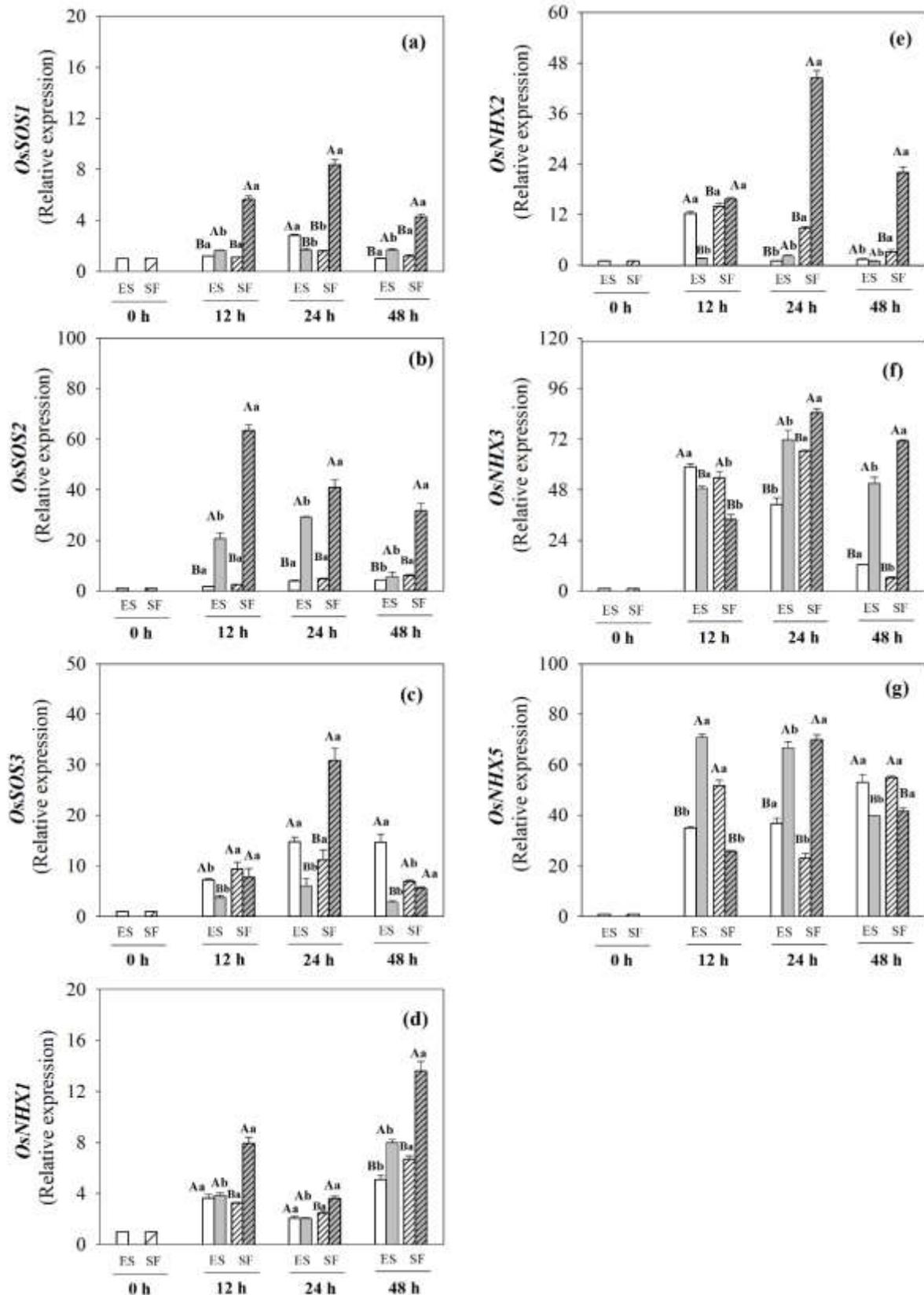


Figure 11- Relative gene expression profile of the *OsSOS1* (a), *OsSOS2* (b), *OsSOS3* (c) *OsNHX1* (d), *OsNHX2* (e), *OsNHX3* (f), and *OsNHX5* (g) genes in roots of BRS Esmeralda (ES- without hatch) and BRS São Francisco (SF- with hatch) rice cultivars grown under absence (white bar) and presence (gray bar) of 80 mM NaCl for 0, 12, 24 and 48 h. The data represent the mean of three replicates. Statistical details same as in Fig. 6.



6.4 Discussion

When plants are grown under salt stress conditions, they face severe changes in metabolism that impair their development. These disturbances culminate in considerable losses in productivity and can generate environmental and economic impacts, especially in major crops such as rice. However, some plant species have developed tolerance mechanisms for minimizing or avoid damage imposed by salinity (Gupta et al. 2018; Shahzad et al. 2019; Riaz et al. 2019). Thus, this study evaluated the differential tolerance of two rice cultivars to salt stress and provided evidence about some physiological, biochemical, and molecular mechanisms that are responsible for this phenomenon.

In this work, salinity promoted a restriction on the growth of rice plants (Table 1 and Fig. 5). Furthermore, the most severe reductions imposed by salt stress in the leaf area, dry mass, and phenotypic appearance of ES plants indicate that this cultivar is more sensitive to salinity than the SF cultivar. Many studies had already revealed that this complex environmental adversity inhibits the growth of rice plants (Fu et al. 2018; Chang et al. 2019; Gerona et al. 2019; Mirdar Mansuri et al. 2019; Tsai et al. 2019). These studies showed that different genotypes or varieties have contrasting tolerance to salt stress and that changes in plant productivity are due to adjustments in the main plant physiological processes, such as photosynthesis, protein synthesis, gene expression, ionic homeostasis, redox status, and metabolite levels, among others. However, the type of acclimatization response to salt stress depends on the species, cultivar and experimental conditions (Prisco et al. 2016).

For many plants, the main physiological process affected by Na^+ toxicity is photosynthesis. All participating components of the photosynthetic machinery, such as photosynthetic pigments, photosystems, electron transport systems, gas exchange processes, and enzymes involved in carbon metabolism, are potentially affected by salt stress. Therefore, mechanisms that relieve Na^+ toxicity in leaves and increase photosynthetic efficiency are essential for plant tolerance to salt stress (Ashraf and Harris 2013; Nowicka et al. 2018). In this study, salinity drastically reduced gas exchange, impairing A , g_s , E , and A/C_i of rice plants, especially in the ES cultivar (Fig. 6). In SF plants, the damage caused by salinity on the gas exchange was slight severe. These data are following the results obtained by Radanielson et al. (2018), in which the tolerant genotype required higher salinity levels than the sensitive genotype to reduce the net rates of photosynthesis and leaf transpiration by 50%. Our data suggest that in the SF cultivar, the process of fixing CO_2 was more effective, and thus more carbon was available to be invested in plant growth (Pan et al. 2016; Tang et al. 2018; Zhu et al. 2019), a

fact that is supported by the better growth and development of this cultivar under salt stress conditions.

The absence of difference in Fv/Fm in the plants of both cultivars in the presence and absence of salinity (Fig. 7) indicates that there was no photoinhibition (Mancarella et al. 2016). Salt stress, however, reduced the effective quantum efficiency of PSII (ϕ PSII), the photochemical extinction coefficient (qP), and electron transport rate (ETR) (Fig. 7). Such reductions were more pronounced in ES cultivar, which evidences an excess of reducing power, which is associated with lower energy capture efficiency in open PSII reaction, leading to inhibition of electron transport, and a large thermal dissipation, observed by increased of NPQ (Miranda et al. 2016; Nie et al. 2018; Du et al. 2019). SF plants presented less severe damage, suggesting a better photosynthetic adaptation to maintain the efficiency of PSII and the transport of electrons under salt stress, which led to a lower NPQ and EXC. Some previous studies had already found a similar result when comparing sensitive and tolerant salt-stress strains (Wang et al. 2017; Chutimanukul et al. 2018). In these studies, salinity tolerance is associated with greater ability to prevent damage caused by excess energy, as well as the maintenance of biochemical homeostasis in photosynthetic reactions, thus generating lower losses in biomass (Tsai et al. 2019).

One of the negative effects of salt stress involves inhibiting chlorophyll synthesis and promoted pigment degradation, compromising photosynthetic activity and consequently, plant growth and development (Qu et al. 2012; Nie et al. 2018). However, at 6 days of the saline treatment, there was an increase in Chl *a*, Chl *b* and Chl *total* in ES plants (Table 2), which may indicate an initial attempt to dispel excess excitation energy in photosystems (Goussi et al. 2018). But with the increase in the time of exposure to stress, this effect is reversed, and SF plants presented higher content of these pigments than ES cultivar under the same conditions. That is, SF plants presented a more efficient photoprotection mechanism against long-term salinity. The tolerance to salt stress of *Thellungiella salsuginea*, halophyte plant, also related to the more efficient use of excitation energy in relation to the duration of treatment (Goussi et al. 2019). On the other hand, carotenoids can act as accessory pigments, as well as they can prevent photooxidative damage to chlorophyll molecules (Kerbaui, 2004). Thus, SF cultivar plants minimized the damage caused by salinity in the content of carotenoids, especially at 6 days of salt stress (Table 2), indicating a photoprotective action to the photochemical apparatus, which reinforces its salt tolerance compared to ES cultivar.

Damage to leaf anatomy and the integrity of chloroplasts eventually impair or even prevent the photosynthetic process under salt stress conditions (Du et al. 2019). Salt-tolerant

plants, such as halophytes, maintain the structural integrity and arrangement of chloroplasts, which has significant importance for the conversion of luminous energy into chemical energy (Bejaoui et al. 2016). Some of the main damages caused to the chloroplast by salinity are the morphological deformations, with thylakoid swelling, envelope rupture, caused the appearance of some starch grains and some vesicles, probably originating from the dismantling of thylakoid, besides chloroplasts with a reduced number of the thylakoid (Goussi et al. 2018). These salt-induced changes in chloroplast structure are the main cause of the reduction in chlorophyll content, PSII efficiency, and changes in chlorophyll fluorescence (Islan et al. 2018). In our study, ES plants grown in a saline environment presented several of these deformations, while SF plants presented less obvious alterations, indicating reduced damage to chloroplasts (Fig. 8). This finding suggests that SF cultivar is more tolerant to salt stress than ES cultivar.

Understanding the mechanisms that contribute to the differential tolerance between ES and SF cultivars, we confront the behavior of these rice cultivars concerning ionic adjustment and photosynthetic efficiency, so that it links the contrasting responses with tolerance or susceptibility to salt stress. Regarding the maintenance of ionic homeostasis, salinity tolerant plants employ strategies to restrict the movement of cytotoxic Na^+ in growing and metabolically active plant organs, in addition to regulating ionic flow in order to maintain a high concentration of essential ions such as K^+ (Assaha et al. 2017; Chakraborty et al. 2019). Accordingly, in this study, SF plants under salt stress accumulated a lower Na^+ content and a higher K^+ content than the ES under the same conditions (Fig. 9). Besides, less Na^+ was accumulated in the leaves than roots, indicating that there was a mechanism for regulating the translocation of this toxic ion from the roots to the leaves, which was much more efficient in SF. This may be supported by changes in Na^+ and K^+ content in the cultivars xylem, where only the SF did not suffer an initial reduction (at 6 days) in the K^+ content and this cultivar had less xylem sodium than the ES cultivar, showing that Na^+ uptake is limited by SF roots. Other researchers had already found similar results working with rice cultivars/genotypes (Zhang et al. 2018; Gerona et al. 2019; Miranda et al. 2017; Liu et al. 2019). For example, in the Reziq cultivar, which is considered a salt-stress tolerant, the transport of Na^+ from the root to the aerial part was reduced, and it was due to a reduction in the capacity of Na^+ efflux in the root elongation zone through partial activation of *OsSOS1* (Liu et al. 2019). These findings suggest, therefore, that SF cultivar tolerance may be related to mechanisms of exclusion or restriction to Na^+ influx at the root and/or vacuolar compartmentalization (Zhang et al. 2018).

The fluorescence confocal microscopy technique was used to examine Na^+ dynamics in real-time tissues (Fig. 10), and thus support the results obtained earlier. In response

to salt stress, there was an increase in the intensity of the Na⁺ fluorescence signal in the leaves, especially in ES plants, which reinforces the largest accumulation of this cytotoxic ion (Fig. 9d) and its relationship with salinity sensitivity. In fact, high-intensity fluorescence points in the leaf sections have been reported as a marker of Na⁺ in *Pongamia pinnata* under salt stress (Marriboina et al. 2017). Also in a salt-sensitive wheat cultivar, there was an increase in the intensity of Na⁺ fluorescence in the cell cytosol, while fluorescence was lower in the cytosol and higher in the cell vacuole in salt-tolerant cultivar, indicating a correlation between vacuolar sequestration of Na⁺ and salinity tolerance (Cuin et al. 2011).

Other studies also propose that the activation of the gene expression of SOS and NHX is closely associated with salt stress tolerance in several species, such as sorgho (Miranda et al. 2017; Kandula et al. 2019), maize (Huang et al. 2018), barley (Fu et al. 2018), tomato (Baghour et al. 2019), and in rice itself (Bertazzini et al. 2018). In our study, in general, the *OsSOS1*, *OsSOS2*, and *OsSOS3* genes were overexpressed in both cultivars from the onset of salt stress (Fig. 11a-c). However, in SF plants, the abundance of these transcripts was considerably higher, supporting that this cultivar has an efficient mechanism of exclusion of Na⁺, which contributes to minimize the damage caused by this ion in growth and efficiency photosynthetic, culminating in increased tolerance to salinity (Miranda et al. 2017; Zhang et al. 2018; Baghour et al. 2019).

A total of six members of the *OsNHX* family have been identified in the rice genome (Zhang et al. 2018; Fu et al. 2018), but in the cultivars and experimental conditions analyzed, only *OsNHX1*, *OsNHX2*, *OsNHX3*, and *OsNHX5* were responsive. *NHX4* proteins are in tonoplast, while *NHX5* and *NHX6* are on the endosomal membrane (Bassil et al. 2011), indicating a mechanism of Na⁺ compartmentalization in the vacuole and cell endosomes, thus avoiding its toxic effect on cytosolic reactions (Kandula et al. 2019). The abundance of transcripts of *OsNHX1* and *OsNHX2* was increased more in SF than in ES under salt stress (Fig. 11d-g). Similarly, expression peaks of *OsNHX3* occurred 24 and 48 h after the onset of salt stress in this same cultivar. Despite the gene expression stimulation of *OsNHX5*, this seems not to be involved with differential tolerance to salinity in the ES and SF cultivars. Our findings suggest that there was compartmentalization of Na⁺ in the vacuoles, contributing to the maintenance of a high K⁺/Na⁺ ratio in the cytosol, thus to the tolerance to saline stress in SF cultivar (Whang et al. 2019). In agreement, other authors also showed that transgenic plants overexpressing *NHX* family members presented beneficial physiological changes, such as maintenance of redox homeostasis, increased chlorophyll and proline contents, which

contribute to an increased tolerance to salt stress compared to wild plants (Huang et al. 2018; Baghour et al. 2019; Muske et al. 2019).

The data presented here report that ES plants suffered the greatest damage promoted by salt stress, and thus can be classified as sensitive to salinity. The most tolerant cultivar (SF) modulates an integrated network of responses to NaCl stress, which prevents the harmful effects of salinity in growth, in ionic homeostasis, and in photosynthetic capacity.

6.5 Conclusion

The differential tolerance to salt stress was confirmed for ES and SF rice cultivars. The tolerance to salt stress was related to mechanisms ionic homeostasis and photosynthetic efficiency maintenance. The salt-tolerant cultivar (BRS São Francisco) has more efficient transcriptional and functional regulatory mechanisms than the salt-sensitive cultivar (BRS Esmeralda) so that they minimize the toxicity of Na⁺ in the cytosol, the deleterious effects in the gas exchanges, energy capture, electron transport and integrity of chloroplasts. These adjustments allowed SF cultivar to grow better in saline environments than the ES cultivar, reducing the yield losses imposed by this salt stress.

6.6 Author contribution statement

CGG planned, designed and conducted the experiment, performed the biochemical and molecular analysis and wrote the manuscript. IACC helped with confocal analysis and writing the manuscript. SKPP and ECM helped with MET assays and writing the manuscript. HHC co-supervised the research. LSL contributed to the revision and writing of the manuscript. EGF supervised the research and prepared the manuscript for submission. All the authors read and approved the final manuscript.

6.7 Acknowledgments

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal / CNPq, Brazil), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), and Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISANO/Pró-Equipamentos CAPES. We thank also

Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) to provide rice seeds. Fellowship granted by CNPq to EGF and CAPES to CGG are gratefully acknowledged.

6.8 Compliance with ethical standards

The authors declare that they have no conflict of interest.

7 TOLERÂNCIA DIFERENCIAL AO ESTRESSE SALINO EM DUAS CULTIVARES DE ARROZ: ASPECTOS IÔNICOS, OSMÓTICOS E OXIDATIVOS

(Artigo a ser submetido)

Cibelle Gomes Gadelha¹, Enéas Gomes Filho^{1*}

Affiliations:

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail addresses: cibellegadelha@outlook.com.br (CGG)

* Corresponding author: E. Gomes-Filho; Tel.: +55 85 3366 9405; E-mail address: egomesf@ufc.br

Resumo

O arroz (*Oryza sativa*) é uma gramínea pertencente à família Poaceae que se destaca por ser alimento básico de bilhões de pessoas. Por conta do crescimento da população mundial e da demanda por alimentos, qualquer cenário que cause perda de produtividade dessa cultura, gera impactos econômicos graves. O estresse salino, por sua vez, perturba o metabolismo normal das plantas, prejudicando vários dos seus processos fisiológicos, limitando o seu crescimento. A produção agrícola de arroz é considerada sensível ao estresse salino, porém a extensão dessa sensibilidade é genótipo-dependente. Tendo em vista isso, esse trabalho teve por objetivo identificar e comparar os mecanismos iônicos, osmóticos e oxidativos envolvidos na tolerância e na susceptibilidade de duas cultivares de arroz submetidas ao estresse salino. Para isso, as cultivares BRS Esmeralda (sensível à salinidade) e BRS São Francisco (tolerante à salinidade) foram usadas como modelo experimental. O excesso de sais promoveu o aumento dos teores de Cl⁻, H₂O₂ e de TBRAS, contudo, na cultivar BRS São Francisco esses incrementos foram em parte atenuados, sugerindo que a cultivar tolerante possui mecanismos de aclimação ao estresse salino que envolvem os ajustamentos iônico e redox. A síntese de solutos compatíveis

(Carboidratos, N-aminossolúveis e proteínas), a atividades das enzimas antioxidativas e o conteúdo de ascorbato e glutatona foram dependentes do tempo de exposição ao sal, do órgão e da cultivar. Apenas o aumento nos teores de proteínas totais e da atividade da APX (em raízes) parecem ter sido mecanismos aclimatação ao excesso de sais utilizados pela cultivar São Francisco. As respostas da cultivar BRS Esmeralda foram inconsistentes o que permitiu que essas sofressem invariavelmente mais danos. A tolerância e susceptibilidade ao estresse salino envolve alterações multifatoriais que, nas cultivares estudadas, parecem estar mais relacionadas com a manutenção da homeostase iônica e parcialmente à oxidativa e osmótica

Palavras-chave: Salinidade. Homeostase iônica. Enzimas antioxidantes. Solutos compatíveis. Aclimatação.

7.1 Introdução

O rápido crescimento da população mundial tem exigido cada vez mais da produção de gêneros alimentícios. O arroz (*Oryza sativa*) se destaca entre as culturas alimentares, por fazer parte da dieta de mais da metade da população mundial (SINGH et al., 2019). É nutricionalmente rico em fibras, minerais e vitaminas, fornecendo 21 % da energia total e 15 % de proteína per capita (GUPTA et al., 2018). Apesar de ser o terceiro cereal mais produzido do mundo, com rendimento médio em 2017 de 46019 quilogramas por hectare (FAO, 2019), seu cultivo é restringido por inúmeros fatores.

Os estresses ambientais afetam a produção agrícola por alterarem as condições ótimas de desenvolvimento das espécies vegetais, e reduzindo, assim, sua possibilidade de sobrevivência (TAIZ; ZEIGER, 2013; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015). Dentre os estresses abióticos, o salino é um dos mais relevantes, especialmente em áreas áridas e semi-áridas (CEITA et al., 2017). Essa condição é definida pelo acúmulo excessivo de sais solúveis no solo ou na água de irrigação, que perturbam o metabolismo normal das plantas e geram perdas na produtividade das culturas (RIAZ et al., 2019)

O estresse salino é resultado de uma combinação entre os efeitos osmóticos, iônicos e oxidativos dos sais, que interferem em várias funções fisiológicas das plantas tais como: o equilíbrio hídrico e nutricional, a fotossíntese, a atividade enzimática, a síntese proteica, a expressão gênica, dentre outros (HASEGAWA, 2013; ACOSTA-MOTOS et al., 2017). Porém, o grau de severidade com que esse estresse atinge as plantas dependem da espécie, do genótipo,

da idade, do tipo de sal, do tempo de exposição, dentre outros (PRISCO; GOMES-FILHO; MIRANDA, 2016).

As plantas de arroz são altamente sensíveis à salinidade, entretanto um grande número de variedades tolerantes à salinidade tem sido reconhecido. Estas últimas desenvolveram mecanismos bioquímicos e moleculares complexos e altamente específicos que as permitem crescer, mesmo sob estresse salino (GUPTA et al., 2018; HERNÁNDEZ et al., 2019; RIAZ et al., 2019). Essas respostas envolvem, principalmente, a manutenção da homeostase celular, através dos ajustamentos iônico, osmótico e oxidativo (CHANG et al., 2019; GERONA et al., 2019; LIU et al., 2019; TSAI et al., 2019).

O ajustamento osmótico ocorre através da absorção de íons ou síntese de solutos orgânicos, como: açúcares, polióis, aminoácidos, proteínas, que ao se acumularem no citosol, tornam o potencial hídrico das raízes menor que o do solo, mantendo o teor relativo de água nos tecidos, e assim, evitando danos às trocas gasosas e ao alongamento celular (XU et al., 2016; FAN et al., 2016). As plantas tolerantes também regulam o fluxo iônico, e são capazes de manter baixa a concentração de íons tóxicos, como o Na^+ , e alta a concentração de íons essenciais, como o K^+ . Esse ajustamento iônico ocorre através da ativação de canais ou transportadores de membrana que catalisam a exclusão, a compartimentalização de íons Na^+ ou o controle do carregamento do xilema (LIU et al., 2019).

Já o ajustamento redox, diz respeito a coordenação entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de H_2O_2 , e a eliminação ativa dessas substâncias, conferindo proteção oxidativa às células. Os mecanismos de eliminação de EROs podem ser de natureza enzimática, como a a dismutase do superóxido (SOD), a catalase (CAT), a peroxidase do guaiacol (GPX), a peroxidase do ascorbato (APX) e a redutase da glutathione (GR), ou não enzimática, formado por antioxidantes de baixo peso molecular, tais como ascorbato, tocoferol e glutathione (KIBRIA et al., 2017; GERONA et al., 2019).

A elucidação dos mecanismos que conferem tolerância ao estresse salino é fundamental para auxiliar os melhoristas no desenvolvimento de cultivares de arroz que mantenham sua produtividade sob essas condições e, assim atendam a crescente demanda global por alimentos. Tendo em vista isso, pretende-se investigar as respostas diferenciais utilizadas por duas cultivares de arroz, BRS Esmeralda e BRS São Francisco, a fim de elucidar o papel dos ajustamentos iônico, osmótico e redox na tolerância versus sensibilidade dessas plantas sob condições salinas.

7.2 Material e métodos

7.2.1 *Material vegetal e condições de cultivo*

Nesse experimento, utilizou-se apenas as duas cultivares de arroz que foram mais contrastantes de acordo com os resultados do experimento I. O experimento foi novamente conduzido em casa de vegetação e todas as análises fisiológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

As sementes das cultivares BRS Esmeralda (ES) e BRS São Francisco (SF) foram inicialmente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1,0 % por 10 minutos e, em seguida, lavadas com água destilada. Então, foram postas para germinar em copos descartáveis contendo vermiculita umedecida. Após sete dias, plântulas de tamanho uniforme foram transferidas para bacias contendo 10,0 L de solução nutritiva de Clark (1975) completa, pH 6,0. Após sete dias de aclimatação, as plantas foram novamente selecionadas pela uniformidade e transferidas para baldes de 3 L (uma planta/balde), iniciando, assim, o tratamento salino, o qual foi imposto pela adição de NaCl a 80 mM de forma parcelada (40 mM por dia).

O pH da solução foi monitorado diariamente, e ajustado para 6,0, quando necessário. Além disso, as soluções nutritivas foram renovadas a cada três dias para evitar deficiência nutricional. As coletas foram realizadas após 6 e 12 dias da imposição dos tratamentos salinos com NaCl a 80 mM. Nesse momento, dez plantas (duas de cada repetição) foram separadas em folhas e raízes, uma parte foi congelada em nitrogênio líquido e posteriormente guardada em ultrafreezer a -80 °C, a fim de serem utilizadas nas análises bioquímicas, enquanto outra foi seca em liofilizador para a determinação dos teores de cloreto (Cl⁻) e solutos orgânicos.

7.2.2 *Preparação de extratos*

Nesse estudo foram preparados extratos específicos para cada tipo de análise. Para a determinação de Cl⁻ utilizou-se o extrato aquoso, no qual 50 mg de pó liofilizado de folhas e raízes foram homogeneizados com 5 mL de água desionizada, em tubos de ensaio, sendo estes mantidos aquecidos, centrifugados e por fim, filtrados, como já descrito no experimento I.

Para a quantificação dos solutos orgânicos (Carboidratos, N-aminossolúveis e Proteínas), 15 mg de pó liofilizado de folhas e raízes foram homogeneizados em 5 mL de etanol

a 80 %. O homogenato foi mantido em banho-maria por 1 h e após isso centrifugado a 3.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o processo foi repetido por mais duas vezes. Ao final, todos os sobrenadantes foram reunidos e o volume ajustado para 10 mL com o mesmo etanol a 80 %.

Já o extrato para estimativa da peroxidação lipídica, dos teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e do conteúdo de ascorbato e glutatona foi obtido pela maceração de 0,3 g de folhas e raízes frescos com 3,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Logo após isso, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, por 20 min, a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado nas análises no mesmo dia em que foi extraído.

Por fim, os extratos das enzimas SOD, CAT, APX, GPX e GR e de proteínas totais, foram preparados a partir de 150 mg de folhas e raízes, ambos frescos, os quais foram homogeneizados com 4,0 mL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM. Para a determinação da atividade da peroxidase do ascorbato, ao tampão fosfato de extração foi adicionado ascorbato para resultar numa concentração final de 2 mM (NAKANO; ASADA, 1981). Em seguida, o macerado foi centrifugado a 12.000 x g, durante 15 min. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4 °C, sendo os extratos armazenados em freezer a -25 °C até o momento das análises.

7.2.3 Determinação dos teores de Cl⁻

Os teores de Cl⁻ foram estimados de acordo com Gaines et al. (1984). A 1,0 mL do extrato aquoso, convenientemente diluído, adicionaram-se 167 µL da mistura da reação, formada por tiocianato de mercúrio [Hg(SCN)₂] a 13,2 mM em metanol a 100% e nitrato férrico [Fe(NO₃)₃] a 20,2% (p/v) em água deionizada, na proporção 4:1, respectivamente. A solução foi então agitada e permaneceu em repouso por 15 min. Os teores de Cl⁻ foram quantificados pelas leituras de absorbância em 460 nm.

7.2.4 Determinação dos teores de carboidratos solúveis, redutores e não-redutores

O conteúdo de carboidratos solúveis totais foi determinado de acordo com o descrito por Dubois et al. (1956). Foram adicionados 0,2 mL de fenol 5 % e 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado a 0,2 mL de extrato etanólico. Em seguida, essa mistura foi agitada e deixada em repouso por 10 min. A quantificação foi possível através de leituras

espectrofotométricas em 490 nm e baseada na curva padrão que utilizou concentrações crescentes de D(+) glicose anidra.

Os carboidratos redutores, por sua vez, foram determinados conforme Hodge e Hofreiter (1962). Inicialmente foram preparadas três soluções. A primeira continha carbonato de sódio anidro, tartarato de sódio e potássio, bicarbonato de sódio e de sulfato de sódio anidro (Nelson A). A segunda continha sulfato de cobre, H₂O e ácido sulfúrico concentrado (Nelson B). E, a terceira era uma solução de molibdato de amônio e arsenito de sódio, dissolvidos em água e ácido sulfúrico concentrado (Solução Arsenitomolibídica). A 0,5 mL de extrato etanólico foram adicionados 0,5 mL do reativo Nelson AB (4 Nelson A:1 Nelson B). Em seguida, os tubos foram fechados e a mistura foi aquecida a 100 °C por 20 min. Passado esse tempo, a reação foi cessada por banho de gelo. Foram, então, adicionados 0,5 mL de solução arsenitomolibídica e os tubos agitados vigorosamente. As amostras foram diluídas com 3,5 mL de água desionizada e quantificadas em 540 nm. Novamente, a quantificação foi baseada na curva padrão de concentrações crescentes de D(+) glicose anidra.

Os carboidratos não-redutores foram determinados pela diferença entre os solúveis totais e os redutores.

7.2.5 Determinação dos teores de N-aminossolúveis

As quantidades de N-aminossolúveis foram estabelecidas conforme Yemm e Cocking (1955). Em tubos de ensaio foram misturados: 0,5 mL do extrato etanólico com 250 µL do tampão citrato 0,2 M, 500 µL do KCN 0,2 mM e 100 µL de ninhidrina 5%. Os tubos foram aquecidos por 20 min a 100 °C. Passado esse tempo, a reação foi interrompida por banho de gelo e, em seguida, foram adicionados 0,65 mL de etanol a 60 %. Após isso, prosseguiu-se com as leituras espectrofotométricas em 570 nm. A quantificação foi firmada por curva padrão de concentrações crescentes de glicina.

7.2.6 Concentração de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis foi determinada utilizando o “reagente de Bradford” [composto por azul de coomassie brilhante G-250 0,01%, etanol a 4,75% e ácido fosfórico (H₃PO₄) a 8,5%] (BRADFORD, 1976). A reação consistiu na adição de 1,0 mL desse reagente à 100 µL do extrato convenientemente diluído. A mistura foi deixada em repouso por

15 min, sendo então submetidas à leitura de absorvância em 595 nm. Como padrão, foi utilizada a albumina de soro bovina.

7.2.7 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica foi determinada através da quantificação dos teores de TBARS, conforme Heath e Packer (1968). Para isso, 500 µL de extrato, convenientemente diluído, foram postos para reagir com 500 µL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5%, preparado em ácido tricloroacético (TCA) a 20%. Essa mistura foi aquecida por 30 min, a 95 °C, sendo a reação interrompida por seu resfriamento em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g, durante 10 min. As leituras espectrofotométricas do sobrenadante foram realizadas em 532 e 600 nm. Esses teores foram estimados através da subtração entre as leituras de absorvância específica (532 nm) e não-específica (600 nm) e utilizando o coeficiente de extinção molar do TBARS ($\epsilon = 0,155 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em nmol de TBARS g⁻¹ de matéria fresca (MF).

7.2.8 Determinação dos teores de peróxido de hidrogênio

Os teores de H₂O₂ foram determinados como descrito por Sergiev et al. (1997). A 0,25 mL de extrato ácido, convenientemente diluído, foram adicionados 0,25 mL de tampão fosfato de potássio a 10 mM, pH 7,0; e 0,5 mL de iodeto de potássio (KI) a 1M. As amostras foram, então, agitadas e mantidas no escuro por 60 min. A quantificação foi feita a partir de curva padrão com concentrações conhecidas de H₂O₂ e através de medidas de absorvância a 390 nm.

7.2.9 Determinação da atividade das enzimas antioxidativas

7.2.9.1 Dismutase do superóxido

A atividade da dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) foi mensurada de acordo com o método de Beauchamp e Fridovich (1971), que se baseia na fotorredução do azul de *p*-nitrotetrazólio (NBT) através da produção de azul de formazana, com leituras de absorvância em 560 nm. Nesta reação, definiu-se uma unidade de atividade enzimática (UA) como sendo a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT no

intervalo de tempo de 15 min. A mistura de reação continha metionina a 13 mM, NBT a 75 μM , EDTA a 100 mM e riboflavina a 2 μM , todos dissolvidos em tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8. A 1.450 μL dessa solução foram adicionados 50 μL do extrato convenientemente diluído. A reação foi conduzida a 25 °C em uma câmara de reação revestida internamente com papel alumínio e iluminada com duas lâmpadas fluorescentes de 20 W, por 15 min (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Os extratos foram dosados em duplicata, sendo os resultados expressos em UA mg^{-1} proteína.

7.2.9.2 *Peroxidase do Ascorbato*

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.1) foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), por meio do acompanhamento do decaimento da absorvância em 290 nm devido à oxidação do ascorbato. A mistura de reação foi constituída por 50 μL de ascorbato a 15 mM, 50 μL de H_2O_2 a 30 mM e 1.390 μL de tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 6,0. A essa mistura, foram adicionados 10 μL do extrato enzimático convenientemente diluído. Os extratos foram dosados em duplicata, sendo os resultados expressos em $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$. Para os cálculos, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do ascorbato ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e a estequiometria da reação (dois moles de ascorbato para um mol de H_2O_2).

7.2.9.3 *Catalase*

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com Havir e McHale (1987), através do decaimento da absorvância em 240 nm, devido ao consumo de H_2O_2 . O meio de reação foi composto por 1.250 μL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM, acrescido de 100 μL de H_2O_2 a 0,5 M e 150 μL do extrato convenientemente diluído. Os extratos foram dosados em duplicata, e os resultados expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$. Para os cálculos da atividade enzimática, foi usado o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

7.2.9.4 *Peroxidase do Guaiacol*

A atividade da peroxidase do guaiacol (GPOD, EC 1.11.1.7) foi determinada pelo método de Kar e Mishra (1976) mediante o acompanhamento do aumento da absorvância em

420 nm devido à formação do tetraguaiacol. O meio de reação foi composto por 50 μL de extrato convenientemente diluído, 950 μL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, 500 μL de guaiacol a 0,02 M e 500 μL de H_2O_2 a 60 mM. Os extratos foram dosados em duplicata, e os resultados expressos em $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$, usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ($\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e a estequiometria da reação (cada mol de tetraguaiacol envolve o consumo de quatro moles de H_2O_2).

7.2.9.5 Redutase da Glutathione

A atividade da redutase da glutathione (GR, EC 1.6.4.2) foi determinada conforme metodologia descrita por Foyer e Halliwell (1976), com algumas modificações. A mistura de reação (volume final de 1,0 mL) consistiu em tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,8; EDTA a 0,1 mM; NADPH a 0,05 mM, GSSG a 3,0 mM e 50 μL de extrato enzimático convenientemente diluído. A reação foi iniciada pela adição de NADPH ao meio de reação e acompanhada pelo decaimento da absorbância em 340 nm em espectrofotômetro. Os extratos foram dosados em duplicata e a atividade da GR foi estimada utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo expressa em $\text{nmol NADPH mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$.

7.2.10 Determinação dos teores de ascorbato e glutathione

Os teores de ascorbato reduzido (AsA) e ascorbato total [AsA + DHA] foram determinados de acordo com Law, Charles e Halliwell (1983). Essas análises foram estimadas através da redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} pelo ascorbato, em meio ácido, e da consequente formação de um complexo entre o Fe^{2+} e o bipyridil, resultando em uma coloração rósea, que absorve luz no comprimento de 525 nm.

Para a determinação do AsA, o meio de reação foi composto de 200 μL do extrato; 200 μL de tampão fosfato de potássio a 150 mM, pH 7,4; 200 μL de água destilada; 400 μL de TCA a 10%; 400 μL de H_3PO_4 a 44%; 400 μL de bipyridil a 4%, dissolvido em etanol a 70%, e 200 μL de FeCl_3 a 3%. Após uma rápida agitação, os tubos de ensaio contendo a mistura de reação foram incubados em banho-maria a 42 °C, por 40 min. Passado esse tempo, a reação foi interrompida por resfriamento das amostras em banho de gelo.

O ascorbato total foi determinado após a redução do DHA pelo ditioneitol (DTT), seguindo o mesmo procedimento para determinação do AsA. O meio de reação continha 200

μL de extrato, 200 μL de tampão fosfato de potássio a 150 mM, pH 7,4, 100 μL de DTT a 10 mM mantidos, inicialmente, em banho-maria a 42 °C por 15 min. Em seguida, adicionaram-se 100 μL de N-etilmaleiamida (NEM) a 90,5% e aguardou-se o tempo de 2 min para então acrescentar os demais reagentes: 400 μL de TCA a 10%, 400 μL de H_2PO_4 a 44%, 400 μL de bipyridil a 4%, em etanol a 70% e 200 μL de FeCl_3 a 3%. A cada novo componente adicionado houve uma agitação vigorosa. Após a adição de todos os integrantes da mistura, os tubos de ensaio foram incubados em banho-maria a 42 °C, por 40 min, os quais tiveram sua reação interrompida, posteriormente, por resfriamento em banho de gelo.

Nas duas determinações, teve-se como padrão uma curva obtida a partir de soluções com concentrações crescentes de ácido ascórbico (LAW; CHARLES; HALLIWEL, 1983). O DHA foi determinado através da subtração dos valores do ascorbato total e AsA. Os extratos foram dosados em duplicata e os dados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

Os teores de GSH e glutatona total [GSH + GSSG] foram determinados como descrito por Griffith (1980). Para estimar o conteúdo de GSH, 100 μL de extrato, 1.300 μL de tampão fosfato de sódio a 150 mM, pH 7,4, inicialmente incubados a 30 °C, por 15 min, foram postos para reagir com 100 μL de 5,5 ditio-bis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) a 6 mM. A mistura final foi agitada e mantida em banho-maria a 30 °C por 15 min. Passado esse tempo, a reação foi interrompida por resfriamento em banho de gelo. O teor de GSH foi estimado através de leituras de absorbância em 412 nm e usando o coeficiente de extinção molar do ácido nitrobenzóico produzido na reação ($\epsilon = 14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

Para estimar o conteúdo de glutatona total, a GSSG foi reduzida a GSH pela ação da enzima GR. Tal reação era constituída por 100 μL de extrato, 300 μL de tampão fosfato de sódio a 150 mM, pH 7,4, 500 μL de uma unidade da enzima GR (estoque: 3 mg mL^{-1} e 147 U mL^{-1}), 500 μL de NADPH a 0,3 mM e 100 μL DTNB a 6 mM, ambos dissolvidos em tampão. Os tubos de ensaio, contendo a mistura de reação, foram agitados e deixados em banho-maria a 30 °C, por 15 min, os quais tiveram sua reação interrompida por resfriamento em banho de gelo. O teor de glutatona total foi estimado como descrito anteriormente para a GSH.

A GSSG foi determinada através da subtração dos valores de glutatona total e GSH. Os extratos foram dosados em duplicata e os dados foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

7.2.11 Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×2 , onde o primeiro fator corresponde aos dois cultivares (ES e SF) e o segundo fator aos dois tratamentos salinos (ausência e presença de 80 mM NaCl). Cada tratamento foi composto por cinco repetições, sendo a unidade experimental composta por duas plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativo a $p \leq 0,05$, as médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sisvar.

7.3 Resultados e discussões

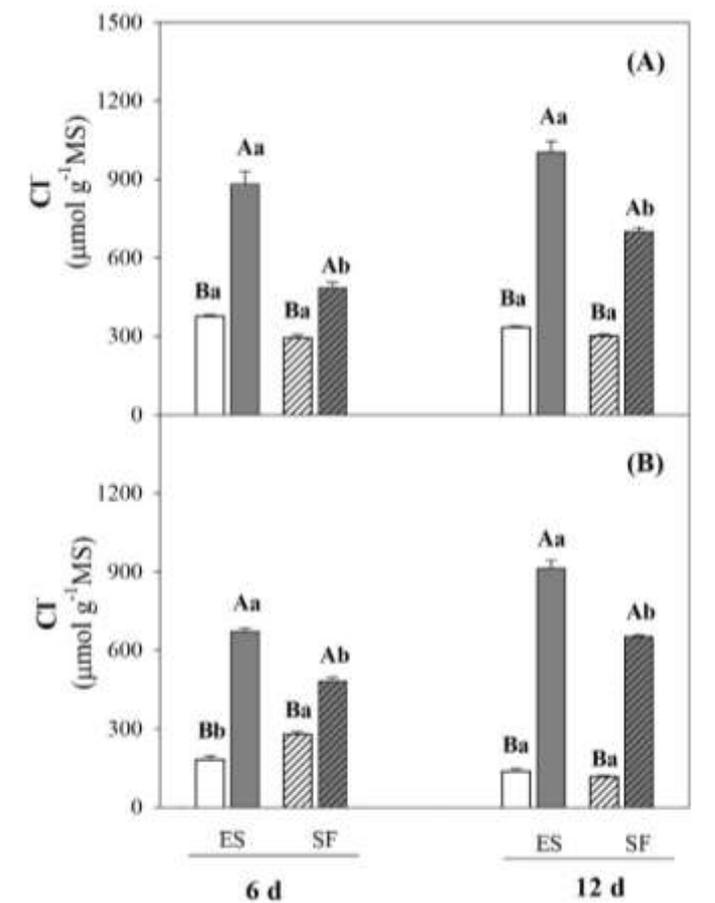
Após a análise dos dados obtidos no experimento I, escolheram-se as cultivares SF (tolerante) e ES (sensível) para a condução do experimento II. O objetivo desse experimento foi identificar os mecanismos de aclimação ao estresse salino em plantas SF e comparar com as respostas contrastantes de ES, fazendo uma grande investigação sobre os principais aspectos relacionados à tolerância à salinidade nessas plantas.

De modo geral, na condição controle, os teores de Cl^- não foram alterados em virtude da cultivar, tanto em folhas quanto em raízes (Figura 12), diferentemente do que ocorreu em condições de estresse salino, em que eles aumentaram. Na cultivar sensível (ES), os teores de Cl^- em plantas sob estresse foram 1,3 e 2,0 vezes superiores aqueles das condições controle, em folhas, e 2,6 e 5,5 vezes, em raízes, aos 6 e 12 dias, respectivamente. Já na cultivar tolerante (SF) esses aumentos foram em parte atenuados, sendo de 0,6 e 1,3 vezes, em folhas, e de 0,7 e 4,6 vezes, em raízes. Sob estresse, plantas SF acumularam, em média, 36 % menos Cl^- em folhas e 29 % menos Cl^- em raízes que ES.

Em concordância com os resultados obtidos, muitos estudos destacam que os teores de Cl^- são aumentados pela salinidade (SILVA et al., 2013; GADELHA et al., 2017; FREITAS et al., 2019). Embora a maioria dos estudos expliquem os efeitos negativos do acúmulo de Na^+ nos tecidos, altas concentrações de Cl^- também são tóxicas às células vegetais (BAETZ et al., 2016; WU; LI, 2019). Em algumas espécies como citrus, videira e na maioria das halófitas, o Cl^- se torna ainda mais citotóxico que o Na^+ (HENDERSON et al., 2014; BEN YAHMED et al., 2015; BAZIHIZINA et al., 2019). Altas concentrações de Cl^- interferem no rendimento quântico do PSII e na taxa de transporte de elétrons, culminando em prejuízos na fotossíntese e conseqüentemente no metabolismo do carbono (CARILLO et al., 2019). Além disso, quando

em excesso, os íons Cl^- competem pelos transportadores de NO_3^- , o que resulta na redução da absorção e estocagem de nitrogênio, macronutriente esse, essencial para a síntese de proteínas (WU; LI, 2019).

Figura 12 - Teores de Cl^- em folhas (A) e raízes (B) de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES - sem hachura) e São Francisco (SF - com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle (solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM - colunas cinzas). Em uma mesma cultivar, médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente entre si, enquanto em um mesmo nível de salinidade, médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média.



Plantas tolerantes ao estresse salino, por sua vez, tendem a acumular menos Cl^- que plantas sensíveis (KATSCHNIG et al., 2015). Em videira, por exemplo, a tolerância ao estresse salino foi associada a mecanismos de exclusão de Cl^- da parte aérea (HENDERSON et al., 2014). Segundo Katsching et al (2015), uma das estratégias adotadas por plantas halófitas para sobreviverem em ambientes com altas concentrações de sais está no controle da homeostase de Cl^- . Enquanto as glicófitas acumulam grandes concentrações desse íon tóxico a partir de tratamentos com 10 mM de NaCl, halófitas, mantem esses valores inalterados em folhas e raízes até 100 mM de NaCl. A partir disso pode-se sugerir que, em nosso estudo, um dos mecanismos

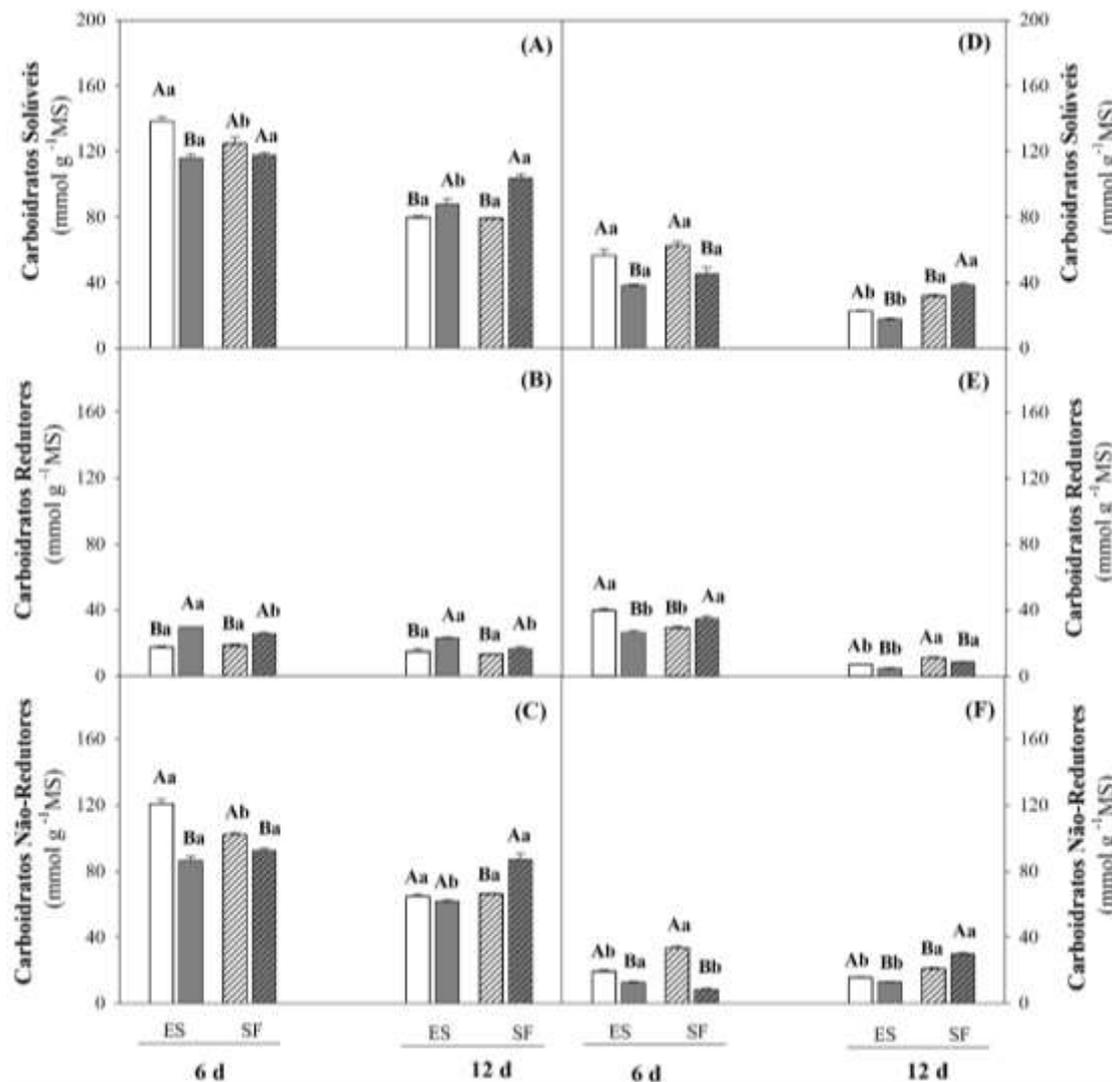
envolvidos com a tolerância ao estresse salino na cv. SF está relacionado ao controle do acúmulo de Cl^- em folhas e raízes.

Os teores de carboidratos solúveis variaram bastante em relação às cultivares, aos tratamentos e ao tempo de exposição ao estresse (Figura 13). Aos 6 dias, os teores de carboidratos solúveis nas folhas apresentaram pequena redução pelo estresse salino, na cultivar ES (Fig. 13A). No entanto, aos 12 dias, a salinidade aumentou em 25 %, em média, os teores de carboidratos solúveis em relação ao controle. Adicionalmente, após 12 dias de estresse, o conteúdo de carboidratos solúveis nas folhas de SF foram 18 % maiores que aqueles de ES. Em raízes (Fig. 13D), os teores de carboidratos solúveis foram reduzidos pela salinidade, exceto na cultivar SF após 12 dias de estresse, em que houve um aumento de 22 % em relação aquelas crescidas na ausência de NaCl. É possível observar, também, que a concentração média de carboidratos solúveis foi maior em folhas do que em raízes (Fig. 13A e D).

Em condições controle, não houve alterações nos teores de carboidratos redutores de folhas ES e SF, e em ambos dias de coleta (Fig. 13B). Contudo, nesse mesmo órgão, a presença de NaCl na solução nutritiva induziu pequenos aumentos nos teores de carboidratos redutores. Porém, a cultivar SF apresentou, em média, 22 % menos desse tipo de carboidratos em folhas sob estresse que ES. Com exceção dos valores de SF aos 6 dias de estresse, nas raízes, foram observadas respostas de natureza inversa às das folhas (Fig. 2E), onde os teores de carboidratos redutores foram menores na condição controle. Além disso, em raízes sob estresse salino, os teores de carboidratos redutores foram 32 e 82 % maiores em SF que em ES, aos 6 e 12 dias, respectivamente.

Sob condições controle, o conteúdo de carboidratos não-redutores foi menor em folhas da cultivar SF em comparação a ES, aos 6 dias, e permaneceu inalterada pela cultivar aos 12 dias (Fig. 13C). O estresse salino, por sua vez, causou uma redução média de 20 % nos teores de carboidratos não-redutores de folhas ES e SF, aos 6 dias. Já, após 12 dias na presença de NaCl a 80 mM, folhas da cultivar SF, tiveram os teores de carboidratos não-redutores 32 % maiores em relação à condição controle e assim como a cultivar ES. Similarmente ao que aconteceu em folhas, nas raízes (Fig. 13F), os teores de carboidratos não-redutores também foram diminuídos pela salinidade e aumentados após 12 dias de estresse em SF. Assim como o ocorrido nos carboidratos solúveis, a concentração média de carboidratos não-redutores foi maior em folhas que em raízes (Fig. 13C e F).

Figura 13 - Teores de carboidratos solúveis (A e D), carboidratos redutores (B e E), carboidratos não-redutores (C e F) em folhas (A, B e C) e raízes (D, E e F) de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES- sem hachura) e São Francisco (SF- com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle (solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM- colunas cinzas). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média. Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.

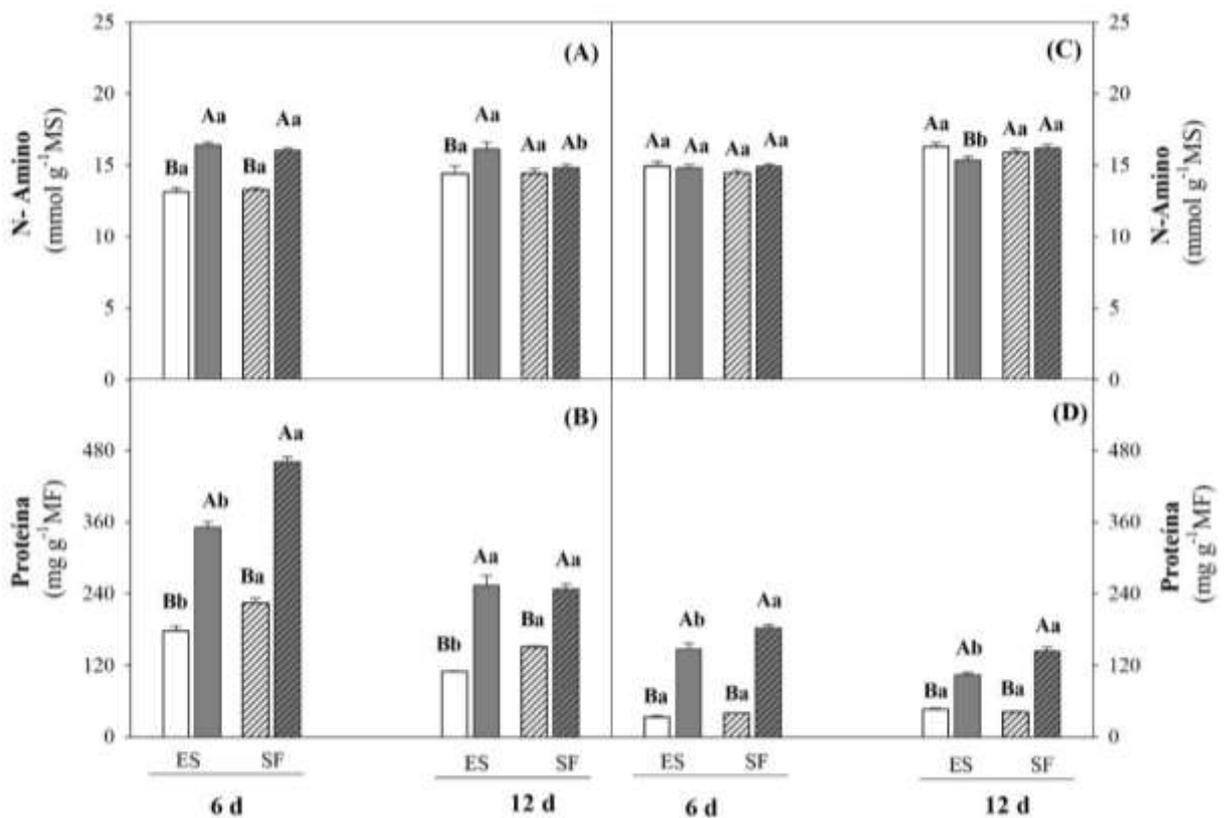


Quando as plantas crescem na presença de altas concentrações de sais, é comum que estas induzam a produção de compostos orgânicos específicos, os quais aumentam potencial osmótico celular e assim permitem o contínuo fluxo de água (SHAHZAD et al., 2019). Esse fenômeno, conhecido como ajustamento osmótico, está intimamente relacionado com a tolerância aos estresses salino e hídrico (NASCIMENTO et al., 2015; SILVA et al., 2019; FRUKH et al., 2020). Em mudas de jatobá crescidas sob estresse salino severo, o acúmulo de grandes quantidades de carboidratos, proteínas, aminoácidos e prolina, promoveu o aumento do turgor foliar, que resultou na estabilização das trocas gasosas (NASCIMENTO et al., 2015). Em contrapartida, no presente estudo, as alterações nos conteúdos de carboidratos solúveis, redutores e não-redutores foram dependentes do tratamento, do tempo de exposição ao estresse,

da cultivar e do órgão analisado. Desse modo, as variações dos teores de carboidratos parecem estar mais associadas à própria fisiologia das plantas de arroz do que com o ajustamento osmótico, não tendo sido, assim, determinantes para a tolerância ao estresse salino.

Sob condições controle, os teores de N-aminossolúveis não foram alterados pelas cultivares, tanto em folhas quanto em raízes (Fig. 14A e C). A salinidade, porém, causou mudanças que foram dependentes do órgão e do tempo de exposição. Os teores de N-aminossolúveis foram 25 % maiores em folhas após 6 dias de estresse salino, não havendo diferença mediada pela cultivar (Fig. 14A). Já aos 12 dias de estresse, esses teores foram maiores que os do controle apenas em plantas ES (12 % superiores). Em plantas SF, os teores de N-aminossolúveis foram 12 % menores que os de ES, quando ambas foram expostas ao NaCl por 12 dias (Fig. 14A). Poucas alterações aconteceram nas raízes (Fig. 14C). Após 12 dias de estresse, raízes de ES acumularam um pouco menos de N-amino que as controle. Nessas mesmas condições, as raízes SF apresentaram 6 % mais N-aminossolúveis que ES.

Figura 14 - Teores de N-aminossolúveis (A e C) e proteínas solúveis (B e D), em folhas (A e B) e raízes (C e D) de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES- sem hachura) e São Francisco (SF- com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle (solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM- colunas cinzas). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média. Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.



Como referido antes, o acúmulo de substâncias orgânicas visando o ajustamento osmótico é uma resposta comum de plantas submetidas a estresse salino (NASCIMENTO et al., 2015; GOMES DO Ó et al., 2017; FRUKH et al., 2020). Dentre esses, destacam-se os compostos solúveis contendo nitrogênio. Diferentemente do que foi observado nesse estudo, Gomes do Ó et al. (2017) reportaram que o acúmulo de maiores quantidades de carboidratos totais e N-aminossolúveis propiciou maior crescimento da cultivar tolerante de feijão-de-corda (Epace 10) quando estas foram submetidas a valores crescentes de condutividade elétrica na água de irrigação (GOMES DO Ó, et al 2017).

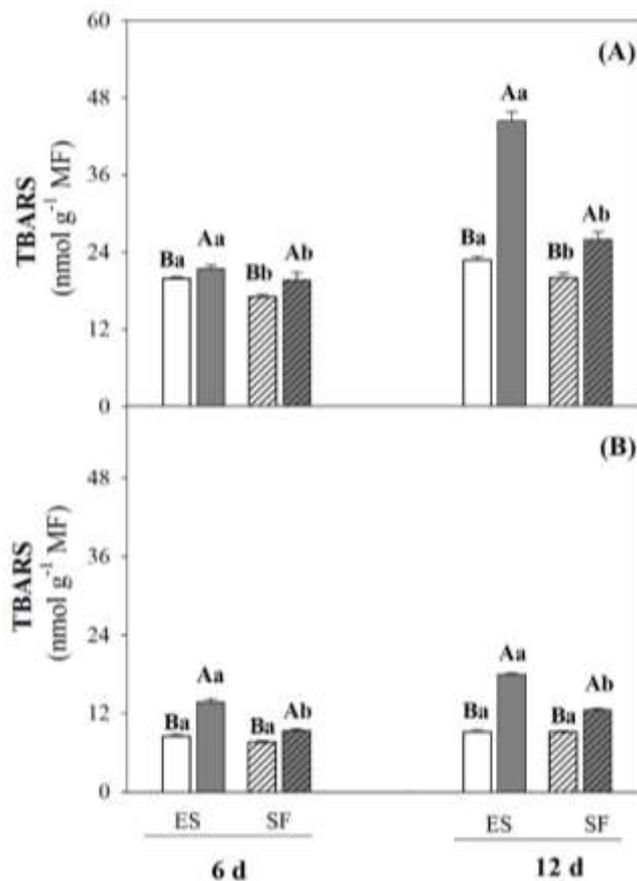
Os teores de proteínas totais foram destacadamente maiores em plantas crescidas na presença de NaCl a 80 mM que em plantas crescidas na ausência desse composto. Em folhas da cultivar ES, esses aumentos foram de 97 e 132 %, aos 6 e 12 dias, respectivamente. Já na cultivar SF, esses aumentos foram de 105 e 64 %. Em raízes, os incrementos propiciados pelo excesso de sais, foram de 340 e 123 % na cultivar ES, aos 6 e 12 dias, e de 362 e 243 %, na cultivar SF. Sob condições controle, os teores de proteínas foram maiores em folhas da cultivar SF, tanto aos 6 quanto aos 12 dias, enquanto que em raízes não houveram alterações dependentes da cultivar. Sob condições de estresse, o teor de proteínas totais foi consideravelmente maior na cultivar SF que em ES, exceto em folhas após 12 dias de exposição à salinidade, que permaneceram inalteradas.

O papel das proteínas em resposta ao estresse salino é multifatorial, uma vez que estas podem atuar nas complexas vias de respostas ao estresse salino. No trabalho de Nascimento et al. (2015), por exemplo, acúmulos de proteínas em plantas de jatobá submetidas ao estresse salino foram associados ao ajustamento osmótico e à manutenção do status hídrico. Em contrapartida, no estudo de Fruk et al. (2020), os teores de proteínas solúveis em cultivares de arroz foram reduzidos pelo estresse salino, muito embora essa redução tenha sido atenuada na cultivar tolerante. Nesse mesmo estudo, a maior tolerância da cultivar Vytilla-4 foi coerente com a regulação da abundância de proteínas responsáveis pela fotossíntese, metabolismo energético, metabolismo da glutatona, metabolismo do nitrogênio e defesas do estresse (FRUKH et al., 2020). Assim, o aumento geral dos teores de proteínas em folhas e raízes da cultivar SF pode estar relacionada com a tolerância dessas plantas, tanto visando o ajustamento osmótico, como através da síntese de uma ampla variedade de proteínas que vão atuar nas respostas de defesa ao estresse salino.

O estresse salino resulta em danos oxidativos, que são causados pela superprodução de EROs, as quais levam a oxidação de componentes celulares. Uma das injúrias provocadas pela salinidade é o acúmulo de TBRAS ou malondialdeído (MDA), em geral decorrentes da

oxidação dos lipídios pelo H_2O_2 (HOSSAIN; DIETZ, 2016). Os teores de TBARS, indicador da peroxidação lipídica, foram alterados pela cultivar e pelo tempo de exposição, tanto em folhas como em raízes (Figura 15). Em folhas sob condições controle, houve discretas reduções no conteúdo de TBARS na cultivar SF em comparação à ES (Fig. 15A), enquanto permaneceram inalterados nas raízes (Fig. 15B). A salinidade, por sua vez, provocou o aumento dos teores de TBARS em todas as cultivares, órgãos e tempos avaliados. Em folhas, esses aumentos foram de 7 e 16 %, aos 6 dias; e de 95 e 30 %, aos 12 dias, em ES e SF, respectivamente (Fig. 15A). Similarmente, em raízes, os incrementos induzidos pelo excesso de sais na solução nutritiva foram de 60 e 24 %; e de 94 e 35 % (Fig. 15B). Ao comparar as cultivares sensível e tolerante, pode-se observar que, em condições de estresse salino, SF acumulou menos TBARS que ES. Nas folhas, essas reduções foram na ordem de 8 %, aos 6 dias, e de 42 %, aos 12 dias (Fig. 15A); enquanto nas raízes foram de 32 e 30 % (Fig. 15A). Pode-se observar também que o acúmulo de TBARS ocorreu principalmente em folhas, e este foi, em geral, 1,16 vezes superior ao de raízes.

Figura 15 - Teores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em folhas (A) em raízes (B) de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES - sem hachura) e São Francisco (SF- com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle (solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM - colunas cinzas). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média. Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.

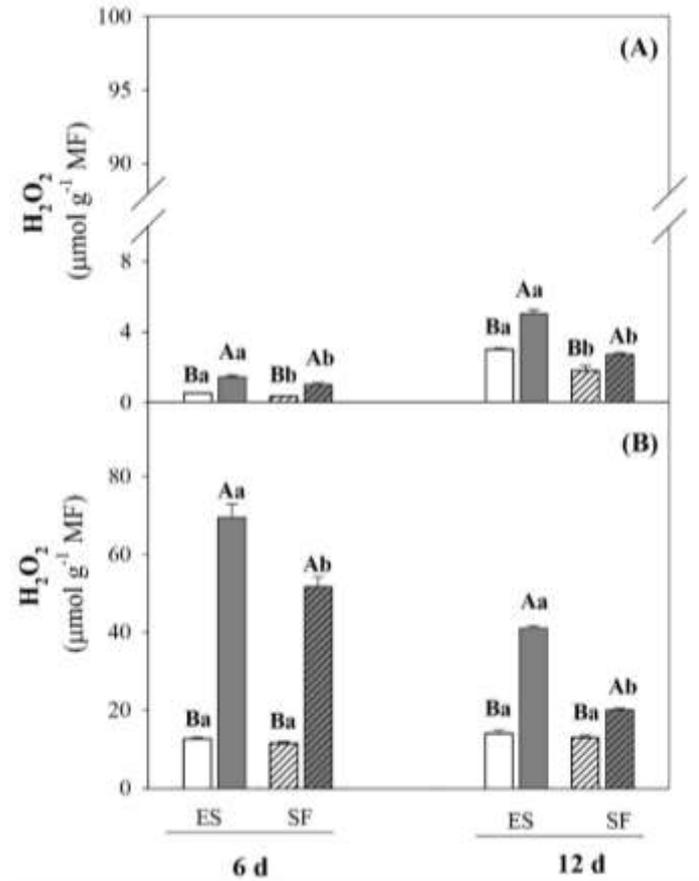


Tendo em vista isso, é notório que a cv SF sofreu menos danos aos lipídios de membrana que a cv ES, sugerindo que este pode ser um mecanismo que contribui para a tolerância diferencial dessas duas cultivares frente ao estresse salino. A redução da peroxidação lipídica em genótipos tolerantes já haviam sido reportadas em outras plantas (ELSAWY et al., 2018; LI et al., 2018; ZHANG et al 2019). Do mesmo modo, em um estudo com seis cultivares de arroz contrastantes quanto a tolerância à salinidade, duas delas acumularam menos MDA em folhas e panículas, mantiveram menor razão Na^+/K^- , menor redução no conteúdo de clorofila, altas concentrações de ascorbato reduzido e prolina, e por esse motivo foram consideradas tolerantes ao estresse salino (GERONA et al., 2019).

As alterações no acúmulo de H_2O_2 foram muito semelhantes às já descritas para a peroxidação lipídica (Figura 16). A salinidade aumentou significativamente os teores H_2O_2 nos órgãos, dias e cultivares analisadas. Após 6 e 12 dias, esses teores foram, em média, 1,9 e 0,6 vezes maiores em folhas estressadas que naquelas sob condições controle (Fig. 16A). Nas raízes, esses aumentos foram mais pronunciados, especialmente aos 6 dias; sendo 4,7 e 1,2 maiores que na ausência de estresse (Fig. 16B). Mais uma vez, a cultivar SF acumulou menos H_2O_2 em condições de estresse salino que as plantas ES. Essas reduções foram de 27 e 46 %, em folhas; e de 25 e 51 %, em raízes, após 6 e 12 dias de exposição à salinidade. Diferentemente do que aconteceu para TBARS, a concentração de H_2O_2 foi mais abundante em raízes que em folhas (em média 10 vezes maior).

Como mencionado anteriormente, uma das principais respostas ao excesso de sais no ambiente radicular é a indução do estresse oxidativo, no qual o metabolismo da planta passa a produzir cada vez mais EROs e se torna incapaz de desintoxicar a célula (HOSSAIN; DIETZ, 2016). O acúmulo de H_2O_2 , portanto, é forte indício de dano oxidativo em condições de estresse salino. A cv. SF foi mais eficiente que ES em restringir o acúmulo de H_2O_2 sob salinidade, o que está intimamente relacionado com a menor peroxidação lipídica nessa cv. Como os danos oxidativos foram mais brandos na cv. SF, pode-se sugerir que a tolerância dessa cultivar deva estar relacionada a competentes mecanismos de manutenção da homeostase redox, os quais podem ser de natureza enzimática e/ou não enzimática. Do mesmo modo, em um estudo com dez cultivares de arroz, aquelas que acumulavam menos MDA e H_2O_2 foram as que apresentaram melhores índices de tolerância à salinidade em todos os tratamentos com NaCl empregados (50, 100, 150 e 200 mM) (FRUKH et al., 2020). Nesse mesmo estudo, os menores danos oxidativos foram associados à ativação de um eficiente sistema enzimático de defesa (maior atividade das enzimas SOD, APX, CAT e GR) nas cultivares tolerantes.

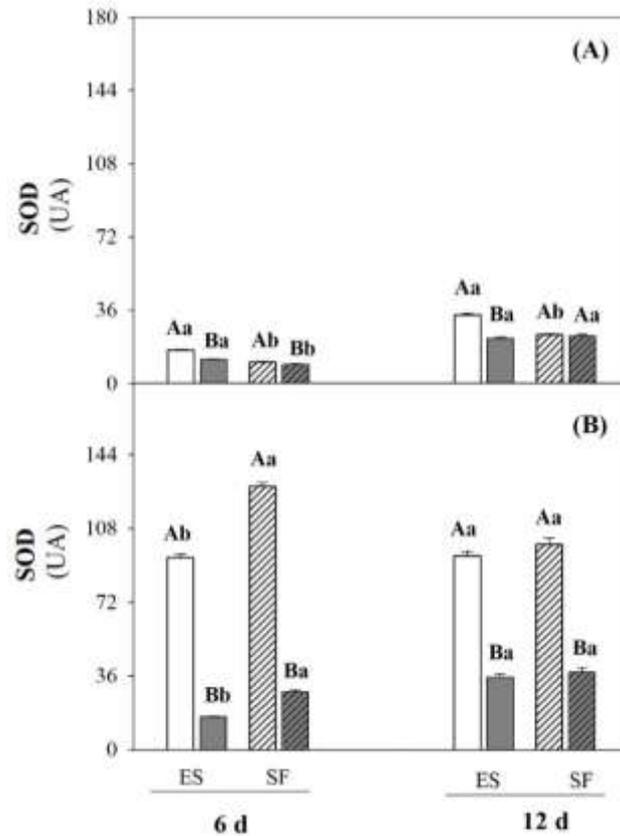
Figura 16 - Teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas (A) em raízes (B) de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES - sem hachura) e São Francisco (SF - com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle (água destilada - colunas brancas) ou de estresse salino (NaCl a 80 mM - colunas cinzas). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média. Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.



A SOD é a enzima responsável pela eliminação do radical superóxido, produzindo H_2O_2 (HOSSAIN; DIETZ, 2016) e esta enzima está relacionada com a tolerância ao estresse salino em muitas espécies (ELSAWY et al., 2018; MUSHKE et al., 2019; ABDELAZIZ et al., 2019; KHALID et al., 2020; ELSHEERY et al., 2020). A atividade da SOD foi, em geral, reduzida pela salinidade, tanto em folhas quanto em raízes de plantas ES e SF (Figura 17). Em folhas (Fig. 17A), aos 6 dias, as reduções na atividade dessa enzima ocorreram em função da cultivar e da exposição ao estresse. Já aos 12 dias, não houve alterações na atividade da SOD em folhas de ES e de SF sob estresse salino (Fig. 17A). Em raízes (Fig. 17B), a atividade média da SOD foi superior àquelas de folhas, especialmente nas plantas sob condições controle. Nesse órgão também, o efeito da salinidade foi bem mais evidente, diminuindo, em média, 80 % a atividade dessa enzima após 6 dias, e em 62 % após 12 dias. Cabe ressaltar que, em raízes, a atividade da SOD foi maior na cultivar SF depois de 6 dias na presença ou ausência de NaCl. Entretanto, ao se comparar as cultivares sob o mesmo tratamento, nota-se um aumento de 75 % na atividade dessa enzima nas condições de estresse, ao passo que, nas condições controle, esse

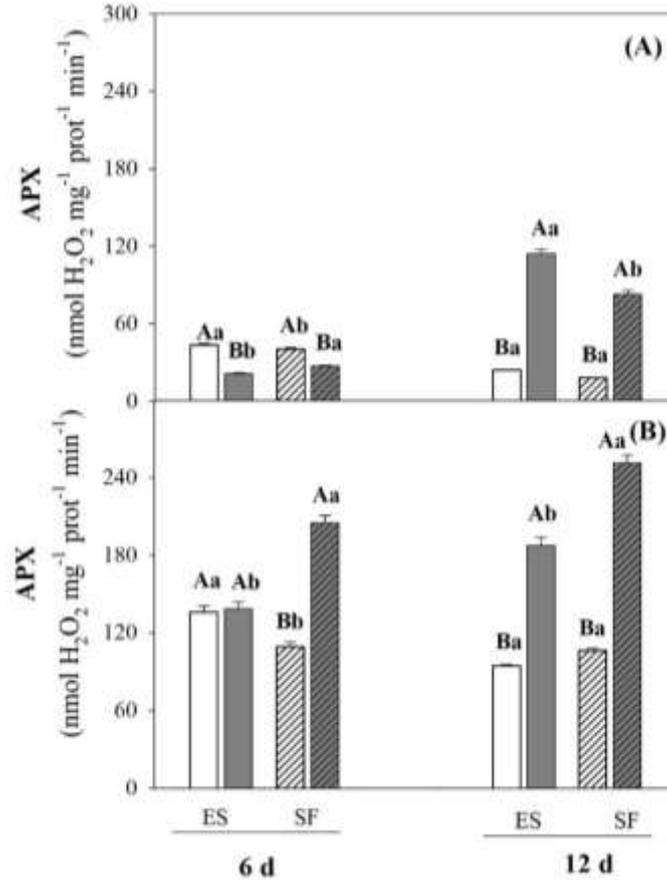
aumento em razão da cultivar foi de apenas 37 % (Fig. 17B). Apesar disso, a atividade da SOD parece não ter sido eficaz na manutenção da homeostase redox em condições de estresse salino e por esse motivo não foi determinante para a tolerância da cv SF.

Figura 17 - Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folhas (A) e em raízes (B) de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES - sem hachura) e São Francisco (SF - com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle (solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM - colunas cinzas). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média. Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.



As peroxidases são enzimas que decompõem o H_2O_2 e, por esse motivo, são cruciais para a tolerância de plantas ao estresse salino (ELSAWY et al., 2018; MUSHKE et al., 2019; ABDELAZIZ et al., 2019; KHALID et al., 2020; ELSHEERY et al., 2020). De modo geral, sob condições controle, a atividade da APX manteve-se inalterada entre os genótipos (Figura 18). Entretanto, sob condições de estresse salino, a atividade dessa enzima foi dependente do tempo de exposição e da cultivar. Em folhas, após 6 dias de estresse, houve uma redução média de 42 % na atividade da APX, ao passo que, após 12 dias, essa atividade foi estimulada pela salinidade. Após 12 dias de estresse salino, a atividade dessa enzima foi, em média, 3,6 vezes maior em plantas sob influência do excesso de sais que àquelas das plantas controle. Em raízes,

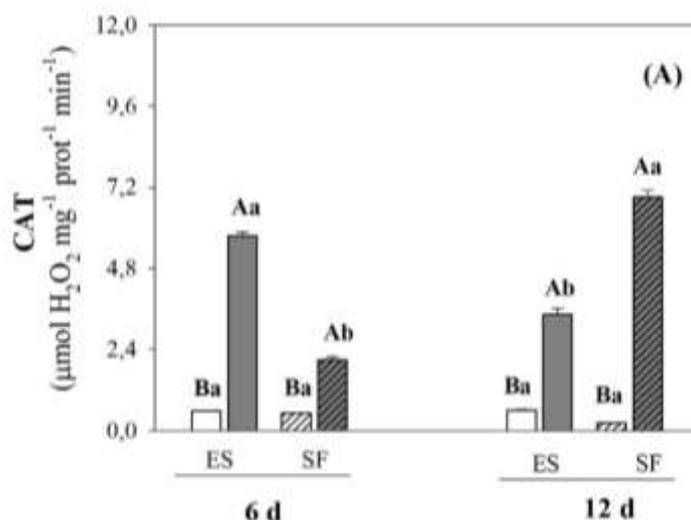
Figura 18- Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em folhas (A) e em raízes (B) de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES - sem hachura) e São Francisco (SF - com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle (solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM - colunas cinzas). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média. Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.



a atividade da APX foi marcadamente superior em plantas sob estresse salino, com exceção da cv. ES aos 6 dias. Vale salientar que a atividade da APX foi fortemente induzida em raízes da cv. SF sob estresse salino, sendo, em média, 41 % superior à da cv. ES.

A salinidade induziu substancialmente a atividade da CAT em folhas de arroz (Figura 19). A atividade dessa enzima em plantas ES sob estresse salino foi 8,8 e 4,6 vezes maior que aquelas da condição controle, após 6 e 12 dias, respectivamente. Da mesma maneira, em plantas SF, a atividade da CAT alcançou valores 3 e 30 vezes maiores que a das plantas controle. Adicionalmente, ao se comparar as cultivares crescidas na presença de NaCl na solução nutritiva, nota-se que aos 6 dias, a atividade da CAT foi 63 % menor em SF, enquanto, aos 12 dias, houve uma inversão e a atividade dessa enzima foi 103% maior em SF. A atividade da CAT não foi detectada em raízes.

Figura 19 - Atividade da catalase (CAT) em folhas de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES - sem hachura) e São Francisco (SF - com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle (solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM - colunas cinzas). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média. Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.



A atividade da G-POD foi alta em todas as condições experimentais analisadas, especialmente em raízes (Figura 20). Sob condições controle, em geral, não houve variações promovidas pela cultivar, exceto em raízes do primeiro tempo de coleta, no qual a atividade da G-POD em SF foi o dobro daquela de ES. A salinidade, por sua vez, propiciou acentuada elevação da atividade dessa enzima em ambos os órgãos e dias avaliados. Em folhas da cultivar ES (Fig. 20A), a atividade da G-POD foi 9,5 e 31,1 vezes maior (aos 6 e 12 dias, respectivamente) naquelas sob estresse que nas crescidas em condições normais. O mesmo padrão se manteve na cultivar SF, porém os aumentos foram de 5,1 e 33,2 vezes. Em raízes de plantas crescidas por 6 dias na presença de NaCl (Fig. 20B), a atividade da G-POD foi, 5,8 e 3,1 vezes superior que em condições controle, em ES e SF, respectivamente. Já após 12 dias de estresse, esses aumentos foram de 4,3 vezes em ES e de 6,7 vezes em SF.

A GR é uma enzima importante na desintoxicação de ROS, uma vez que atua na manutenção de uma alta relação GSH/GSSG, bem como de uma alta razão NADP⁺/NADPH. Essas relações são mais importantes ainda em condições de estresse salino, pois colaboram para manter um ambiente redutor na célula e para o funcionamento correto da cadeia transportadora de elétrons, respectivamente (GILL *et al.*, 2013). A atividade da GR foi influenciada por todos os dobramentos considerados nesse estudo (Figura 21). Sob condições controle, a atividade dessa enzima foi aumentada na cultivar SF, com exceção das folhas no primeiro dia de coleta, a qual permaneceu inalterada. A salinidade, porém, promoveu respostas inversas em folhas e raízes de arroz. Em folhas (Fig. 21A), a atividade da GR foi aumentada pela salinidade, e esses

Figura 20 - Atividade da peroxidase do guaiacol (G-POD) em folhas (A) em raízes (B) de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES- sem hachura) e São Francisco (SF- com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle (solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM- colunas cinzas). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média. Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.

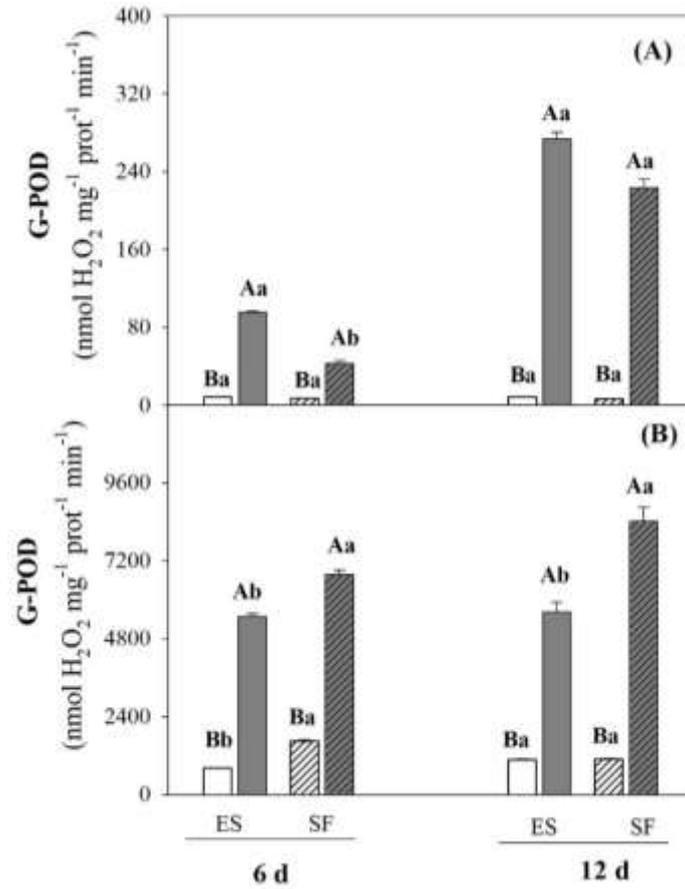
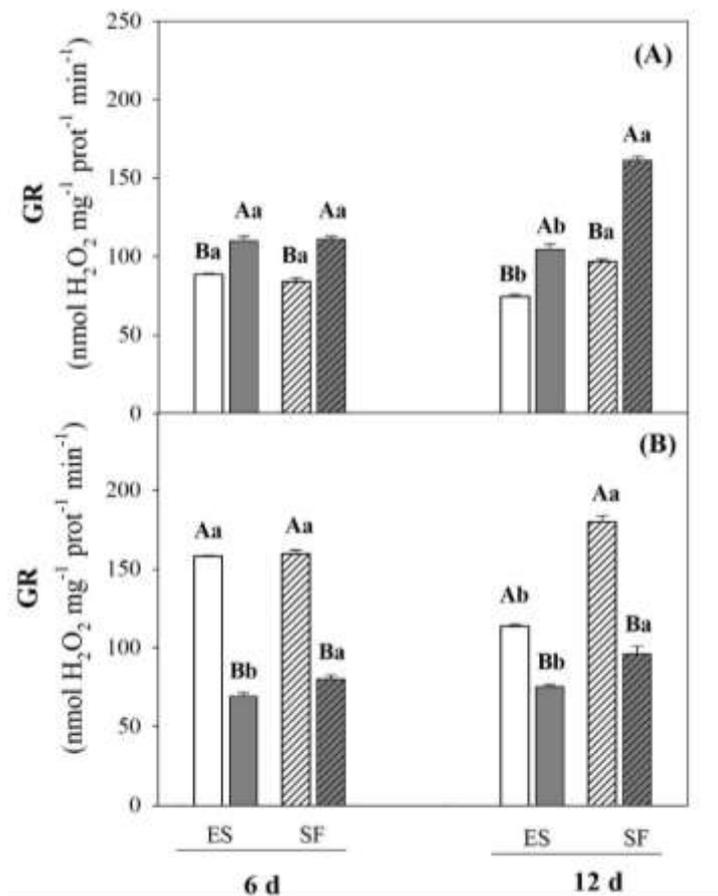


Figura 21 - Atividade da redutase da glutatona em folhas (A) em raízes (B) de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES - sem hachura) e São Francisco (SF - com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle (solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM - colunas cinzas). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média. Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.



aumentos foram, em média, de 25 % e 55 % em relação a atividade dessa enzima nas plantas controle, aos 6 e 12 dias, respectivamente. Aos 12 dias, pode-se observar também, que folhas da cultivar SF apresentaram atividade da GR 54 % superior a das plantas ES, quando ambas foram submetidas ao estresse salino. Por outro lado, em raízes (Fig. 21B), a atividade dessa enzima foi reduzida pela salinidade, independentemente da cultivar ou do tempo de exposição ao estresse. Aos 6 dias, a atividade da GR em raízes ES foi 56 % menor que a das plantas controle, enquanto em SF foi 49 % menor. Aos 12 dias, essas reduções foram de 33 % e 47 % respectivamente (Fig. 21B). De modo similar ao que aconteceu em folhas, a atividade da GR em raízes sob estresse salino foi, em média, 20 % mais acentuada em SF que em ES (Fig. 21A e B).

As enzimas antioxidantes, como CAT, APX, POD, GR e SOD, participam de reações coletivas que culminam na eliminação de EROs e na inibição da peroxidação lipídica (AHMAD et al., 2019; SHARMA et al., 2019). Nesse contexto, muitas evidências indicam que

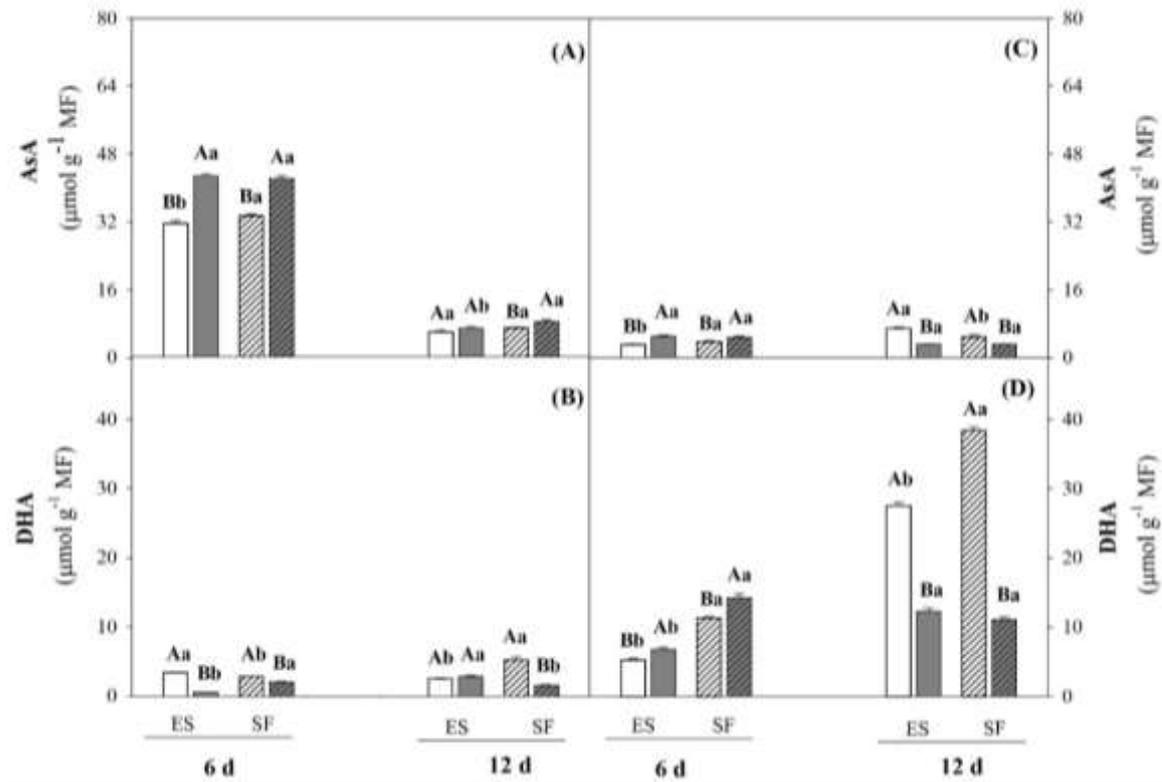
as atividades dessas enzimas podem ser usadas para estimar a tolerância ao estresse salino em plantas. Muitos estudos tem reportado que aumentos na atividade da CAT, APX, POD, GR e/ou SOD proporcionam maior tolerância às plantas (ELSAWY et al., 2018; MUSHKE et al., 2019; ABDELAZIZ et al., 2019; KHALID et al., 2020; ELSHEERY et al., 2020). Respostas semelhantes são encontradas em plantas de arroz (KIBRIA et al., 2017; MA et al., 2018; GERONA et al., 2019; FRUKH et al., 2020). Nesses estudos, variedades de arroz com tolerância diferencial ao estresse salino apresentam variações na atividade específica de uma ou mais de uma das enzimas antioxidantes. No estudo de Ma et al. (2018), por exemplo, houve uma forte correlação entre o aumento da atividade da SOD e as características inerentes a tolerância ao sal em linhagens com maior crescimento sob estresse salino. Já no estudo de Kibria et al. (2017) apenas CAT e APX foram significativamente aumentadas no genótipo tolerante. Adicionalmente, como referido antes, aumentos na atividade de ambas as enzimas (SOD, APX, GR e CAT) foram relatadas na cultivar Vytilla (tolerante ao estresse salino) (FRUKH et al., 2020).

Em contrapartida, no presente estudo, os resultados não foram consistentes e a atividade das enzimas antioxidantes foram dependentes do tratamento, do tempo de exposição, da cultivar e do órgão avaliado. Ou seja, é mais provável que as alterações ocorridas tenham sido intrínsecas ao metabolismo das plantas do que a uma robusta regulação na cultivar tolerante. Vale destacar, apenas, a indução da atividade da APX nas raízes sob estresse salino, e o substancial incremento dessa na cv. SF em comparação à cv. ES. Esse achado sugere uma possível rota de defesa enzimática contra os danos do estresse salino em raízes da cultivar tolerante.

Além da defesa enzimática, outros compostos também atuam como agentes redutores de EROs, dentre eles, destacam-se o ascorbato e a glutathiona (GILL et al., 2013). Os teores de AsA foliares foram, em geral, aumentados pela salinidade (Fig. 22A). Entretanto, entre as cultivares, as diferenças só foram notadas após 12 dias de estresse, no qual o conteúdo de AsA foi discretamente superior em folhas SF. Sob condições controle, os teores desses compostos foram ligeiramente maiores em folhas SF somente no primeiro tempo avaliado (Fig. 22A). Em raízes (Fig. 22C), os efeitos da salinidade sobre os teores de AsA foram dependentes do tempo de exposição ao estresse. Aos 6 dias, os teores de AsA foram 66 e 28 % maiores em raízes ES e SF sob estresse salino que sob condições controle. Fato contrário ocorreu após 12 dias de estresse, no qual os teores desse composto não enzimático foi 54 e 35 % menor em raízes sob estresse que os da condição controle. Sob condições controle, fato similar ocorreu:

após 6 dias, os teores de AsA foram maiores em raízes SF, enquanto, aos 12 dias, foram maiores em ES (Fig. 22C).

Figura 22 - Teores de ascorbato reduzido-AsA (A e C) e de ascorbato oxidado- DHA (B e D) em folhas (A e B) em raízes (C e D) de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES - sem hachura) e São Francisco (SF - com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições (solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM - colunas cinzas). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média. Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.

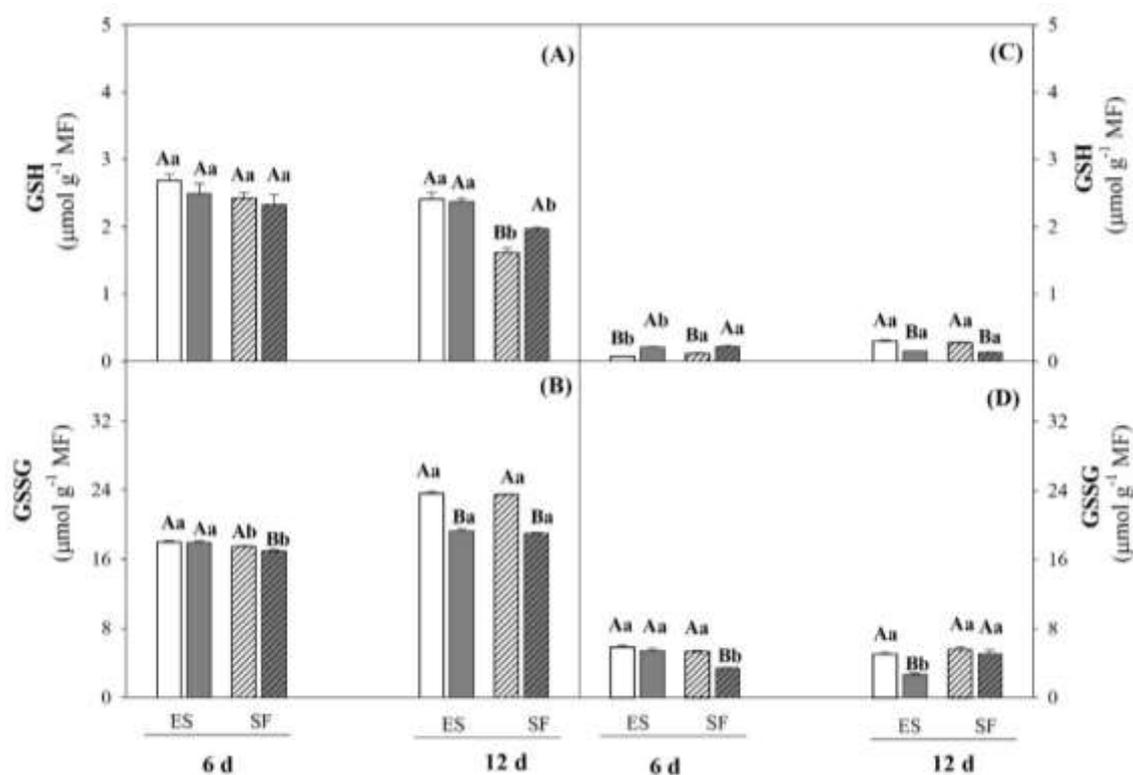


Sob condições controle, os teores de DHA variaram entre as duas cultivares dependentemente do tempo (Fig. 22B e D). Tal conteúdo foi maior em raízes de SF em ambos os tempos de coleta (Fig. 22D), enquanto, em folhas SF, somente aos 12 dias (Fig. 22B). A única situação em que os teores de DHA foram maiores em ES foram em folhas de 6 dias (Fig. 22B). Os teores de DHA foram, em geral, reduzidos pela salinidade (Fig. 22B e D). Uma exceção a tal fato ocorreu em raízes expostas ao NaCl por 6 dias, nos quais os teores desse composto foram maiores (em média 28%) nas plantas sob estresse salino (Fig. 22D). Ao se comparar as cultivares ES e SF expostas à salinidade, pode-se perceber que os teores de DHA variaram dependentemente do tempo e do órgão avaliado. Em folhas, os teores desse composto foram 3 vezes maiores em SF após 6 dias de estresse, ao passo que, após 12 dias na presença de NaCl, 0,8 vezes foram maiores em ES (Fig. 22B). Em raízes sob estresse salino, os teores

de DHA foram 1,1 vezes maiores em SF, aos 6 dias, e permaneceram inalterados pelas cultivares, aos 12 dias (Fig. 22D).

Em folhas e aos 6 dias, os teores de GSH não sofreram alterações causadas pela salinidade e nem pelas cultivares (Fig. 23A). Contudo, aos 12 dias, os teores desse composto nas folhas foram menores em plantas SF, tanto em condições controle (33%) quanto em condições de estresse salino (15%). A salinidade, por sua vez, aumentou em 21 % os teores de GSH na cultivar SF após 12 dias em comparação às plantas crescidas na ausência de NaCl (Fig. 23A). As raízes apresentaram comportamento variável em função do tempo de exposição ao estresse salino (Fig. 23C). Enquanto, no 6º dia, os teores de GSH foram aumentados pela salinidade, no 12º dia, eles foram reduzidos. Nos demais dobramentos analisados as variações foram muito pequenas (Fig. 23C). Vale destacar, também, que os teores de GSH nas folhas foram, em média, 11 vezes superiores aos de raízes (Fig. 23 e C).

Figura 23 - Teores de glutatona reduzida-GSH (A e C), de glutatona oxidada- GSSG (B e D) e em folhas (A e B) em raízes (C e D) de plantas de arroz das cultivares Esmeralda (ES - sem hachura) e São Francisco (SF - com hachura) aos seis e doze dias e crescidas sob condições controle (solução nutritiva - colunas brancas) ou de estresse salino (solução nutritiva acrescida de NaCl a 80 mM- colunas cinzas). Os valores representam a média de cinco repetições \pm o erro padrão da média. Detalhes estatísticos iguais aos da Fig. 1.



Os teores de GSSG foliares foram discretamente menores na cultivar SF, aos 6 dias, enquanto permaneceram inalterados pela cultivar aos 12 dias (Fig. 23B). Todavia, o estresse salino reduziu os teores desse composto em folhas, exceto em ES aos 6 dias. Aos 12 dias, a

redução média causada pela salinidade em folhas ES e SF foi de 18 % (Fig. 23B). Em raízes, poucas alterações no conteúdo de GSSG ocorreram (Fig. 23D). Em razão da salinidade, os teores de GSSG foram reduzidos, aos 6 dias, apenas em raízes SF, e com 12 dias de estresse, apenas em raízes ES, todas em comparação aos valores do controle. Em função da cultivar, as raízes de SF acumularam 36 % menos GSSG que ES quando ambas cresciam por 6 dias sob condições salinas. Já aos 12 dias de estresse, a cultivar que acumulou menos GSSG foi a ES (Fig. 23D). Apesar das pequenas variações, as folhas acumularam mais GSSG que as raízes (Fig. 23B e D).

Assim como o ocorrido para as enzimas antioxidativas, os teores de ascorbato e glutathiona também parecem não terem sido determinantes para a tolerância ao estresse salino. As variações foram inconsistentes e aparentam ser da própria fisiologia da planta. Em adição, apesar da atividade da APX ter sido estimulada pelo estresse salino e pela cv tolerante em raízes, não houve correlação direta com os teores de AsA e DHA. O mesmo aconteceu com os teores de GSH e a atividade da GR. Esses resultados discordam com os de Gerona et al (2019), que reportaram um eficiente sistema de defesa não enzimático em plantas de arroz da cultivar tolerante, apresentando elevados conteúdos de AsA.

7.4 Conclusão

A tolerância ou susceptibilidade ao estresse salino em plantas de arroz são dependentes de múltiplos fatores que induzem várias mudanças fisiológicas. A tolerância da cultivar São Francisco parece ser associada especialmente com a manutenção da homeostase iônica, através de sua grande capacidade de evitar a entrada, minimizar o transporte para a parte aérea ou excluir Cl⁻. As homeostases osmótica e redox, entretanto, foram menos determinantes, e as alterações mais significativas aconteceram em SF apenas com relação à indução de proteínas totais e ao aumento da atividade da APX em raízes.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos permitem concluir que as cultivares de arroz BRS Pepita, BRS Sertanejo, BRS Esmeralda, BRS São Francisco e BRS Primavera possuem tolerância diferencial à salinidade. Plantas de arroz da cultivar BRS São Francisco foram capazes de minimizar os danos impostos pela salinidade no crescimento, na homeostase iônica e nas trocas gasosas e, por isso, foram consideradas tolerantes ao estresse salino. As plantas da cultivar BRS Esmeralda, por outro lado, apresentaram alta sensibilidade ao estresse salino.

A tolerância ao estresse salino em BRS São Francisco envolve complexas vias de defesa, as quais foram associadas a mecanismos fisiológicos e moleculares de controle do acúmulo de Na^+ no citosol, a menores teores de Cl^- , a uma maior eficiência nas trocas gasosas, na captura de energia e no transporte de elétrons, bem como à manutenção da integridade dos cloroplastos. Adicionalmente, a indução de proteínas totais e o aumento da atividade da APX em raízes foram, pelo menos em parte, mecanismos de manutenção da homeostase osmótica e redox, contribuindo também para o maior crescimento de plantas da cultivar BRS São Francisco sob salinidade.

Esses resultados fornecem dados valiosos para o entendimento da tolerância ao estresse salino em arroz, tanto pela identificação de vias de defesa responsivas à salinidade, quanto pela elucidação de potenciais candidatos para estudos de melhoramento genético nessa cultura, que é tão importante do ponto de vista socioeconômico.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, M. E.; ABDELSATTAR, M.; ABDELDAYM, E. A.; ATIA, M. A. M.; MAHMOUD, A. W. M.; SAAD, M. M.; HIRT, H. *Piriformospora indica* alters Na⁺/K⁺ homeostasis, antioxidant enzymes and LeNHX1 expression of greenhouse tomato grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 256, 2019.
- ACOSTA-MOTOS, J. R.; ORTUÑO, M. F.; BERNAL-VICENTE, A.; DIAZ-VIVANCOS, P. SANCHEZ-BLACO, M. J., HERNANDEZ, J. A. Plant responses to salt Stress: Adaptive mechanisms. **Agronomy**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 18, 2017.
- AHMAD, R.; HUSSAIN, S.; ANJUM, M. A.; KHALID, M. F.; SAQIB, M.; ZAKIR, I.; HASSAN, A. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in plants under salt stress. In: **Plant Abiotic Stress Tolerance**, p. 191–205, 2019.
- ALEMAN, F.; NIEVES-CORDONES, M.; MARTINEZ, V.; RUBIO, F. Root K⁺ Acquisition in Plants: The Arabidopsis thaliana Model. **Plant Cell Physiology**, [s.l.], v. 52, p. 1603–1612, 2011.
- ALMEIDA, D. M.; OLIVEIRA, M. M; SAIBO, N. J. M (2017) Regulation of Na and K homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 40, p. 326–345, 2017.
- ALQAHTANI, M.; ROY, S. J.; TESTER, M.; Increasing salinity tolerance of crops effects of salt stress on plant growth. R. A. In: **Encyclopedia of Sustainability Science and Technology**, Meyers (ed.), 2019.
- ARAÚJO, G. S.; MIRANDA, R. S.; MESQUITA, R. O.; PAULA, S. O.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Nitrogen assimilation pathways and ionic homeostasis are crucial for photosynthetic apparatus efficiency in salt-tolerant sunflower genotypes. **Plant Growth Regulation**, Cham: Springer, v. 86, p. 375-388, 2018.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 24, p. 1–15, 1949.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Photosynthesis under stressful environments: An overview **Photosynthetica**, [s.l.], v. 51, p. 163-190, 2013. ASHRAF, M. A.; RAHMAN, A. Cold stress response in *Arabidopsis thaliana* is mediated by GNOM ARF-GEF. **Plant Journal**, [s.l.], v. 97, p. 500–516, 2019.
- ASSAHA, D. V. M.; UEDA, A.; SANEOKA, H.; AL-YAHYAI, R.; YAISH, M. W. The role of Na⁺ and K⁺ transporters in salt stress adaptation in glycophytes. **Frontiers in Physiology**, [s.l.], v. 8, p. 509, 2017.
- BAETZ, U.; EISENACH, C.; TOHGE, T.; MARTINOIA, E.; DE ANGELI, A. Vacuolar chloride fluxes impact ion content and distribution during early salinity stress. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 172, p. 1167–1181, 2016.
- BAGHOUR M.; GÁLVEZ F. J.; SÁNCHEZ, M. E.; ARANDA, M. N.; VENEMA, K.; RODRIGUEZ-ROSALES, M. Overexpression of LeNHX2 and SISOS2 increases salt

tolerance and fruit production in double transgenic tomato plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 135, p. 77–86, 2019.

BASSIL, E. et al. The Arabidopsis intracellular Na⁺/H⁺ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. **Plant Cell**, [s.l.], v. 23, p. 224–239, 2011

BASSIL, E.; COKU, A.; BLUMWALD, E. Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na⁺/H⁺ antiporters in plant growth and development. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 63, p. 5727–5740, 2012.

BASSINELLO, P. Z.; CASTRO, E. M. Arroz como alimento. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n. 222, p. 101-108, 2004.

BAZIHIZINA, N.; COLMER, T. D.; CUIN, T. A.; MANCUSO, S.; SHABALA, S. Friend or Foe? Chloride patterning in Halophytes. **Trends in Plant Science**, [s.l.], v. 24, p. 142–151, 2019.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 44, p. 276-287, 1971.

BEJAOUI, F. et al. Changes in chloroplast lipid contents and chloroplast ultrastructure in *Sulla carnosa* and *Sulla coronaria* leaves under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, Munich, v. 198, p. 32-38, 2016.

BEN YAHMED, J. et al. Salt tolerance traits revealed in mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) are mainly related to root-to-shoot Cl⁻ translocation limitation and leaf detoxification processes. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 191, p. 90–100, 2015.

BERNSTEIN, N. Plants and salt: Plant response and adaptations to salinity, Model Ecosystems in Extreme Environments. Elsevier Inc, 2019.

BERTAZZINI, M.; SACCHI, G. A.; FORLANI, G. A differential tolerance to mild salt stress conditions among six Italian rice genotypes does not rely on Na⁺ exclusion from shoots. **Journal of Plant Physiology**, Munich, v. 226, p. 145–153, 2018.

BOSE, J.; RODRIGO-MORENO, A.; SHABALA, S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.] v. 65, p. 1241–1257, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Cambridge, v. 72, p. 246-254, 1976.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and molecular biology of plants. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015, 1264p.

CABELLO, J. V.; LODEYRO A. F.; ZURBRIGGEN, M. D. Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 26, p. 62–70, 2014.

CARILLO, P.; WOODROW, P.; RAIMONDI, G.; EL-NAKHEL, C.; PANNICO, A.; KYRIACOU, M. C. Omeprazole promotes chloride exclusion and induces salt tolerance in greenhouse basil. **Agronomy**, [s.l.], v. 9, p. 355, 2019.

CEITA, E. D. R.; MAGALHÃES, C. L.; SALES, J. R. S.; FREIRE, M. H. C.; SOUSA, G. G. Influência do estresse salino em quatro cultivares de Fava. In: II Congresso Internacional Das Ciências Agrárias Cointer- PDVAgro, 2017, p 1–8.

ÇELIK, Ö.; MERİÇ, S.; AYAN, A.; ATAK, Ç. Epigenetic analysis of WRKY transcription factor genes in salt stressed rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 159, p. 121–131, 2019.

CHAKRABORTY K, et al. Ionic selectivity and coordinated transport of Na⁺ and K⁺ in flag leaves render differential salt tolerance in rice at the reproductive stage. **Planta**, [s.l.], v. 250, p. 1637–1653, 2019.

CHAKRABORTY, K.; BISHI, S. K.; GOSWAMI, N.; SINGH, A. L.; ZALA, P. V. Differential fine-regulation of enzyme driven ROS detoxification network imparts salt tolerance in contrasting peanut genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 128, p. 79–90, 2016.

CHANG, J.; CHEONG, B.E.; NATERA, S.; ROESSNER, U. Morphological and metabolic responses to salt stress of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars which differ in salinity tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 144, p. 427–435, 2019.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J-K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, [s.l.], v. 45, p. 437-448, 2005.

CHUNTHABUREE, S.; DONGSANSUK, A.; SANITCHON, J.; PATTANAGUL, W.; THEERAKULPISUT, P.; Physiological and biochemical parameters for evaluation and clustering of rice cultivars differing in salt tolerance at seedling stage. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s.l.], v. 23, n. 4, p. 467-477, 2016.

CHUTIMANUKUL, P. et al. Photosynthetic responses and identification of salt tolerance genes in a chromosome segment substitution line of ‘Khao dawk Mali 105’ rice. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 155, p. 497–508, 2018.

CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal Agriculture Food Chemistry**, [s.l.], v. 23, p. 458-460, 1975.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2018/2019. **Décimo segundo levantamento**, Brasília. v. 6, p. 1–126, 2019.

CUIN, T. A, et al Assessing the role of root plasma membrane and tonoplast Na⁺/H⁺ exchangers in salinity tolerance in wheat: In planta quantification methods. **Plant, Cell and Environment**, [s.l.], v. 34, p. 947–961, 2011.

DEINLEIN, U.; STEPHAN, A. B.; HORIE, T.; LUO, W.; XU, G.; SCHROEDER, J. I. Plant salt-tolerance mechanisms- Review. **Trends in Plant Science**, [s.l.], v. 19, p. 371-379, 2014.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 109, p. 212–228, 2015.

DÍAZ-LÓPEZ, L.; GIMENO, V.; LIDÓN, V.; SIMÓN, I.; MARTÍNEZ, V.; GARCÍA-SÁNCHEZ, F. The tolerance of *Jatropha curcas* seedlings to NaCl: an ecophysiological analysis. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 54, p. 34-42, 2012.

DU, Q. et al Effects of potassium deficiency on photosynthesis, chloroplast ultrastructure, ROS, and antioxidant activities in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Integrative Agriculture**, [s.l.], v. 18, p. 395–406, 2019.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 28, p. 350-356, 1956.

EL-MEIHY, R. M.; ABOU-ALY, H. E.; YOUSSEF, A. M.; TEWFIKE, T. A.; EL-ALKSHAR, E. A. Efficiency of heavy metals-tolerant plant growth promoting bacteria for alleviating heavy metals toxicity on sorghum. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 162, p. 295–301, 2019.

ELSAWY, H. I. A.; MEKAWY, A. M. M.; ELHITY, M. A.; ABDEL-DAYEM, S. M.; ABDELAZIZ, M. N.; ASSAHA, D. V. M.; UEDA, A.; SANEOKA, H. Differential responses of two Egyptian barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 127, p. 425–435, 2018.

ELSHEERY, N. I.; HELALY, M. N.; OMAR, S. A.; JOHN, S. V. S.; ZABOCHNICKA-SWIĄTEK, M.; KALAJI, H. M.; RASTOGI, A. Physiological and molecular mechanisms of salinity tolerance in grafted cucumber. **South African Journal of Botany**, [s.l.], v. 130, p. 90–102, 2020.

FAN, G.; WANG, L.; DENG, M.; ZHAO, Z.; DONG, Y.; ZHANG, X.; LI, Y. Changes in transcript related to osmosis and intracellular ion homeostasis in *Paulownia tomentosa* under salt stress. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 7, p. 1–13, 2016.

FAO - Food and Agriculture Organization. FAOSTAT. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 02 de jan de 2020.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Status of the World's Soil Resources**. 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/documents/card/en>>. Acesso em: 09 de dezembro de 2019.

FAROOQ, M.; GOGOI, N.; HUSSAIN, M.; BARTHAKUR, S.; PAUL, S.; BHARADWAJ, N.; MIGDADI, H. M.; ALGHAMDI, S. S.; SIDDIQUE, K. H. M. Effects, tolerance mechanisms and management of salt stress in grain legumes. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 118, p.199–217, 2017.

FOYER C. H.; HALLIWELL B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**, [s.l.], v. 133, p. 21–25, 1976.

FREITAS, P. A. F.; CARVALHO, H. H.; COSTA, J. H.; MIRANDA, R. S.; SARAIVA, K. D. C.; OLIVEIRA, F. D. B.; COELHO, D. G.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Salt acclimation in sorghum plants by exogenous proline: physiological and biochemical changes and regulation of proline metabolism. **Plant Cell Reports**, [s.l.], v. 38, p. 403–416, 2019.

FRUKH, A.; SIDDIQI, T. O.; KHAN, M. I. R.; AHMAD, A. Modulation in growth, biochemical attributes and proteome profile of rice cultivars under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 146, p. 55–70, 2020.

FU, L. et al. Metabolite profiling and gene expression of Na/K transporter analyses reveal mechanisms of the difference in salt tolerance between barley and rice. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 130, p. 248–257, 2018.

GADELHA, C. G.; MIRANDA, R. S.; ALENCAR, N. L. M.; COSTA, J. H.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Exogenous nitric oxide improves salt tolerance during establishment of *Jatropha curcas* seedlings by ameliorating oxidative damage and toxic ion accumulation. **Journal of Plant Physiology**, Munich, v. 212, p. 69–79, 2017.

GAINES, T. P.; PARKER, M.B.; GASCHO, G.J. Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate extraction. **Agronomy Journal**, [s.l.], v. 76, p. 371-374, 1984.

GALLIE, D.R. The role of l-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 64, p. 433-443, 2013.

GERONA, M. E. B.; DEOCAMPO, M. P.; EGDANE, J. A. ISMAIL, A. M. DIONISIO-SESE, M. L. Physiological responses of contrasting rice genotypes to salt stress at reproductive stage. **Rice Science**, [s.l.], v. 26, p. 207–219, 2019.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 59, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S.; ANJUM, N. A.; HASANUZZAMAN, M.; GILL, R.; TRIVEDI, D. K.; AHMAD, I.; PEREIRA, E.; TUTEJA, N. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 70, p. 204-212, 2013.

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

GOMES DO Ó, L. M.; SILVA, T. C.; SOUSA, G. G.; SARAIVA, K. R.; SOUZA, M. V. P. Crescimento e solutos orgânicos do Feijão-Caupi submetido a níveis de salinidade da água de irrigação. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 11, p. 1934–1944, 2017.

GOUSSI, R.; MANAA, A.; DERBALI, W.; CANTAMESSA, S.; ABDELLY, C.; BARBATO, R. Comparative analysis of salt stress, duration and intensity, on the chloroplast ultrastructure and photosynthetic apparatus in *Thellungiella salsuginea*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, p. 275–287, 2018.

GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, Cambridge, v. 106, p. 207-212, 1980.

GUPTA, P.; YADAV, C.; SINGLA-PAREEK, S. L.; PAREEK, A. Recent advancements in developing salinity tolerant rice, advances in rice research for abiotic stress tolerance. Elsevier Inc. 2018.

HAMDANI S, YAAKOUBI H, CARPENTIER R Polyamines interaction with thylakoid proteins during stress. **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104, p. 314–9, 2011.

HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M. H. M. B.; ANEE, T. I. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. **Antioxidants**, v. 8, 2019.

HASEGAWA, P. M. Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v.92, p.19-31, 2013.

HAVIR, E.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalases in tobacco leaves. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 84, p. 450-455, 1987.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 125, p. 189-198, 1968.

HENDERSON, S. W.; BAUMANN, U.; BLACKMORE, D. H.; WALKER, A. R.; WALKER, R. R.; GILLIHAM, M. Shoot chloride exclusion and salt tolerance in grapevine is associated with differential ion transporter expression in roots. **BMC Plant Biology**, [s.l.], v. 14, p. 273, 2014.

HERNÁNDEZ, J. A. Salinity tolerance in plants : trends and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, p. 2408, 2019.

HINOJOSA, L.; MATANGUIHAN, J. B.; MURPHY, K. M. Effect of high temperature on pollen morphology, plant growth and seed yield in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Journal of Agronomy and Crop Science**, [s.l.], v. 205, p. 33–45. 2019.

HODGE, J. E.; HOFREITER, B. R. Determination of reducing sugars and carbohydrates. In: WILSTER, R.L.; WOLFROM, M.L. (eds.). **Methods in carbohydrates chemistry**. New York: Academic Press, v.1, p.380-394, 1962.

HOSSAIN, M. S.; DIETZ, K. -J. Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 7, 2016.

HUANG, Y. et al. Overexpression of the *Suaeda salsa* SsNHX1 gene confers enhanced salt and drought tolerance to transgenic *Zea mays*. **Journal of Integrative Agriculture**, [s.l.], v. 17, p. 2612–2623, 2018.

ISLAM, F. Rice Responses and Tolerance to Salt Stress: Deciphering the Physiological and Molecular Mechanisms of Salinity Adaptation. Elsevier Inc. 2018.

ISLAM, M. O.; KATO, H.; SHIMA, S.; TEZUKA, D.; MATSUI, H.; IMAI, R. Functional identification of a rice trehalase gene involved in salt stress tolerance. **Gene**, [s.l.], v. 685, p. 42–49, 2019.

IVANOVA, K.; GENEVA, M.; ANEV, S.; GEORGIEVA, T.; TZVETKOVA, N.; STANCHEVA, I.; MARKOVSKA, Y. Effect of soil salinity on morphology and gas exchange of two Paulownia hybrids. **Agroforestry Systems**, [s.l.], v. 93, p. 929–935, 2019.

- KANDULA, V., PUDUTHA, A., KUMARI, P.H., KUMAR, S.A., KAVI KISHOR, P.B., ANUPALLI, R.R., Overexpression of Sorghum plasma membrane-bound Na⁺/H⁺ antiporter-like protein (*SbNHXLP*) enhances salt tolerance in transgenic groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s.l.], v. 138, p. 325–337, 2019.
- KAPOOR, D.; SHARMA, R.; HANDA, N.; KAUR, H.; RATTAN, A.; YADAV, P. Redox homeostasis in plants under abiotic stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols. **Frontiers in Environmental Science**, [s.l.], v. 3, 13, 2015.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 57, p. 315–319, 1976.
- KARVANSARA, P. R.; RAZAVI, S. M. Physiological and biochemical responses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) to ultraviolet-B radiation. **PeerJ**, [s.l.], v. 7, 2019.
- KATSCHNIG, D.; BLIEK, T.; ROZEMA, J.; SCHAT, H. Constitutive high-level *SOS1* expression and absence of *HKT1;1* expression in the salt-accumulating halophyte *Salicornia dolichostachya*. **Plant Science**, Shannon, v. 234, p. 144–154, 2015.
- KEISHAM, M.; MUKHERJEE, S.; BHATLA, S. C. Mechanisms of sodium transport in plants- Progresses and challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.] v. 19, 2018.
- KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 452p.
- KHALID, M. F.; HUSSAIN, S.; ANJUM, M. A.; AHMAD, S.; ALI, M. A.; EJAZ, S.; MORILLON, R. Better salinity tolerance in tetraploid vs diploid volkamer lemon seedlings is associated with robust antioxidant and osmotic adjustment mechanisms. **Journal of Plant Physiology**, Munich, v. 244, 2020.
- KHAN, M. S.; AHMAD, D.; KHAN, M. A. Trends in genetic engineering of plants with (Na⁺/H⁺) antiporters for salt stress tolerance. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s.l.], v. 29, p. 815–825, 2015.
- KIBRIA, M. G.; HOSSAIN, M.; MURATA, Y.; HOQUE, A. Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. **Rice Science**, [s.l.], v. 24, p. 155–162, 2017.
- KIM, T. -H.; BÖHMER, M.; HU, H.; NISHIMURA, N.; SCHROEDER, J. I. Guard cell signal transduction network advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. **Annual Review of Plant Biology**, [s.l.], v. 61, p. 561–591, 2010.
- KOTULA, L.; CLODE, P. L.; LA, J. D.; JIMENEZ, C.; COLMER, T. D. Salinity tolerance in chickpea is associated with the ability to ‘exclude’ Na from leaf mesophyll cells. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 70, n. 18, p. 4991–5002, 2019.
- KRISHNAMURTHY, P.; VISHAL, B.; KHOO, K.; RAJAPPA, S.; LOH, C. -S.; KUMAR, P. P. Expression of AoNHX1 increases salt tolerance of rice and Arabidopsis, and bHLH transcription factors regulate AtNHX1 and AtNHX6 in Arabidopsis. **Plant Cell Reports**, [s.l.], v. 38, p. 1299–1315, 2019.

- KROMDIJK, J.; LONG, S. P. One crop breeding cycle from starvation? How engineering crop photosynthesis for rising CO₂ and temperature could be one important route to alleviation. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 283, p. 1-24, 2016.
- LAMY, C. M.; CHATTON, J. Y. Optical probing of sodium dynamics in neurons and astrocytes. **NeuroImage**, [s.l.], v. 58, p. 572–578, 2011.
- LAW, M.Y.; CHARLES, S.A.; HALLIWELL, B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of peroxide hydrogen and paraquat. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 210, p. 899-903, 1983.
- LI, M.; ZHANG, K.; SUN, Y.; CUI, H.; CAO, S.; YAN, L.; XU, M. Growth, physiology, and transcriptional analysis of two contrasting *Carex rigescens* genotypes under salt stress reveals salt-tolerance mechanisms. **Journal of Plant Physiology**, Munich, v. 229, p. 77–88, 2018.
- LIN, H.; YANG, Y.; QUAN, R.; MENDONZA, I.; WU, Y.; DU, W.; ZHAO, S.; SCHUMAKER, K. S.; PARDO, J. M.; GUO, Y. Phosphorylation of SOS3-like calcium binding protein8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Waterbury, v.21, p.1607-1619, 2009.
- LIU, J.; SHABALA, S.; SHABALA, L.; ZHOU, M.; MEINKE, H.; VENKATARAMAN, G.; CHEN, Z.; ZENG, F.; ZHAO, Q. Tissue-specific regulation of Na⁺ and K⁺ transporters explains genotypic differences in salinity stress tolerance in rice. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 10, p. 1361, 2019.
- LIU, Y.; WANG, B.; LI, J.; SONG, Z.; LU, B.; CHI, M.; YANG, B.; LIU, J.; LAM, Y.-W.; LI, J.; XU, D. Salt-response analysis in two rice cultivars at seedling stage. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s.l.], v. 39, 2017.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) method. **Methods**, [s.l.], v. 25, p. 402-408, 2001.
- LODEYRO, A. F.; CARRILLO, N. Salt Stress in Higher Plants: Mechanisms of Toxicity and Defensive Responses. In: TRIPATHI, B. N.; MULLER, M. (Eds). **Stress Responses in Plants**. Suíça: Springer, 2015. p 1-33.
- MA, N. L.; CHE LAH, W. A.; KADIR, N. A.; MUSTAQIM, M.; RAHMAT, Z.; AHMAD, A.; LAM, S. D.; ISMAIL, M. R. Susceptibility and tolerance of rice crop to salt threat: Physiological and metabolic inspections. **PLoS One**, [s.l.], v. 13, p. 1–17, 2018.
- MAATHUIS, F. J. M.; AHMAD, I.; PATISHTAN, J. Regulation of Na⁺ fluxes in plants. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 5, p. 467, 2014.
- MAHLOOJI, M.; SEYED SHARIFI, R.; RAZMJOO, J.; SABZALIAN, M. R. SEDGHI, M. Effect of salt stress on photosynthesis and physiological parameters of three contrasting barley genotypes. **Photosynthetica**, [s.l.], v. 56, p.549–556, 2018.
- MAHMOOD, S.; DAUR, I.; AL-SOLAIMANI, S. G.; AHMAD, S.; MADKOUR, M. H.; YASIR, M.; HIRT, H.; ALI, S.; ALI, Z.; Plant growth promoting Rhizobacteria and silicon

synergistically enhance salinity tolerance of Mung Bean. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 7, p. 876, 2016.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba, SP: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1989.

MANCARELLA S. et al. Leaf sodium accumulation facilitates salt stress adaptation and preserves photosystem functionality in salt stressed *Ocimum basilicum*. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 130, p. 162–173, 2016.

MANTRI N. et al. Abiotic stress responses in plants: Present and future. In: AHMAD, P.; PRASAD, M. N. V. **Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability**. New York: Springer: 1–19, 2012.

MARRIBOINA, S.; SENGUPTA, D.; KUMAR, S.; REDDY, A. R. Physiological and molecular insights into the high salinity tolerance of *Pongamia pinnata* (L.) pierre, a potential biofuel tree species. **Plant Science**, Shannon, v. 258, p. 102–111, 2017.

MEDEIROS, C. D.; FERREIRA NETO, J. R. C.; OLIVEIRA, M. T.; RIVAS, R.; PANDOLFI, V.; KIDO, É. A.; BALDANI, J. I.; SANTOS, M. G. Photosynthesis, antioxidant activities and transcriptional responses in two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars under salt stress. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 36, p. 447–459, 2013.

MIRANDA, R. S.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J. T.; ALVAREZ-PIZARRO, J. C. Ammonium improves tolerance to salinity stress in *Sorghum bicolor* plants. **Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 78, p. 121-131, 2016.

MIRANDA, R. S.; MESQUITA, R. O.; COSTA, J. H.; ALVAREZ-PIZARRO, J. C.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Integrative control between proton pumps and SOS1 antiporters in roots is crucial for maintaining low Na⁺ accumulation and salt tolerance in ammonium-supplied *Sorghum bicolor*. **Plant and Cell Physiology**, [s.l.], v. 58, p. 522-536, 2017.

MIRDAR MANSURI, R.; SHOBBAR, Z. S.; BABAEIAN JELODAR, N.; GHAFARI, M. R.; NEMATZADEH, G. A.; ASARI, S. Dissecting molecular mechanisms underlying salt tolerance in rice: a comparative transcriptional profiling of the contrasting genotypes. **Rice**, [s.l.], v. 12, 2019.

MUCHATE, N. S.; NIKALJE, G. C.; RAJURKAR, N. S.; SUPRASANNA, P.; NIKAM, T.D.; Plant Salt Stress: Adaptive Responses, Tolerance Mechanism and Bioengineering for Salt Tolerance. **Botanical Review**. [s.l.], v. 82, p. 371–406, 2016.

MUSHKE, R.; YARRA, R.; KIRTI, P. B. Improved salinity tolerance and growth performance in transgenic sunflower plants via ectopic expression of a wheat antiporter gene (TaNHX2). **Molecular Biology Reports**, [s.l.], v. 46, p. 5941-5953, 2019.

MUTHAYYA, S.; SUGIMOTO, J. D.; MONTGOMERY, S.; MABERLY, G. F. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1324, n.1, 7- 14, 2014.

NAJAR, R.; AYDI, S.; SASSI-AYDI, S.; ZARAI, A.; ABDELLEY, C. Effect of salt stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Medicago truncatula*. **Plants Biosystems- An international Journal dealing with all aspects of plant biology**, [s.l.], v. 153, n. 1, p. 88-97, 2019.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, [s.l.], v. 22, p. 867-880, 1981.

NASCIMENTO, H. H. C.; SANTOS, C. A.; FREIRE, C. A.; SILVA, M. A.; NOGUEIRA, R. J. M. C. Ajustamento osmótico em mudas de Jatobá submetidas à salinidade em meio hidropônico. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, p. 641–653, 2015.

NATH, M.; BHATT, D.; JAIN, A.; SAXENA, S. C.; SAIFI, S. K.; YADAV, S.; NEGI, M.; PRASAD, R.; TUTEJA, N. Salt stress triggers augmented levels of Na^+ , Ca^{2+} and ROS and alter stress-responsive gene expression in roots of CBL9 and CIPK23 knockout mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 161, p. 265–276, 2019.

NATH, M.; BHATT, D.; PRASAD, R.; GILL, S. S.; ANJUM, N. A.; TETEJA, N. Reactive oxygen species generation-scavenging and signaling during plant- arbuscular mycorrhizal and *Piriformospora indica* interaction under stress condition. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 7, p. 1574, 2016.

NEGRÃO, S.; SCHMÖCKEL, S. M.; TESTER, M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. **Annal of Botany**, Oxford, v. 119, p. 1–11, 2017.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 171, p. 1581–1592, 2016.

NOCTOR, G.; LELARGE-TROUVERIE, C.; MHAMDI, A. The metabolomics of oxidative stress. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 112, p. 33–53, 2015.

NOWICKA, B.; CIURA, J.; SZYMAŃSKA, R.; KRUK, J. Improving photosynthesis, plant productivity and abiotic stress tolerance – current trends and future perspectives. **Journal of Plant Physiology**, Munich, v. 231, p. 415-433, 2018.

ORLOVA, Y. V.; SERGIENKO, O. V.; KHALILOVA, L. A.; VORONKOV, A. S.; FOMENKOV, A. A.; NOSOV, A. V.; POPOVA, L. G.; SHUVALOV, A. V.; RYABOVA, A. V.; BALNOKIN, Y. V. Sodium transport by endocytic vesicles in cultured *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant**, [s.l.], v. 55, p. 359–370, 2019.

PAN, Y.-Q.; GUO, H.; WANG, S.-M.; ZHAO, B.; ZHANG, J. -L.; MA, Q.; YIN, H. -J.; BAO, A. -K. The photosynthesis, Na^+/K^+ homeostasis and osmotic adjustment of *Atriplex canescens* in response to salinity. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v.7, p. 1–14, 2016.

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

- PARIDA, A.K.; DAS, A.B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 60, p. 324-349, 2005.
- PASSRICHA, N.; SAIFI, S. K.; KHARB, P.; TUTEJA, N. Marker-free transgenic rice plant overexpressing pea LecRLK imparts salinity tolerance by inhibiting sodium accumulation. **Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 99, p. 265–281, 2019.
- PLAUT, Z.; EDELSTEIN, M.; BEN-HUR, M. Overcoming salinity barriers to crop production using traditional methods. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s.l.], v. 32, p. 250-291, 2013.
- PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E.; MIRANDA, R. S. Physiology and biochemistry of plants growing under salt stress. In: Prisco, J. T. Gomes-Filho, E; Miranda, R. S. (Org.). **Manejo da salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. 2ed. Fortaleza: INCTSal, 2016, v. 1, p. 163-180.
- QU, C.; LIU, C.; GONG, X.; LI, C.; HONG, M.; WANG, L.; HONG, F. Impairment of maize seedling photosynthesis caused by a combination of potassium deficiency and salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 75, p. 134-141, 2012.
- RADANIELSON, A. M.; ANGELES, O.; LI, T.; ISMAIL, A. M.; GAYDON, D. S. Describing the physiological responses of different rice genotypes to salt stress using sigmoid and piecewise linear functions. **Field Crops Research**, [s.l.], v. 220, p. 46–56, 2018.
- RAZZAQUE, S.; ELIAS, S. M.; HAQUE, T.; BISWAS, S.; JEWEL, G. M. N. A.; RAHMAN, S.; WENG, X.; ISMAIL, A. M.; WALIA, H.; JUENGER, T. E.; SERAJ, Z. I. Gene Expression analysis associated with salt stress in a reciprocally crossed rice population. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, p. 1–17, 2019.
- REDWAN, M.; SPINELLI, F.; MANCUSO, S. Role of ion transporters in salinity resistance in plants. **Environment Control in Biology**, [s.l.], v. 54, p. 1–6, 2016.
- RIAZ, M.; ARIF, M. S.; ASHRAF, M. A.; MAHMOOD, R.; YASMEEN, T.; SHAKOOR, M. B.; SHAHZAD, S. M.; ALI, M.; SALEEM, I.; ARIF, M.; FAHAD, S. A Comprehensive review on rice responses and tolerance to salt stress. **Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance**. Elsevier Inc. 2019.
- RICHTER, J. A.; ERBAN, A.; KOPKA, J.; ZÖRB, C. Metabolic contribution to salt stress in two maize hybrids with contrasting resistance. **Plant Science**, Shannon, v. 233, p. 107–115, 2015.
- RODER, P.; HILLE, C. ANG-2 for quantitative Na⁺ determination in living cells by time-resolved fluorescence microscopy. **Photochemical and Photobiological Sciences**, [s.l.], v. 13: 1699–1710, 2014.
- ROY, S.; CHAKRABORTY, U. Role of sodium ion transporters and osmotic adjustments in stress alleviation of *Cynodon dactylon* under NaCl treatment : a parallel investigation with rice. **Protoplasma**, [s.l.], v. 255, p.175–191, 2018.
- SERGIEV, I.; ALEXIEVA, V.; KARANOV, E. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. **Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences**, [s.l.], v. 51, p. 121-124, 1997.

SHABALA, S. Learning from halophytes: Physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. **Annals of Botany**, [s.l.], v. 112, p.1209–1221, 2013.

SHAFI, A., PAL, A. K.; SHARMA, V.; KALIA, S.; KUMAR, S.; AHUJA, P. S.; SINGH, A. K. Transgenic potato plants overexpressing SOD and APX exhibit enhanced lignification and starch biosynthesis with improved salt stress tolerance. **Plant Molecular Biology Reporter**. [s.l.], v. 35, p. 504-518, 2017.

SHAHZAD, B.; FAHAD, S.; TANVEER, M.; SAUD, S.; KHAN, I. A. Plant responses and tolerance to salt stress. In: MIRZA, H.; KAMRUN, N.; MASAYUKI, F.; HIROSUKE, O.; ISLAM, T. M. (org.). **Approaches Enhancing Abiotic Stress Tolerance Plants**. 2019. p. 61–78.

SHARMA, A.; SHARMA, S. C. The importance of antioxidants and plasma membrane ion transporters which play role in cellular response against salt induced oxidative stress. **Ecological Genetics and Genomics**, [s.l.], v. 9, p. 16–22, 2018.

SHARMA, P.; SHARMA, P.; ARORA, P.; VERMA, V.; KHANNAL, K.; SAINI, P.; BHARDWAJ, R. Role and regulation of ROS and antioxidants as signaling molecules in response to abiotic stresses. In: **Plant Signaling Molecules: role and regulation under stressful environments**. [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. p 141-156.

SHINOZAKI, K.; UEMURA, M.; BAILEY-SERRES, J.; BRAY, E. A.; WERETILNYK, E. Responses to Abiotic Stress. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Org.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. 2nd ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015, p.1051-1100.

SILVA, M. M. B, et al. Anatomy of leaf and stem of *Erythrina velutina*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 23, p. 200–206, 2013.

SILVA, B. N.; PAULA, S. O.; OLIVEIRA, J. V.; SILVA, J. S.; MAGALHÃES, C. H. C.; GOMES-FILHO, E.; MESQUITA, R. O. Traditional varieties of Caupi submitted to water deficit: Physiological and biochemical aspects. **Journal of Agricultural Science**, [s.l.], v. 11, p. 424- 436, 2019.

SILVA, E. N.; VIEIRA, S. A.; RIBEIRO, R. V.; PONTE, L. F. A.; FERREIRA-SILVA, S. L.; SILVEIRA, J. A. G. Contrasting physiological responses of *Jatropha curcas* plants to single and combined stresses of salinity and heat. **Journal of Plant Growth Regulation**, [s.l.], v. 32, p. 159–169, 2013.

SILVA, M. L. S.; SOUSA, H. G.; SILVA, M. L. S.; LACERDA, C. F.; GOMES-FILHO, E. Growth and photosynthetic parameters of saccharine sorghum plants subjected to salinity. **Acta Scientiarum-Agronomy**, [s.l.], v. 41, p. 1–9, 2019.

SINGH, D.; SINGH, B.; MISHRA, S.; SINGH, A. K.; SINGH, N. K. Candidate gene based association analysis of salt tolerance in traditional and improved varieties of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 28, p. 76–83, 2019.

SINGH, M.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, [s.l.], v. 14, p. 407–426, 2015.

SINGH, M.; SINGH, A.; MOHAN, S.; RAJIV, P.; SINGH, K. Regulation of plants metabolism in response to salt stress: an omics approach, **Acta Physiologiae Plantarum**, [s.l.], v. 39, 2017.

SOSBAI – Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil**. Farrroupilha: SOSBAI, 2018.

SOUSA, V. F. D. O.; COSTA, C. C.; DINIZ, G. L.; SANTOS, J. B.; BOMFIM, M. P.; LOPES, K. P. Growth and gas changes of melon seedlings submitted to water salinity. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, Campina Grande, v. 23, n.2, p. 90-96, 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5a ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TANG, Y. Y.; YUAN, Y. H.; SHU, S.; GUO, S. R. Regulatory mechanism of NaCl stress on photosynthesis and antioxidant capacity mediated by transglutaminase in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings, **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 235, p.294–306, 2018.

TERRA, T. G. R.; LEAL, T. C. A. B.; BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. Tolerância de linhagens de arroz de terras altas à seca. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [s.l.], v. 43, n.2, p. 201-208, 2013.

TIMME-LARAGY, A. R.; GOLDSTONE, J. V.; IMHOFF, B. R.; STEGEMAN, J. J.; HAHN, M. E.; HANSEN, J. M. Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo. **Free radical biology & medicine**, [s.l.], v. 65, p. 89–101, 2013.

TSAI, Y. C.; CHEN, K. C.; CHENG, T. S.; LEE, C.; LIN, S. H.; TUNG, C. W. Chlorophyll fluorescence analysis in diverse rice varieties reveals the positive correlation between the seedlings salt tolerance and photosynthetic efficiency. **BMC Plant Biology**, [s.l.], v. 19, p. 403, 2019.

TURKAN, I.; DEMIRAL, T. Recent developments in understanding salinity tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v.67, p.2-9, 2009.

VAN BEZOUW, R. F. H. M.; JANSSEN, E. M.; ASHRAFUZZAMAN, M.; GHAHRAMANZADEH, R.; KILIAN, B.; GRANER, A.; VISSER, R. G. F.; VAN DER LINDEN, C. G. Shoot sodium exclusion in salt stressed barley (*Hordeum vulgare* L.) is determined by allele specific increased expression of HKT1;5. **Journal of Plant Physiology**, Munich, v. 241, 2019.

WANG, H.; WANG, H.; SHAO, H.; TANG, X. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 7, p. 1–13, 2016.

WANG, J.; QIU, N.; WANG, P.; ZHANG, W.; YANG, X.; CHEN, M.; WANG, B.; SUN, J. Na⁺ compartmentation strategy of Chinese cabbage in response to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.140, p.151–157, 2019.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 144, p. 307-314, 1994.

- WU, H. Plant salt tolerance and Na⁺ sensing and transport. **The Crop Journal**, [s.l.], v. 6, p. 215–225, 2018.
- WU, H.; LI, Z. The importance of Cl⁻ exclusion and vacuolar Cl⁻ sequestration: revisiting the role of Cl⁻ transport in plant salt tolerance. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 10, p. 1418, 2019.
- WU, H.; SHABALA, L.; ZHOU, M.; SU, N.; WU, Q.; UL-HAQ, T.; ZHU, J.; MANCUSO, S.; AZZARELLO, E.; SHABALA, S. Root vacuolar Na⁺ sequestration but not exclusion from uptake correlates with barley salt tolerance. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 100, p. 55–67, 2019.
- XU, J.; HUANG, X.; LAN, H.; ZHANG, H.; HUANG, J. Rearrangement of nitrogen metabolism in rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress. **Plant Signaling and Behavior**, [s.l.], v. 11, p. 1–4, 2016.
- YADAV, S.; IRFAN, M.; AHMAD, A.; HAYAT, S. Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. **Journal of Environmental Biology**, [s.l.], v. 32, p. 667–685, 2011.
- YAMAGUCHI, T.; AHARON, G. S.; SOTTOSANTO, J. B.; BLUMWALD, E. Vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter cation selectivity is regulated by calmodulin from within the vacuole in a Ca²⁺ and pH-dependent manner. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 102, p. 16107–16112, 2005.
- YAMAGUCHI, T.; HAMAMOTO, S.; UOZUMI, N. Sodium transport system in plant cells. **Frontiers in Plant Science**, [s.l.], v. 4, 401 p. 1–7, 2013.
- YAMANE, K.; MITSUYA, S.; TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H. Salt-induced chloroplast protrusion is the process of exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase from chloroplasts into cytoplasm in leaves of rice. **Plant, Cell and Environment**, [s.l.], v. 35, p. 1663–1671, 2012.
- YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of aminoacids with ninhydrin. **Analyst**, [s.l.], v. 80, p. 209–213, 1955.
- YOO, C. Y.; PENCE, H. E.; HASEGAWA, P. M.; MICKELBART, M.V. Regulation of transpiration to improve crop water use. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s.l.], v. 28, p. 410–431, 2009.
- ZHANG, Y.; FANG, J.; WU, X.; DONG, L. Na⁺/K⁺ Balance and Transport Regulatory Mechanisms in Weedy and Cultivated Rice (*Oryza sativa* L.) Under Salt Stress. **BMC Plant Biology**, [s.l.], v. 18, p. 375, 2018.
- ZHANG, Y.; KAISER, E.; ZHANG, Y.; YANG, Q.; LI, T. Short-term salt stress strongly affects dynamic photosynthesis, but not steady-state photosynthesis, in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 149, p. 109–119, 2018.
- ZHANG, Y.; WEI, M.; LIU, A.; ZHOU, R.; LI, D.; DOSSA, K.; WANG, L.; ZHANG, Y.; GONG, H.; ZHANG, X.; YOU, J. Comparative proteomic analysis of two sesame genotypes with contrasting salinity tolerance in response to salt stress. **Journal of Proteomics**, [s.l.], v. 201, p. 73–83, 2019.

ZHU, Y. F., et al. Tolerance of two apple rootstocks to short-term salt stress: focus on chlorophyll degradation, photosynthesis, hormone and leaf ultrastructures. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s.l.], v. 41, 87, 2019.