



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

**DANIEL FARIAS DE OLIVEIRA**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS ASSOCIADAS COM A  
TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM SORGO**

**FORTALEZA**

**2020**

DANIEL FARIAS DE OLIVEIRA

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS ASSOCIADAS COM A  
TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM SORGO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal  
Orientador: Prof. Dr. Eneas 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)

---

- O46a Oliveira, Daniel Farias de.  
Alterações fisiológicas e metabólicas associadas com a tolerância à salinidade em sorgo / Daniel Farias de Oliveira. – 2020.  
79 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Prof. Dr. Eneas Gomes Filho.
1. Estresse salino. 2. Estresse oxidativo. 3. Metabolismo das poliaminas. 4. Perfil metabólico. 5. Sorghum bicolor L. Moench. I. Título.

CDD 572

---

DANIEL FARIAS DE OLIVEIRA

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS ASSOCIADAS COM A  
TOLERÂNCIA À SALINIDADE EM SORGO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 29/01/2020

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Eneas Gomes Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Claudivam Feitosa de Lacerda  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valdineia Soares Freitas  
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

---

Dr.<sup>a</sup> Helen Paula Silva da Costa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr.<sup>a</sup> Ana Luiza Sobral Paiva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## RESUMO

A salinidade é um estresse abiótico que limita fortemente o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade das plantas, principalmente em regiões áridas e semiáridas. A sobrevivência em ambientes salinos depende de vários processos adaptativos, que envolvem absorção, transporte e distribuição de íons em vários órgãos vegetais, acúmulo de solutos orgânicos nas células e um eficiente sistema de defesa antioxidante para combater o estresse oxidativo. Utilizando-se dois genótipos de sorgo com diferentes graus de tolerância ao estresse salino, CSF20 (genótipo tolerante) e CSF18 (genótipo sensível), foram analisados os efeitos da salinidade (NaCl 75 mM) no crescimento, nos teores de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ), nas trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, nos teores dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *b*, carotenoides), no teor relativo de água (TRA) e no potencial osmótico ( $\Psi_o$ ). Além disso, também foram analisados esses efeitos no acúmulo de solutos compatíveis (ácido  $\gamma$ -aminobutírico, prolina, aminoácidos livres e açúcares solúveis), nos teores de poliaminas (putrescina, espermidina e espermina) e nas atividades de enzimas do metabolismo das poliaminas, sendo também quantificados os teores de  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a integridade das membranas biológicas, as atividades de enzimas do sistema de defesa antioxidativo e o perfil metabólico (metaboloma) dos dois genótipos. A salinidade promoveu reduções no crescimento e induziu aumentos nos teores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e diminuiu o teor de  $\text{K}^+$ . O estresse salino afetou as trocas gasosas, os parâmetros de emissão de fluorescência da clorofila *a* e os teores de carotenoides, com exceção na condutância estomática, na concentração interna de  $\text{CO}_2$ , na transpiração, na ETR e no conteúdo de clorofilas. O TRA e o  $\Psi_o$  foram reduzidos pelo estresse salino, mas, para diminuir os danos principalmente no CSF20 o ajuste osmótico foi realizado com acúmulo de osmólitos e de poliaminas. A salinidade induziu aumentos nos teores de putrescina, no genótipo sensível, e de espermidina e espermina, no genótipo tolerante, e isto ocorreu, provavelmente, devido à regulação na atividade das enzimas oxidativas das poliaminas, diamina oxidase e poliamina oxidase. Os teores de  $\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  no genótipo CSF18 aumentaram em decorrência do estresse salino, enquanto no genótipo CSF20 observou-se aumento somente no conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A integridade das membranas foi comprometida pela salinidade em ambos os genótipos, porém esse efeito foi menos pronunciado em CSF20. Os danos oxidativos nas folhas das plantas de sorgo foram mais acentuados no genótipo CSF18. De modo geral, as atividades das enzimas dismutase do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato e redutase da glutathiona nas folhas de sorgo foram alteradas pela salinidade. Os danos oxidativos foram observados em maior intensidade

no genótipo sensível à salinidade, o qual apresentou mais baixa atividade das enzimas antioxidativas e altos níveis de espécies reativas de oxigênio. A análise do metaboloma comprovou que a salinidade aumenta a biossíntese de poliaminas (espermidina e cadaverina), com acúmulo de importantes solutos compatíveis, como açúcares, polióis e prolina, além de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico no genótipo CSF20, mas não no genótipo sensível, o CSF18. Os dois genótipos de sorgo estudados foram afetados pelo estresse salino, mas as diferenças no crescimento confirmaram que CSF20 é mais tolerante ao estresse salino do que o CSF18. Os resultados, portanto, sugerem uma maior plasticidade do genótipo tolerante às mudanças nas condições ambientais, com alterações no metabolismo que favorecem o crescimento em condições adversas.

**Palavras-chave:** Estresse salino. Estresse oxidativo. Metabolismo das poliaminas. Perfil metabólico. *Sorghum bicolor* L. Moench.

## ABSTRACT

Salinity is an abiotic stress that strongly limits plant growth, development and productivity, especially in arid and semiarid regions. Survival in saline environments depends on several adaptive processes, which involve absorption, transport and distribution of ions in various plant organs, accumulation of organic solutes in cells and an efficient antioxidant defense system to combat oxidative stress. Using two sorghum genotypes with different degrees of tolerance to salt stress, CSF20 (tolerant genotype) and CSF18 (sensitive genotype), were analyzed the effects of salinity (NaCl 75 mM) on growth, ion contents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ), gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence, levels of photosynthetic pigments (chlorophylls *a* and *b*, carotenoids), relative water content (TRA) and osmotic potential ( $\Psi_o$ ). In addition, were also analyzed the effects on the accumulation of compatible solutes ( $\gamma$ -aminobutyric acid, proline, free amino acids and soluble sugars), levels of polyamines (putrescine, spermidine and spermine) and enzyme activities of the polyamines metabolism. Were also quantified the contents of  $\text{O}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , integrity of biological membranes, enzymes activities of the antioxidant system and the metabolic profile (metabolome) for both genotypes. Salinity promoted reductions in growth and induced increases in  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  contents and decreased  $\text{K}^+$  content. Salt stress affected gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence emission parameters and carotenoid contents, except for stomatal conductance, internal  $\text{CO}_2$  concentration, transpiration, ETR and chlorophyll content. TRA and  $\Psi_o$  were reduced by salt stress, but to reduce damage, especially in CSF20, osmotic adjustment was performed with accumulation of osmolytes and polyamines. Salinity induced increases in the levels of putrescine, in the sensitive genotype, and spermidine and spermine, in the tolerant genotype, and this was probably due to the regulation of the activity of the oxidative enzymes of polyamines, diamine oxidase and polyamine oxidase. The contents of  $\text{O}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the CSF18 genotype increased due to salinity, while in the CSF20 genotype an increase was observed only in the content of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Membrane integrity was compromised by salinity in both genotypes, but this effect was less pronounced in CSF20. Oxidative damage to the leaves of sorghum plants was more pronounced in the CSF18 genotype. In general, the activities of superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase enzymes in sorghum leaves were altered by salinity. Oxidative damage was observed in greater intensity in the salinity-sensitive genotype, which showed lower activity of antioxidative enzymes and high levels of reactive oxygen species. The metabolome analysis showed that salinity increases the biosynthesis of polyamines (spermidine and cadaverine), with accumulation of

important compatible solutes, such as sugars, polyols and proline, in addition to tricarboxylic acid cycle intermediates in the CSF20 genotype, but not in the sensitive genotype. Both genotypes studied were affected by salt stress, but differences in growth confirmed that CSF20 is more tolerant to salt stress than CSF18. The results, therefore, suggest a greater plasticity of the genotype tolerant to changes in environmental conditions, with alterations in metabolism that favor growth under adverse conditions.

**Keywords:** Salt stress. Oxidative stress. Polyamine metabolism. Metabolic profile. *Sorghum bicolor* L. Moench.



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1	A salinização dos solos e seus efeitos sobre as plantas .....	12
2.2	Metabolismo do ácido $\gamma$ -aminobutírico .....	15
2.3	Metabolismo da prolina .....	15
2.4	Metabolismo das poliaminas .....	17
2.5	Estresse oxidativo .....	19
2.6	O sorgo .....	21
3	CAPÍTULO II – POLYAMINES METABOLISM AND METABOLOMIC CHANGES ASSOCIATED WITH DIFFERENTIAL SALT TOLERANCE IN SORGHUM GENOTYPES .....	23
3.1	Introduction .....	24
3.2	Material and methods .....	25
3.2.1	<i>Plant material and growth conditions</i> .....	25
3.2.2	<i>Growth parameters, relative water content and leaf osmotic potential</i> ....	26
3.2.3	<i>Inorganic solutes determination</i> .....	26
3.2.4	<i>Polyamines enzyme activities</i> .....	27
3.2.5	<i>HPLC analysis of polyamines</i> .....	28
3.2.6	<i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid (GABA)</i> .....	28
3.2.7	<i>Proline</i> .....	29
3.2.8	<i>Free aminoacids</i> .....	29
3.2.9	<i>Soluble sugars</i> .....	29
3.2.10	<i>Metabolic profile</i> .....	30
3.2.11	<i>Experimental design and statistical analysis</i> .....	30
3.3	Results .....	31
3.4	Discussion .....	37
3.5	Conclusion .....	44
3.6	Supplementary material .....	46
4	CAPÍTULO III – INFLUÊNCIA DA SALINIDADE NA FOTOSSÍNTESE E NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDATIVO	48

	<b>EM DOIS GENÓTIPOS DE SORGO .....</b>	
<b>4.1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>48</b>
<b>4.2</b>	<b>Material e métodos .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.1</b>	<i>Material vegetal e condições experimentais .....</i>	<i>49</i>
<b>4.2.2</b>	<i>Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a .....</i>	<i>50</i>
<b>4.2.3</b>	<i>Pigmentos fotossintéticos .....</i>	<i>50</i>
<b>4.2.4</b>	<i>Vazamento de eletrólitos e peroxidação de lipídios .....</i>	<i>51</i>
<b>4.2.5</b>	<i>Teores de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e de radical superóxido (•O<sub>2</sub><sup>-</sup>) .....</i>	<i>52</i>
<b>4.2.6</b>	<i>Enzimas antioxidativas .....</i>	<i>52</i>
<b>4.2.7</b>	<i>Teores de ascorbato e glutatona .....</i>	<i>53</i>
<b>4.2.8</b>	<i>Análise estatística .....</i>	<i>54</i>
<b>4.3</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>54</b>
<b>4.4</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>59</b>
<b>4.5</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é um cereal originário da África, que foi domesticado entre 3.000 e 5.000 anos atrás. A cultura é conhecida por sua utilização na alimentação animal, principalmente nos Estados Unidos, América do Sul e Austrália. Ele também pode ser uma rica matéria-prima para alimento humano, como a farinha de sorgo. A cultura, nos últimos anos, tem apresentado uma expressiva expansão no Brasil, o qual é o 9º maior produtor mundial. Os estados de Goiás e Minas Gerais se destacam como os maiores produtores. Agronomicamente, as culturas podem ser classificadas em quatro tipos: sorgo grânifero, sorgo sacarino, sorgo vassoura e sorgo forrageiro (EMBRAPA MILHO E SORGO, 2007).

A escolha da cultivar é essencial para alcançar elevadas produtividades. Em primeiro lugar, deve-se levar em consideração a finalidade à qual o plantio se destina, se à produção de grãos, ou ao consumo animal. Além disso, devem-se considerar também se as cultivares são adaptadas à região onde será realizado o plantio.

A cultura do sorgo vem ganhando importância em todo mundo nos últimos anos. Sua boa adaptação a ambientes secos e salinos, alta produção e sua versatilidade, são fatores que tem contribuído para a expansão da área plantada desta cultura.

O semiárido brasileiro possui áreas com elevadas taxas de evapotranspiração e baixos índices de precipitação. Consequentemente, ocorre o acúmulo de sais nos solos, sendo necessário o aproveitamento de água salina. Os elevados teores de sais nos mananciais de água provocam efeitos deletérios para germinação e produção agrícola (PAIVA *et al.*, 2016). Ressalta-se que o estresse salino, promove o fechamento dos estômatos foliares e a redução na transpiração, ocasionando a diminuição na absorção de água e nutrientes pelas plantas, culminando em outras alterações fisiológicas e bioquímicas (DIAS *et al.*, 2017).

Dessa forma, o presente trabalho, com o intuito de compreender as vias metabólicas envolvidas na tolerância ao estresse salino, analisou mecanismos metabólicos em plantas de sorgo submetidas à salinidade, baseando-se em estudos metabólicos, fotossintéticos e análise bioquímicas e fisiológicas.

## 2 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A salinização dos solos e seus efeitos sobre as plantas

A classificação de um solo como salino baseia-se no valor da condutividade elétrica (CE) capaz de reduzir significativamente a produção da maioria das culturas (MUNNS; TESTER, 2008). Um solo é considerado salino quando a condutividade elétrica do seu extrato de saturação (ECe) é igual ou maior que  $4,0 \text{ dS m}^{-1}$ , o que minimamente equivale a uma solução de NaCl 40 mM, com uma pressão osmótica de 0,2 MPa (US SALINITY LABORATORY STAFF, 1954).

A composição iônica dos solos salinos é variável,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  em maiores quantidades quando comparadas àquelas dos íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{NO}_3^-$ . Esses íons resultam dos processos de intemperismo dos minerais e das rochas da crosta terrestre, ocasionados por ação de fatores tais como clima, relevo e organismos vivos envolvendo eventos físicos, químicos e biológicos, especialmente os químicos (hidrólise, hidratação, dissolução, oxidação e carbonatação). Dessa maneira, a salinização natural dos solos tem origem no seu próprio processo de formação e os fatores climáticos podem acelerar esse processo. Nas regiões áridas e semiáridas, a evapotranspiração também desempenha importante papel na pedogênese dos solos salinos (YADAV *et al.*, 2011).

Outra fonte de salinização dos solos, porém decorrente da atividade humana, constitui-se no emprego de práticas de irrigação incompatíveis com as características físicas, químicas e mineralógicas do perfil do solo, bem como a aplicação de fertilizantes de forma excessiva e o uso de água de irrigação de baixa qualidade. Além disto, a baixa precipitação pluviométrica e a elevada superfície evaporativa das regiões áridas e semiáridas, contribuem significativamente para os processos de salinização (ASHRAF; FOOLAD, 2007; YADAV *et al.*, 2011).

A salinidade em terras cultiváveis é um problema crescente e limita o desenvolvimento das plantas, culminando em perda de produtividade. De acordo com Pedrotti *et al.* (2015), a área total de solos salinos corresponde a 7% de toda a superfície terrestre, equivalente a aproximadamente  $10.000.000 \text{ km}^2$ . O problema da salinização é verificado em todo país, principalmente na região Nordeste, onde aproximadamente 25% das áreas irrigadas estão salinizadas (PEDROTTI *et al.*, 2015).

A salinidade induz uma série de respostas morfológicas, fisiológicas e bioquímicas nas plantas decorrentes de mudanças nos processos moleculares (GUPTA; HUANG, 2014).

Essas respostas variam amplamente entre as espécies e dependem do tipo e concentração do sal, do tempo e número de exposição ao estresse, do estado fenológico da planta, bem como de outros fatores (PRISCO; GOMES-FILHO, 2010; SHINOZAKY *et al.*, 2015).

Os efeitos adversos da salinidade sobre as plantas podem ser ocasionados pelo estresse osmótico, toxicidade iônica e/ou deficiência nutricional (ZHU, 2002). Durante a exposição ao estresse, em um curto intervalo de tempo (minutos a horas), apenas o efeito osmótico atua sobre a planta, induzindo variações essencialmente instantâneas (MUNNS, 2002). Nessa condição, os sais na solução do solo baixam seu potencial hídrico em decorrência do abaixamento do potencial osmótico do solo e dificultam a absorção de água pelas plantas. Já os problemas de toxicidade normalmente surgem quando os íons solúveis no solo são acumulados nas plantas de forma excessiva, ficando dessa maneira dissolvidos no citosol e em outras organelas onde acabam interferindo em inúmeras reações enzimáticas e provocando danos ao seu crescimento (MUNNS, 2002; MUNNS; TESTER, 2008). Em adição a esses efeitos diretos da salinidade sobre as plantas, inúmeros efeitos secundários também podem surgir. Por exemplo, o estresse salino também provoca um desbalanço no estado redox das células, gerando um estresse oxidativo através da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas ROS são altamente reativas e podem alterar o metabolismo celular normal através da oxidação de biomoléculas (DEMIDCHIK, 2015).

A inibição do crescimento em decorrência desses efeitos ocorre na maioria das espécies cultivadas, mesmo em baixas concentrações de sais (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005). Contudo, o grau no qual o crescimento das plantas é reduzido dependerá das diferenças nos níveis de tolerância entre as espécies e entre cultivares de uma mesma espécie (PARIDA; DAS, 2005). Nesse contexto, as plantas têm sido classificadas em halófitas e glicófitas, de acordo com a tolerância ao estresse salino. As halófitas são aquelas que crescem em solos salinos e toleram altas concentrações de sais, enquanto as glicófitas, que compreendem a maioria das plantas cultivadas, são sensíveis aos sais e não toleram longa ou breve exposição a ambientes salinos (CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005). Durante o estresse salino, os principais processos da planta, como a fotossíntese, a respiração, a síntese de proteínas, as relações hídricas e as reações enzimáticas, são afetados e a primeira resposta é a redução da taxa de crescimento foliar, seguida de cessação do crescimento quando o estresse se intensifica (MUNNS, 2002; PARIDA; DAS, 2005).

O acúmulo de  $\text{Na}^+$  nos tecidos tem sido considerado determinante para a maior sensibilidade ao estresse salino, em diversas espécies de plantas (HAMAMOTO *et al.*, 2015). Entretanto, as plantas desenvolveram mecanismos para prevenir e aliviar os danos provocados

pelo excesso de sais, a fim de restabelecer as condições homeostáticas, especialmente a homeostase  $K^+/Na^+$ , retomando seu crescimento, ainda que com taxas reduzidas (ZHU, 2001; ZHANG; SHI, 2013). De modo geral, em glicófitas, a tolerância das plantas à salinidade depende da habilidade em controlar o acúmulo e o transporte de  $Na^+$ , envolvendo: i) seletividade na absorção pelas células das raízes; ii) exclusão ou compartimentação de  $Na^+$  nas células das raízes; iii) carregamento do  $K^+$  no xilema em detrimento do  $Na^+$ ; iv) descarregamento do  $Na^+$  da seiva do xilema; v) minimização da translocação dos íons  $Na^+$  e  $Cl^-$  para a parte aérea em crescimento (MUNNS; TESTER, 2008, ANJANEYULU *et al.*, 2014; MAATHUIS; AHMAD; PATISHTAN, 2014). Além disso, as plantas devem ser capazes de alterar a estrutura da membrana plasmática; induzir a expressão e a atividade de enzimas antioxidativas; e alterar seu balanço hormonal, a fim de restabelecer sua homeostase celular e, finalmente, retomar seu crescimento e desenvolvimento (ZHU, 2001; PARIDA; DAS, 2005; MUNNS; TESTER, 2008).

A salinidade inibe os processos de fotossíntese e transpiração (PARIDA; DAS, 2005; ASHRAF; HARRIS, 2013). Essa inibição pode estar correlacionada com o grau de fechamento dos estômatos (AMJAD *et al.*, 2014) ou com o acúmulo dos íons sódio e cloreto nos cloroplastos, os quais afetam a integridade dos cloroplastos, levando a redução no rendimento quântico do PSII e na limitação da fixação do carbono (PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2012). A salinidade pode ainda alterar os níveis dos pigmentos fotossintéticos (DUARTE *et al.*, 2013) e a desorganização da ultraestrutura dos cloroplastos (BEJAOU *et al.*, 2016). A causa da deformação dos cloroplastos pode estar relacionada ao desbalanço osmótico entre o estroma e o citoplasma ou pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio nessas organelas (NAEEM *et al.*, 2012; MENG *et al.*, 2016).

Plantas tolerantes ao estresse salino apresentam uma maior eficiência da capacidade fotossintética determinada por vários fatores. A exposição ao  $Na^+$ , reduz o transporte de elétrons para as reações fotoquímicas, ocorrendo, como consequência, a fotoinibição, que diminui o rendimento quântico do PSII (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). Li *et al.* (2015) observaram diferenças nos teores de superóxido em duas cultivares de tomate submetidos ao estresse com sais e tratadas com espermidina exógena. A poliamina reduziu os níveis de superóxido nas plantas sob estresse, diminuindo os danos na ultraestrutura dos cloroplastos e possivelmente do aparelho fotossintético.

Assim, nas situações em que a salinidade do solo não pode ser mantida em um nível aceitável para as culturas exploradas economicamente, mediante um manejo adequado do solo e da água de irrigação, uma alternativa viável é a seleção criteriosa de espécies ou cultivares

que, ao mesmo tempo, sejam mais tolerantes aos danos causados pelos sais e possam ter produções economicamente rentáveis.

## 2.2 Metabolismo do ácido $\gamma$ -aminobutírico

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é um aminoácido com quatro carbonos não proteínogênico, existente em bactérias, plantas e vertebrados. Devido a sua estrutura, o GABA é uma molécula de atuação flexível em muitos eventos biológicos e fisiológicos, como molécula sinalizadora com ação inter e intracelular (BEUVE *et al.*, 2004), interação com outros sinais biológicos (RAMESH *et al.*, 2016), regulação do crescimento e tolerância ao estresse (VIJAYAKUMARI; PUTHUR 2016), bem como regulação da modificação da parede celular e expressão gênica (SAPSE, 2012; BATUSHANSKY *et al.*, 2014).

A via metabólica de síntese de GABA é referida como GABA *shunt*, que é um *loop* que produz e conserva o suprimento de GABA. Três vias estão envolvidas no metabolismo do GABA. A principal via, catalisada pela enzima descarboxilase do glutamato (GAD), começa com a descarboxilação de glutamato (Glu) para produzir GABA e CO<sub>2</sub> no citosol (FAIT *et al.*, 2008). Uma segunda via é catalisada na matriz mitocondrial pela transaminase do GABA (GABA-T) em uma transaminação reversível que produz semialdeído succínico (SSA), o qual é oxidado para succinato pela enzima desidrogenase do SSA (SSADH) (BOWN; SHELP, 1997). Alternativamente, o GABA pode ser produzido via degradação das poliaminas (PAs) e se acumula em resposta a estresses abióticos, incluindo seca, salinidade e baixa temperatura (TURANO; KRAMER; WANG, 1997; ALCÁZAR *et al.*, 2010; GILL; TUTEJA, 2010; SHELP *et al.*, 2012).

Tem sido proposto que GABA também participa nos metabolismos do carbono (C) e nitrogênio (N) sob condições de estresse (SHELP; BOWN; MCLEAN, 1999; LI *et al.*, 2016). Um equilíbrio entre a assimilação de C e o metabolismo de N é essencial para o crescimento ideal. Esse equilíbrio é controlado através da regulação da síntese de fotossintatos, como sacarose e glicose, que fornecem energia e esqueletos de C para a formação de aminoácidos. Por sua vez, os aminoácidos incorporam compostos inorgânicos (nitrato e amônio) em proteínas relacionadas à fotossíntese que estão envolvidas na síntese de produtos fotossintéticos (BLOOM *et al.*, 2014; BLOOM, 2015).

## 2.3 Metabolismo da prolina

A prolina é um dos solutos compatíveis mais amplamente distribuídos que se acumula nas plantas durante condições ambientais adversas e desempenha um papel importante na tolerância a diferentes tipos de estresse. Como aminoácido multifuncional, a prolina apresenta várias funções sob condições de estresse, como: i) soluto compatível no ajuste osmótico; ii) estabilização de proteínas, membranas e estruturas subcelulares; iii) e proteção das funções celulares através da eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HAYAT *et al.*, 2012; PARIDA; PANDA; RANGANI, 2018).

Em adição a essas funcionalidades, a prolina também reduz o efluxo de  $K^+$  induzido pela salinidade e isso provavelmente aumenta a homeostase desse íon nas células vegetais, aumentando a tolerância ao estresse salino (CUIN; SHABALA, 2007). Estudando os efeitos da salinidade nas folhas de mudas de arroz, Sobahan *et al.* (2009) relacionaram que a adição de prolina limitou o fluxo apoplástico de  $Na^+$ , induzindo tolerância ao estresse por manter maior proporção  $K^+ / Na^+$ . O acúmulo de prolina também pode desempenhar papéis regulatórios durante o crescimento e a reprodução das plantas, de acordo com vários estudos (MATTIOLI *et al.*, 2008; MATTIOLI; COSTANTINO; TROVATO, 2009; BIANCUCCI *et al.*, 2015).

Dois vias são responsáveis pela síntese de prolina em plantas, a via do Glu e a via da ornitina, nas quais o Glu e a ornitina (Orn) são utilizados como precursores, respectivamente (HAYAT *et al.*, 2012). A síntese de prolina a partir do Glu requer duas enzimas: sintetase da  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CS) e redutase da  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CR). Inicialmente, P5CS fosforila e reduz Glu a glutamato-semialdeído (GSA) que é espontaneamente convertido em  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C). A enzima P5CR converte o P5C em prolina (DELAUNEY; VERMA, 1993). Estudos metabólicos revelaram que a via do Glu predomina em condições de estresse, devido à maior produção de Glu pelas células vegetais estar correlacionada ao acúmulo de prolina (HARE; CRESS; STADEN, 1999; SAADIA *et al.*, 2012; ZANELLA *et al.*, 2016).

A biossíntese de prolina a partir da Orn ocorre através das enzimas aminotransferase da  $\delta$ -ornitina ( $\delta$ -OAT). O acúmulo de prolina através da via da Orn é muito importante no momento do estabelecimento das plântulas e em algumas espécies de plantas para o aumento da prolina mediado pelo estresse (ROOSENS *et al.*, 1988; ARMENGAUD *et al.*, 2004; XUE; LIU; HUA, 2009). A via da Orn ocorre nas mitocôndrias com alto suprimento de nitrogênio, enquanto as reações da via do Glu acontecem no citosol e cloroplastos sob condições de estresse e limitação do nitrogênio (HAYAT *et al.*, 2012).



## 2.4 Metabolismo das poliaminas

As poliaminas (PAs) são encontradas em todos os compartimentos da célula vegetal e por serem carregadas positivamente em pH fisiológico, elas se ligam a macromoléculas polianiónicas, como proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios. Essa capacidade pode explicar a participação dessas moléculas em diferentes processos fisiológicos, como replicação de DNA, processamento de RNA, síntese de proteínas e estabilização de membranas e modulação da atividade de enzimas (GILL; TUTEJA, 2010 a; GUPTA; DEY; GUPTA, 2013). O interesse em estudos sobre os níveis de PAs e o seu papel protetivo em plantas submetidas a estresses bióticos e abióticos tem se tornado crescente nos últimos anos (SHU *et al.*, 2012; PUYANG *et al.*, 2016, MONTILLA-BASCÓN *et al.*, 2016).

O nível homeostático das PAs é regulado pelas reações do anabolismo e catabolismo, bem como pela conjugação com ácidos orgânicos. As PAs encontradas em maior concentração nos organismos vivos são a diamina putrescina (Put), a triamina espermidina (Spd) e a tetramina espermina (Spm). A abundância de PAs nas plantas varia de acordo com a espécie e fenologia, além de apresentar uma variação notável nos níveis de cada tipo de PA durante as respostas a estresses bióticos e abióticos (ALCÁZAR *et al.*, 2010; JIMENEZ-BREMONT *et al.*, 2014). O metabolismo das PAs está interconectado com algumas das rotinas metabólicas envolvidas na formação das principais moléculas de sinalização relacionadas ao estresse. Por exemplo, a biossíntese de PAs exige precursores que também são usados para a síntese de outros metabólitos importantes relacionados ao estresse, como *S*-adenosilmetionina (SAM, envolvida no metabolismo do etileno), Orn (necessária para a síntese de prolina) e arginina (Arg, precursora do óxido nítrico) (PANDEY *et al.*, 2000; YAMASAKI; COHEN, 2006).

A poliamina mais simples, a Put, é sintetizada normalmente pela descarboxilação da Orn por meio de uma reação enzimática catalisada pela descarboxilase da ornitina (ODC). Essa enzima é reconhecida por estar presente em todos os organismos (LIU *et al.*, 2015), embora evidências contrárias apontam a inexistência de uma via funcional da ODC em *Arabidopsis thaliana* (HANFREY *et al.*, 2001). Uma rota alternativa para síntese de Put evoluiu a partir de bactérias e plantas, a via da descarboxilase da arginina (ADC), que utiliza Arg como substrato e envolve três passos consecutivos: (i) a descarboxilação da Arg pela ADC, produzindo agmatina; (ii) essa molécula serve de substrato para a iminohidrolase da agmatina (AIH), para produzir *N*-carbamoil-Put; e (iii) o *N*-carbamoil-Put é hidrolisado pela amidohidrolase do *N*-carbamoil-Put (CPA), liberando a Put na forma livre (ALCÁZAR *et al.*,

2010). Posteriormente, a Put é utilizada para sintetizar as poliaminas Spd e Spm pela adição de grupos aminopropil, através de reações envolvendo a Spd sintase e Spm sintase, respectivamente (LIU *et al.*, 2015). A relevância da via da ADC é crucial à tolerância aos estresses abiótico (FLORES; GALSTON, 1982).

As PAs se acumulam nas plantas durante várias condições de estresse, apoiando o fato de que elas desempenham um papel protetor durante as condições de estresse (GROPPIA; BENAVIDES, 2008; ALCÁZAR *et al.*, 2010). Como exemplos de estudos recentes que ilustram o papel protetor das PAs, destacam-se: manutenção da eficiência fotoquímica de plantas (IOANNIDIS; KOTZABASIS, 2007; HAMDANI; YAAKOUBI; CARPENTIER, 2011; SHU *et al.*, 2015); proteção aos danos oxidativos através da ligação das PAs às macromoléculas e conferindo estabilidade estrutural (TIBURCIO *et al.*, 2014), ou por modular o sistema de defesa antioxidativa (LI *et al.*, 2015).

A oxidação das PAs nas plantas depende principalmente da ação de amins oxidases e desempenha um papel crítico de sinalização. As amins oxidases conhecidas incluem diamina oxidase (DAO) e poliamina oxidase (PAO). A enzima DAO é uma amina oxidase dependente de cobre (CuAO) que oxida Put em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, amônia e 4-aminobutanal, que passa por ciclização para gerar pirrolina (PYRR). Então, PYRR é convertida em GABA pela ação da pirrolina desidrogenase (PYRR-DH). Outra classe importante é a PAO dependente de flavina catalisa a formação de 4-aminobutanal ou 3-aminopropil-4-aminobutanal a partir da desaminação de Spd ou Spm, respectivamente, juntamente com 1,3-diaminopropano e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (WANG *et al.*, 2019).

Diferentes trabalhos demonstraram que não apenas a biossíntese, mas também a oxidação de PAs são induzidas durante a aclimação das plantas ao estresse salino. Por exemplo, plantas de soja e *Setaria italica* submetidas à salinidade apresentaram regulação positiva das enzimas DAO e PAO (ZHANG *et al.*, 2014; SUDHAKAR *et al.*, 2015). No entanto, o papel desempenhado pelo catabolismo das PAs na adaptação das plantas à salinidade ainda não é bem entendido. Moschou *et al.* (2008) sugeriram que a tolerância ao estresse das plantas mediada pelas PAs seria uma razão entre o seu catabolismo e anabolismo, onde a biossíntese de PAs deve superar a degradação das PA.

Além das formas livres, nos vegetais, as poliaminas também se apresentam como conjugados de ácido hidroxicinâmico, como a cafeoilputrescina, culmaroilputrescina, diculmaroilespermidina e diferuloilespermina (GUPTA; DEY; GUPTA, 2013), bem como podem estar conjugadas com proteínas por ligações covalentes. No último caso, a reação de conjugação é promovida por transglutaminases, que catalisam a ligação que ocorre entre o

grupo carboxamida (CONH<sub>2</sub>) de um resíduo de glutamina e um grupo amino de uma poliamina. As transglutaminases estão envolvidas em inúmeras funções biológicas, tais como na organização dos elementos do citoesqueleto no tubo polínico e sua distribuição em diferentes compartimentos celulares (DEL DUCA; SERAFINI-FRACASSINI; CAI, 2013) e na proteção de cloroplastos, principalmente dos fotossistemas e do aparato fotossintético, de plantas crescidas em condições ambientais adversas (SOBIESZCZUK-NOWICKA; LEGOCKA, 2014).

## 2.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo nas células vegetais é um fator causado em resposta a estresses ambientais, devido as modificações nas biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos (DEMIDCHIK, 2015). O estresse salino leva as plantas à superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em estresse oxidativo. As EROs compreendem tanto radicais livres (radical superóxido  $\cdot\text{O}_2^-$ ; radical hidroxil  $\cdot\text{OH}$ ; radicais hidroperóxido  $\text{HO}\cdot_2$ ; e radicais alcóxi  $\text{RO}\cdot$ ) quanto formas moleculares (peróxido de hidrogênio,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; e oxigênio singlete,  $^1\text{O}_2$ ) (GILL; TUTEJA, 2010b). As ROS são produtos do metabolismo de células saudáveis, mas seus níveis podem aumentar temporária ou permanentemente nas células em condições de estresse.

Os principais sítios de produção das ROS em plantas submetidas ao estresse são os cloroplastos, os peroxissomos e as mitocôndrias. O  $\text{O}_2$  produzido na fotossíntese pode captar os elétrons que são carreados na cadeia transportadora de elétrons (CTE) do cloroplasto, formando o  $\cdot\text{O}_2^-$ , o qual é rapidamente convertido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (outra ROS) pela dismutase do superóxido (SOD) (GECHEV *et al.*, 2006; DEL RÍO, 2015).

Provavelmente, os peroxissomos são os principais sítios de formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Existem pelo menos dois sítios de produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos peroxissomos vegetais: i) na matriz da organela pela oxidase da xantina (XOD), que catalisa a conversão da xantina ou hipoxantina em ácido úrico e  $\cdot\text{O}_2^-$ ; e ii) na membrana do peroxissomo que apresenta uma pequena CTE composta por uma flavoproteína NADH e *Cyt b* (DEL RÍO *et al.*, 2002).

Assim como nos peroxissomos, as mitocôndrias também são grandes produtoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$  através da respiração (MITTLER, 2017). A CTE mitocondrial é a principal fonte de geração de ROS nessa organela e abriga elétrons com energia livre suficiente para reduzir diretamente o  $\text{O}_2$ . Os complexos I e III da CTE mitocondrial são os locais de produção de  $\cdot\text{O}_2^-$ , o qual é reduzido a  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela SOD (RHOADS *et al.*, 2006). Pela reação de Fenton, esse

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode reagir na presença de Fe<sup>2+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>, originando <sup>•</sup>OH que reage com os ácidos nucleicos e proteínas, tornando estas mais suscetíveis à proteólise, gerando danos às membranas celulares (GRENE, 2002; SHARMA *et al.*, 2012).

As ROS são altamente tóxicas e podem causar danos a todos os tipos de macromoléculas biológicas. Para se proteger dos efeitos tóxicos das ROS, as células e suas organelas empregam uma defesa antioxidativa composta pelo sistema antioxidativo enzimático e o sistema oxidativo não-enzimático. O sistema enzimático é constituído pelas isoenzimas da SOD, catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase da glutathiona (GPX). A SOD consiste na primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos das ROS e é encontrada em todas as partes da célula propensas ao estresse oxidativo (NOCTOR; REICHHELD; FOYER, 2018). É uma metaloenzima que é classificada de acordo com o cofator que usa: 1. o ferro (Fe-SOD), encontrada nos cloroplastos; 2. manganês (Mn-SOD), presente nos peroxissomos e mitocôndrias; e 3. o cobre ou o zinco (Cu/Zn-SOD), encontrada nos cloroplastos e no citosol (GILL; TUTEJA, 2010b).

A CAT, que também possui isoenzimas, é formada por uma estrutura tetramérica capaz de converter diretamente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. É indispensável na remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido nos peroxissomos durante a β-oxidação dos ácidos graxos e também durante condições de estresse (RIZHSKY *et al.*, 2002).

A APX catalisa a redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, usando o ascorbato como doador de elétron. O ascorbato é recuperado no ciclo ascorbato-glutathiona e a redutase do monodesidroascorbato (MDAR) está envolvida na sua redução, usando NAD(P)H como doador de elétron (NOCTOR; FOYER, 1998). A MDAR localiza-se em vários compartimentos celulares, tais como citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e glioxissomos (MITTOVA *et al.*, 2003; BOWDITCH; DONALDSON, 1990). A APX consiste em pelo menos cinco isoformas diferentes, incluindo a da mitocôndria (mtAPX), a encontrada no tilacoide (tAPX), a presente na membrana dos glioxissomos (gmAPX), a encontrada no estroma do cloroplasto (sAPX) e a isoforma citosólica (cAPX) (SHIGEOKA, 2002).

Um outro tipo de peroxidase, a GPX, catalisa a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxidos orgânicos e hidroperóxidos de lipídios a partir da glutathiona reduzida (GSH), ajudando a proteger a célula contra os danos oxidativos. As GPXs pertencem a uma família de enzimas-chave bem conhecida em animais e mais recentemente em vegetais (ESHDAT *et al.*, 1997).

O sistema antioxidante não-enzimático inclui substâncias antioxidantes, como o ácido ascórbico, glutathiona (GSH), tocoferóis, carotenoides e flavonoides, que ocorrem em todas as células vegetais (GILL; TUTEJA, 2010b). Os antioxidantes acumulam-se nas plantas

submetidas ao estresse oxidativo, minimizando a formação das ROS ou dissipando o excesso de energia das clorofilas excitadas (DEMIDCHIK, 2015).

## 2.6 O sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) é uma espécie C4, pertencente à família Poaceae (Gramineae). Segundo Doggett (1988), os sorgos cultivados atualmente se originaram da espécie silvestre *Sorghum bicolor* subsp. *arundinaceum* e a maior variação do gênero se encontra no centro-oeste da África, na África subsaariana, de onde o gênero ancestral provavelmente se originou há 5.000 – 6.000 anos. A planta de sorgo se adapta a uma ampla variação de ambientes e produz sob condições desfavoráveis quando comparado à maioria dos outros cereais. Devido a sua tolerância à seca, é considerado um cultivo apto para regiões semiáridas e áridas com chuvas escassas.

Todos os táxons cultivados são classificados como *S. bicolor* subsp. *bicolor*. Harlan e de Wet (1972) desenvolveram uma classificação informal e simplificada para sorgos cultivados e seus parentes selvagens mais próximos, dividindo em cinco variedades básicas (Bicolor, Caudatum, Guinea, Kafir e Durra) e dez variedades híbridas com base nos tipos de espiguetas maduras.

Entre as cinco variedades, os sorgos Caudatum e Kafir são importantes agronomicamente por apresentar alto rendimento e qualidade de sementes. Em 2017 o sorgo ocupou o quinto lugar entre as culturas de grãos de cereais em área plantada, produtividade e produção total, ficando atrás do milho, arroz, trigo e cevada (FAOSTAT, 2020). Por essa razão, esse cereal é usado na dieta humana, em composições de rações para aves, suínos, bovinos de corte, segmento de alimentos para animais de estimação e recentemente na produção de bioetanol (DAVILA-GOMEZ *et al.*, 2011; RONDA *et al.*, 2018; JIANG *et al.*, 2019).

A cultura do sorgo está em expansão no Brasil, principalmente no período das culturas de verão. De acordo com a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) a produção da safra brasileira de sorgo em 2019 alcançou 2.109,3 milhões de toneladas, com queda de 3,1% em relação ao ano anterior (CONAB, 2019).

O sorgo é considerado uma cultura moderadamente tolerante ao sal (FRANCOIS; DONOVAN; MAAS, 1984). A produtividade de grãos é afetada acima de 6,8 dS m<sup>-1</sup>, embora esse efeito varie entre as diferentes variedades e genótipos existentes. Portanto, dada a

importância econômica do sorgo e sua relativa tolerância à salinidade, torna-se relevante o estudo dos efeitos do NaCl na indução de aclimação ao estresse salino em plantas de sorgo.

### 3 CAPÍTULO II – POLYAMINES METABOLISM AND METABOLOMIC CHANGES ASSOCIATED WITH DIFFERENTIAL SALT TOLERANCE IN SORGHUM GENOTYPES

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Planta

Daniel Farias de Oliveira<sup>1</sup> Lineker de Sousa Lopes<sup>1</sup> Enéas Gomes-Filho<sup>1,\*</sup>

#### **Affiliations:**

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, and National Institute of Science and Technology in Salinity (INCTSal / CNPq), Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

#### **Abstract**

***Main Conclusion* Accumulation of specific compatible solutes, mainly GABA, PAs, and proline, was very important to homeostasis regulation and can be pointed as a basis of differential salt tolerance in sorghum genotypes.**

**Abstract** Salinity is among one of the most serious abiotic factors that limit plant growth and development in arid and semi-arid regions. The survival in saline environments depends on a number of adaptive processes involving absorption, transport, and distribution of ions in various plant organs, the accumulation of osmoprotectants in cells and an efficient antioxidant defense system in plants to combat oxidative stress. In order to evaluate the influence of metabolic responses on plant growth of two sorghum genotypes exhibiting sensitivity (CSF18) or tolerance (CSF20) to salinity (75 mM NaCl) the growth parameters, water relations, ion content ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), osmolytes ( $\gamma$ -aminobutyric acid, proline, free amino acids, and soluble sugars) and polyamines (putrescine, spermidine, and spermine), polyamine metabolism enzymes and metabolic profile were measured in stressed plants for 14 days. The salinity promoted growth reductions and induced increases in  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  content and decreases in  $\text{K}^+$  contents. The water status and  $\Psi_o$  was reduced by salt stress, but to reduce damage, especially in the CSF20, the osmotic adjustment was performed with osmolytes and PAs. The results showed that salinity induced an increase in putrescine contents in the sensitive genotype, and spermidine and spermine in the tolerant genotype, due to the regulation of polyamine-degrading enzymes (diamine oxidase and polyamine oxidase). Using metabolome analysis, proved a stimulation of polyamines biosynthesis (spermidine and cadaverine), accumulation of important compatible solutes such as sugars, polyols, and

proline, as well as tricarboxylic acid cycle intermediates were observed in the CSF20 genotype under salinity.

**Keywords:** Acclimation · GABA · Proline · Osmotic adjustment · *Sorghum bicolor* [L.] Moench

### 3.1 Introduction

Soil salinity is one of the most limiting abiotic stresses on crop productivity and a serious threat to agricultural sustainability globally. The problem of salinity and sodicity affects about 10% of the global arable land and nearly 35% of the irrigated lands, resulting in a total annual loss of \$ 27 billion dollars with regard to agricultural production (Shahid *et al.* 2018). Salinity affects crops in two ways: by decreasing soil osmotic potential, which results in reducing the water absorption; by the toxicity of certain elements, mainly sodium and chloride, which in high concentration cause physiological disturbances in plants (Kumar and Khare 2015). In addition, side effects emerge in response to salt stress, for example, severe nutritional imbalance may arise due to significant change in absorption, transport, assimilation, and distribution of nutrients in the plant; for example, excess  $\text{Na}^+$  inhibits the absorption of nutrients such as  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  (Assaha *et al.* 2017); and may also lead to an imbalance in the redox state of cells, generating oxidative stress through excessive production of reactive oxygen species (ROS). These ROS are highly reactive and can alter normal cellular metabolism through the oxidation of biomolecules (Demidchik 2015).

However, plants have developed mechanisms to prevent and alleviate the damage caused by excess salts in order to restore homeostatic conditions, resuming their growth even at reduced growth rates. Tolerance of plants to salinity depends on their ability to control the transport and accumulation of toxic ions, biosynthesis of compatible solute and activation of the antioxidant defense system (Liang *et al.* 2018; Isayenkov and Maathuis 2019).

The accumulation of compatible solutes is considered a basic strategy for the protection and survival of plants under abiotic stress. These compatible solutes have a low molecular mass that does not affect the normal biochemical process. These include amino acids such as proline and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), sugars, polyols, and polyamines (PAs), and other low molecular mass metabolites, which accumulate in significant amounts in response to high salinity (Rhodes *et al.* 2002; Kumar *et al.* 2018). Numerous functions for these metabolites have been suggested. In addition to the conventional role in cellular osmotic



adjustment (Suprasanna *et al.* 2016), the compatible solutes are also suggested to act as chemical chaperones, stabilizing and protecting the structure of proteins and enzymes (Hamilton; Heckathorn 2001; Kumar 2009; Sahet *et al.* 2016), as well as ROS scavengers (Jang *et al.* 2012; Lei *et al.* 2016; Sami *et al.* 2016). It has also been shown that some of these compatible solutes are very effective in reducing the extent of K<sup>+</sup> loss in response to salinity (Cuin and Shabala 2007a, 2007b).

Sorghum (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) is a plant originating from Africa. Sorghum adapted to a wide range of environments and produces under unfavorable conditions when compared to most other cereals grains. This cereal is incorporated in the human diet, in compounded feed for poultry, pig, beef cattle, pet food segment and recently in bioethanol production (Davila-Gomez *et al.* 2011; Ronda *et al.* 2018; Jiang *et al.* 2019). Selection for salt-tolerant plants and determination of underlying mechanisms for salt tolerance has become an important target for plant breeders, plant physiologists, and cellular and molecular biologists. In view of tolerance potential and economic value of sorghum, the present study assessed two sorghum genotypes (a sensitive and other tolerant to salinity) with respect to growth response, ions and organic solutes accumulation for osmotic adjustment, and metabolic profile of plants grown under salt stress to elucidate changes related to tolerance under specific environmental conditions. Thus, the objective of this study was to assess various physiological, biochemical changes and metabolic responses associated with the two genotypes subject to salinity during the beginning of its growth.

## **3.2 Material and methods**

### ***3.2.1 Plant material and growth conditions***

Sorghum seeds of salt-sensitive (CSF18) and salt-tolerant (CSF20) genotypes (Lacerda 2000) obtained from the Empresa Pernambucana de Pesquisa (IPA), were selected and disinfected with 1% sodium hypochlorite solution for 5 min and washed with distilled water. Subsequently, the sowing seeds were made in plastic containers with vermiculite. Seven-day-old seedlings were transferred to plastic basins containing 12 L of Clark nutrient solution (Clark 1982) and remained for seven days for acclimation. After this, the seedlings were transferred to buckets containing 5 L of nutrient solution (control) or nutrient solution with 75 mM NaCl (salt treatment). Plants were harvested 14 days after the start of the salt treatment. The experiment was carried out under greenhouse conditions. Averages daytime temperature

and relative humidity were 30 °C and 64%, respectively, while at night recorded averages of 28 °C and relative humidity 70%.

### ***3.2.2 Growth parameters, relative water content and leaf osmotic potential***

Sorghum plants were separated into shoots (leaves and stalks) and roots. In order to obtain the shoot and root dry masses, the plant material was then placed in an air circulation oven at 70 °C for 72 h until constant mass. The leaf area of each leaf was measured with a leaf area meter (Li-Cor, model LI-3100, USA).

The relative water content (RWC) was determined according to Čatský (1960) by weighing the leaves using an analytical balance. Fresh matter (FM) from each sample was obtained by weighing ten discs to the nearest 0.1 mg. In order to obtain the turgid mass (TM), discs were floated in deionized water inside a closed Petri dish. At the end of the imbibition period, leaf samples were placed in an oven at 70 °C for 72 h, in order to obtain the dry mass (DM). Values of FM, TM and DM were used to calculate RWC, using the equation:

$$\text{RWC (\%)} = \frac{\text{FM} - \text{DM}}{\text{TM} - \text{DM}} \times 100.$$

Osmotic potential ( $\Psi_o$ ) determination was measured according to the method of Blum (1989). Samples were prepared from 6 mm diameter discs excised from the fully expanded leaves and frozen at  $-18$  °C. Samples were later thawed for 1 h and 10  $\mu\text{L}$  was used for the determination of osmolality (solute concentration) in vapor pressure osmometer (WescorVapro<sup>®</sup> – Model 5600, USA). The  $\Psi_o$  was estimated through the Van't Hoff equation:  $\pi = -R T C$ , where R is the universal gas constant ( $0.00831 \text{ kg MPa mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ), T is the temperature in Kelvin, and C is the solute concentration.

### ***3.2.3 Inorganic solutes determination***

The inorganic ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Cl}^-$ ) were extracted from leaves and roots according to Cataldo *et al.* (1975) with minor modifications. Samples containing 50 mg of plant material with deionized water were incubated in a water bath at 45 °C for 1 h. The suspensions were centrifuged at  $5,000 \times g$  for 15 min and the supernatants were collected and filtered on filter paper.  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  contents were determined by flame photometry (Micronal<sup>®</sup>, model B462, Brazil) according to Malavolta *et al.* (1989). Chloride content was quantified by the mercury isothiocyanate [ $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ ] method as suggested by Gaines *et al.* (1984). The reaction mixture

consisted of 3.0 mL of sample extract and 0.5 mL of a solution formed by 13.2 mM Hg(SCN)<sub>2</sub> and 20.2% (w/v) ferric (III) nitrate nonahydrate. After a rest of 15 min, Cl<sup>-</sup> contents were determined by reading the absorbance at 460 nm wavelength on a UV-VIS spectrophotometer, using NaCl as standard. The results were expressed as  $\mu\text{mol Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  or  $\text{Cl}^- \text{g}^{-1} \text{DM}$ .

### 3.2.4 Polyamines enzyme activities

Arginine decarboxylase (ADC, EC 4.1.1.19) was performed according to Duan *et al.* (2008) with some modifications. Fresh leaves were homogenized in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 40  $\mu\text{M}$  pyridoxal phosphate (PLP), 5 mM dithiothreitol (DTT), 5 mM EDTA, 20 mM ascorbic acid and 0.1 % polyvinylpyrrolidone, at 4 °C. The homogenate was filtrated through cheesecloth and centrifuged at  $12,000 \times g$ , for 40 min at 4 °C. The reaction (contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 40  $\mu\text{M}$  PLP, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 40 mM L-arginine and sample) was carried out at 37 °C for 1 h and stopped with 0.5 ml of 20 % (v/v) trichloroacetic acid (TCA). Then, the reaction mixture was centrifuged at  $12,000 \times g$  for 10 min. ADC activity was assayed by measuring agmatine (Agm) produced by a decarboxylation reaction. Agm was derived by silylation with *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1 % trimethylchlorosilane (BSTFA + 1% TMCS) and determined by GCMS (Shimadzu, Tokyo, Japan). One microliter ( $\mu\text{L}$ ) of silyl-derivative samples was injected in split mode (1:25), using helium as a carrier gas at a constant flow of 1.48 mL/min on a RTX-5MS capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d.  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) from Restec (Bellefonte, PA, USA). The oven temperature was programmed to change in the following way: maintained at 150 °C for 2 min, raised 4 °C  $\text{min}^{-1}$  to 165 °C, raised 2 °C  $\text{min}^{-1}$  to 220 °C and finally raised 4 °C  $\text{min}^{-1}$  to 280 °C and held for 7 min. The temperatures of injector, interface, and ion source were, respectively, 150, 200 and 200 °C.

Diamine oxidase (DAO, EC 1.4.3.6) and polyamine oxidase (PAO, EC 1.5.3.11) activities were estimated spectrophotometrically based on the colorimetric assay of  $\Delta$ -pyrroline by reading the absorbance at 430 nm (Holmstedt *et al.* 1961). Fresh leaves were homogenized in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 5 mM DTT at 4 °C. The homogenate was centrifuged at  $16,000 \times g$  for 20 min at 4°C. The supernatant was used to measure the activities of DAO and PAO. The reaction mixture was composed of the sample and 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5 for DAO or 6.0 for PAO), 50 units of

catalase and 0.1 % 2-aminobenzaldehyde. Substrates used in the activity reactions were 10 mM putrescine for DAO and 5mM spermidine + 5 mM spermine for PAO. The reaction was carried out at 36 °C for 1 h, stopped with 1.0 ml of 10 % PCA and centrifuged at  $5000 \times g$  for 15 min. Control reactions were conducted with inactivated enzymes prepared by heating for 20 min at 70 °C. The results of the assays were expressed as nmol Agm  $\text{mg}^{-1}$  protein  $\text{h}^{-1}$  for ADC and nmol pyrroline  $\text{mg}^{-1}$  protein  $\text{h}^{-1}$  for DAO and PAO. Protein contents were determined according to the Bradford method (Bradford 1976).

### 3.2.5 HPLC analysis of polyamines

Free polyamines were extracted from fresh leaves by homogenization in cold 5% (v/v) perchloric acid at 4 °C on an orbital shaker for 60 min. The supernatant fraction was collected after centrifugation at  $27,000 \times g$  for 30 min. A second resuspension of the pellet was done under the same conditions. Aliquots of the supernatant were derivatized with benzoyl chloride and subsequently measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Duanet *al.* 2008). The benzoyl polyamines were separated on a reverse-phase C18 column at 30 °C (Shim-pack CLC-ODS, 150 mm x 4.6 mm) by HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan) with a mobile phase composed of methanol:water (64:36) at a flow rate of 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$ . Free putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) peaks were detected at 254 nm in an SPD-20A detector (Shimadzu, Tokyo, Japan) and quantified from standard curves. The results were expressed as  $\mu\text{mol}$  Put, Spd or Spm  $\text{g}^{-1}$  DM.

### 3.2.6 $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)

GABA content was determined according to Kitaoka e Nakano (1969) with slight modifications. GABA extraction from 20 mg leaf lyophilized powder was dissolved in 80%, shaken vigorously and filtered on filter paper. The sample extract was evaporated to dryness under vacuum at 35 °C and then dissolved with 3 mL of deionized water. The aliquot solution (100  $\mu\text{L}$ ) was mixed with borate buffer (pH 9.0), 6% (w/v) phenol reagent and 10% (w/v) sodium hypochlorite in ice bath. The mixture was placed in a water bath at 100 °C for 10 min. It was then cooled immediately by immersion in ice water for 5 min. The absorbance was measured at 630 nm after cooling in an ice bath for 5 min. GABA standard solution was prepared and assayed under the same conditions. The results were expressed as  $\mu\text{mol}$  GABA  $\text{g}^{-1}$  DM.

### 3.2.7 Proline

To determine free proline content, a total of 50 mg of leaf lyophilized powder samples from each treatment were homogenized in 3% (w/v) sulfosalicylic acid and then transferred to boiling water for 10 min (Bates *et al.* 1973). The homogenate was filtered through filter paper. Then, the extract, glacial acetic acid, and acidic ninhydrin were added into a test tube with a stopper. The mixture was heated at 100 °C for 1 h in a water bath. The reaction was then stopped by an ice bath. Proline was extracted with toluene and the absorbance of the fraction with toluene aspired from the liquid phase was read at 520 nm. Proline concentration was determined using a calibration curve and expressed as  $\mu\text{mol proline g}^{-1}\text{ DM}$ .

### 3.2.8 Free aminoacids

The free amino acids (FAAs) contents were determined according to the method of Yemm and Cocking (1955). The extracts used for the determination of FAAs were the same as those used for the determination of soluble sugars. The reaction mixture was formed by extract, 200 mM sodium citrate buffer (pH 5.0), 0.2 mM potassium cyanide in 2-methoxyethanol and 5% ninhydrin in 2-methoxyethanol. Threaded test tubes were heated 100 °C for 15 min. The reaction was stopped in an ice bath, then 60% (v/v) ethanol was added to each tube. Absorbance was quantified at 570 nm wavelength in a spectrophotometer. The concentrations of FAAs were calculated from a standard curve prepared with glycine and the results were expressed in  $\mu\text{mol FAAs g}^{-1}\text{ DM}$ .

### 3.2.9 Soluble sugars

Extraction and quantification of soluble sugars were performed according to Dubois *et al.* (1956), with minor modifications. Samples with about 50 mg of leaf lyophilized powder were extracted with 5 mL 80% (v/v) ethanol and incubated in a water bath at 75 °C for 60 min. Extracts were centrifuged at  $3,000 \times g$  for 10 min and the supernatant was recovered. The sediment was re-extracted with 80% ethanol and mixed with the first extraction product. For quantification, 500  $\mu\text{L}$  of samples were mixed with 5% phenol and concentrated sulfuric acid before absorbance reading was taken at 490 nm. A standard curve was established with D(+)-glucose and concentration was expressed as  $\mu\text{mol soluble sugars g}^{-1}\text{ DM}$ .

### **3.2.10 Metabolic profile**

The extraction and derivatization of metabolites by GCMS were performed according to the methodology described by Lisec *et al.* (2006). The extracts were prepared from samples of the first fully expanded leaf, which one was homogenized with methanol for 15 min at 70 °C. In each sample, 0.2 mg mL<sup>-1</sup> ribitol was added as an internal standard. The homogenate was centrifuged at 12,000 × *g* for 10 min and the supernatant individually transferred to microtubes containing chloroform/water (1:2 v/v). After another centrifugation at 3000 × *g* for 10 min, the upper phase (polar) was collected and dried in a vacuum concentrator. The metabolites were derivatized using methoxyamine hydrochloride (20 mg mL<sup>-1</sup>) dissolved in pyridine for 2 h at 37 °C and subsequently with *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide for 30 min at 37 °C.

Separation and identification of metabolites were performed according to Roessner *et al.* (2001). The analysis was performed in a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GCMS, QP-PLUS-2010, Shimadzu), using an RTX-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness) from Restek (Bellefonte, PA, USA). Sample volumes of 1 μL were then injected with a split ratio of 20:1. The temperature programming was set as follows: 2 min at 80 °C, followed by a ramp rate of 10 °C min<sup>-1</sup> to 315 °C, holding this temperature for 8 min. The temperatures of injector, interface, and ion source were 250, 230 and 250 °C, respectively. The mass spectra were performed in the full scan mode over an *m/z* range of 40-700.

Both chromatogram and mass spectral analysis were analyzed using the Xcalibur™ 2.1 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All compounds were identified based on their retention times and mass spectrum fragmentation in comparison with standards mass spectra. The relative value of each metabolite was determined by the division of their respective peak areas by internal standard peak area (ribitol) and, after divided by the fresh weight of the sample. Metabolites identified were categorized according to their chemical classes.

### **3.2.11 Experimental design and statistical analysis**

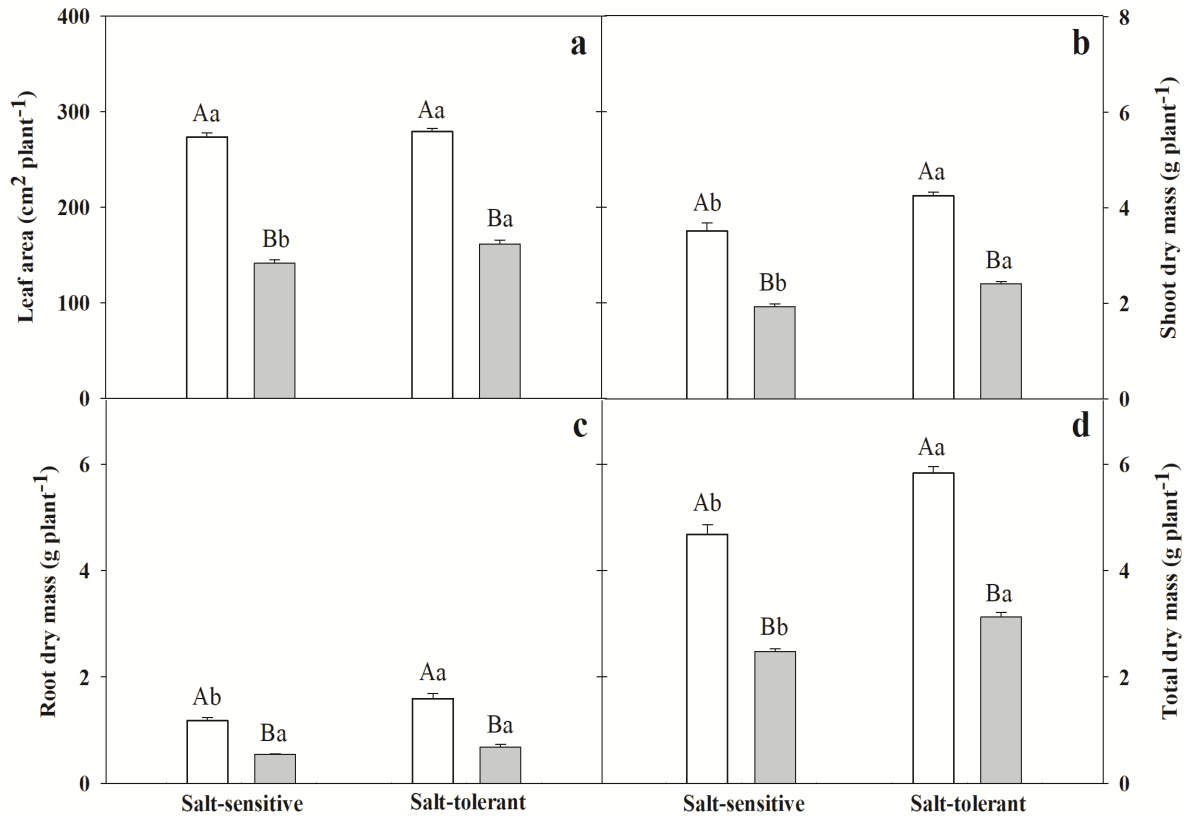
The experiment was conducted in a completely randomized design in a 2 × 2 factorial scheme, composed of two sorghum genotypes (CSF 20 and CSF 18), two salinity levels (0 and 75 mM NaCl). Each treatment was composed of five replicates (each repetition composed of two

plants). The data were submitted to a two-way analysis of variance (ANOVA, F-test). The mean treatment values were separated by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ), using the Sisvar<sup>®</sup> 5.3 software. For metabolic profile analysis, the contents of all metabolites were normalized using MetabolAnalyst (<http://www.metabolanalyst.ca/MetabolAnalyst/ModuleView.xhtml>). The identified metabolites were comprehensively compared by employing the principal component analysis (PCA) methods in addition to the Heatmap analysis.

### 3.3 Results

The application of NaCl to sorghum plants adversely influenced their growth and development (leaf area, shoot, root, and total dry masses) as compared with control plants (Fig. 1). In response to salt stress, a decrease of 44% and 22% were observed in the leaf area of salt-sensitive (CSF18) and salt-tolerant (CSF20) sorghum genotypes, respectively (Fig. 1a). Similarly, salt stress promoted a decrease in shoot dry mass by 45% in CSF18 and 43% in CSF20 (Fig. 1b). Root dry mass also exhibited significant reductions in both genotypes in response to stress (Fig. 1c). According to previous results, total plant dry mass significantly decreased in both genotypes, but salinity affected the salt-sensitive genotype more than the salt-tolerant genotype (Fig. 1d).

In both sorghum genotypes submitted to NaCl-salinity treatment showed an increase in their Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> contents, while an opposite trend was obtained with respect to K<sup>+</sup> content. The higher concentrations of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> were observed in CSF18 shoot under salinity, being 5 and 1.7 times higher than the respective control (Fig. 2a, e). In addition, the salinity caused a 10-fold and 6-fold increase in Na<sup>+</sup> in the roots of genotypes CSF20 and CSF18, respectively, since Na<sup>+</sup> content was significantly higher in CSF20 roots than CSF18 roots under salinity (Fig. 2b). Whereas the salinity provoked only a 58% increase of Cl<sup>-</sup> contents in CSF20 roots, while the dramatic increase of 112% was observed in CSF18 roots (Fig. 2f). Otherwise, in the shoot, while in CSF18 genotype the reduction in K<sup>+</sup> content by salinity was 41% and in CSF20 this reduction was 21%, already in the roots, the K<sup>+</sup> content was had 22 and 18% reduction by saline stress in CSF18 and CSF20, respectively (Fig. 2c, d).

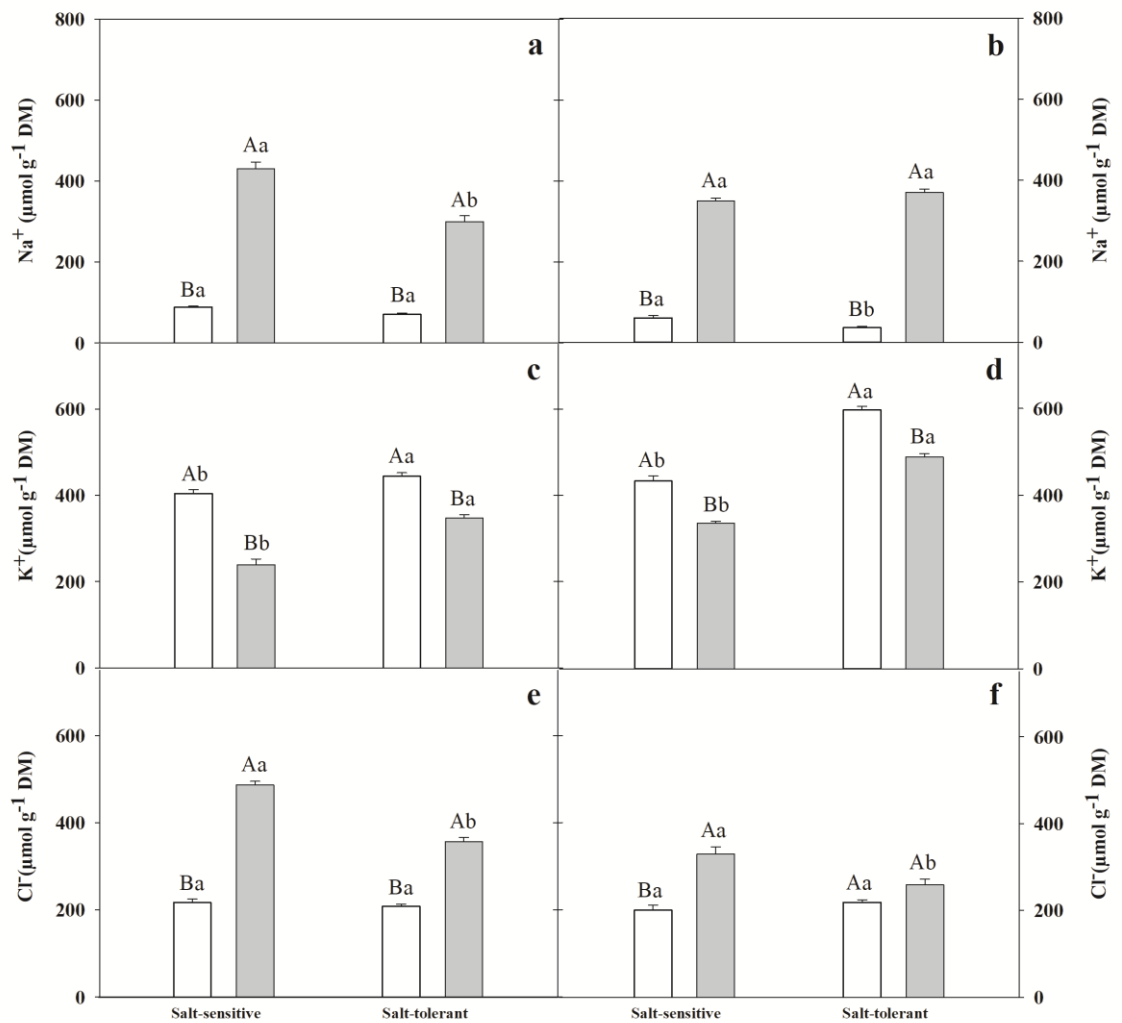


**Fig. 1** Leaf area (a), shoot dry mass (b), root dry mass (c) and total dry mass (d) in plants of salt-sensitive (CSF18) and salt-tolerant (CSF20) sorghum genotypes growing in the absence (white bars) or presence (gray bars) of 75 mM NaCl. Means followed by the same capital letter, for the same genotype, or lower-case letter, for the same salt stress treatment, do not differ statistically ( $p < 0.05$ ). Bars represent  $\pm$  standard error (SE) and means represent  $n = 5$ .

Salinity affected significantly RWC both genotypes, with reductions in relation to the control of 10 and 21% in genotypes CSF18 and CSF20, respectively (Fig. 3a). When challenged with salt,  $\Psi_o$  in CSF20 was significantly lower than CSF18 (Fig. 3b). The leaves of genotype tolerant leaves showed a reduction in osmotic potential by 44% under salinity, while a relatively small 11% decrease was observed in the leaves of sensitive genotype.

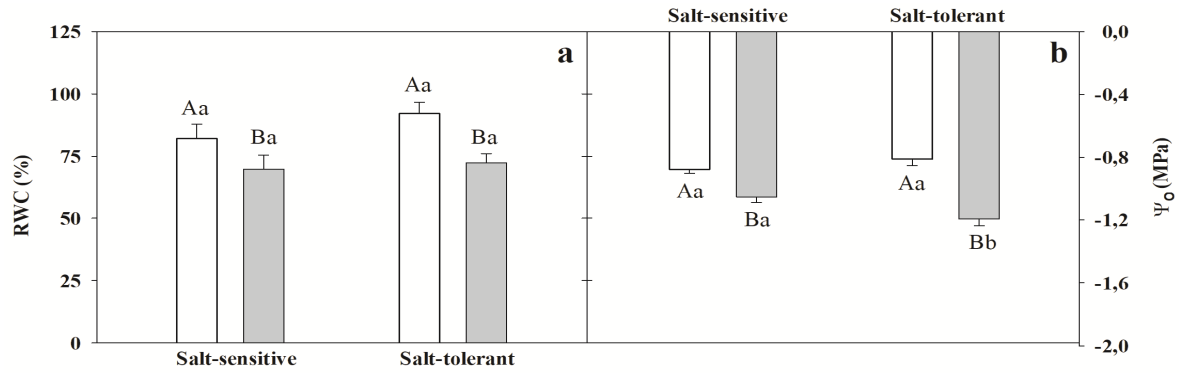
The ADC activity was not affected by salt stress (Fig. 4a). Salt stress caused a 16% decrease in CSF18 DAO activity, while CSF20 DAO activity remained unchanged (Fig. 4b). PAO activity was influenced by salt stress in both genotypes, however, this effect was more expressive in salt-sensitive genotype (Fig 4c). After 14 days of salinity, PAO activity increased by 22% in CSF20 and 115% in CSF18 as compared with respective control.





**Fig. 2** Na<sup>+</sup> content in shoot (a) and roots (b), K<sup>+</sup> content in shoot (c) and roots (d), and Cl<sup>-</sup> content in shoot (e) and roots (f) in plants of salt-sensitive (CSF18) and salt-tolerant (CSF20) sorghum genotypes growing in absence (white bars) or presence (gray bars) of 75 mM NaCl. Means followed by the same capital letter, for the same genotype, or lower-case letter, for the same salt stress treatment, do not differ statistically ( $p < 0.05$ ). Bars represent  $\pm$  standard error (SE) and means represent  $n = 5$ .

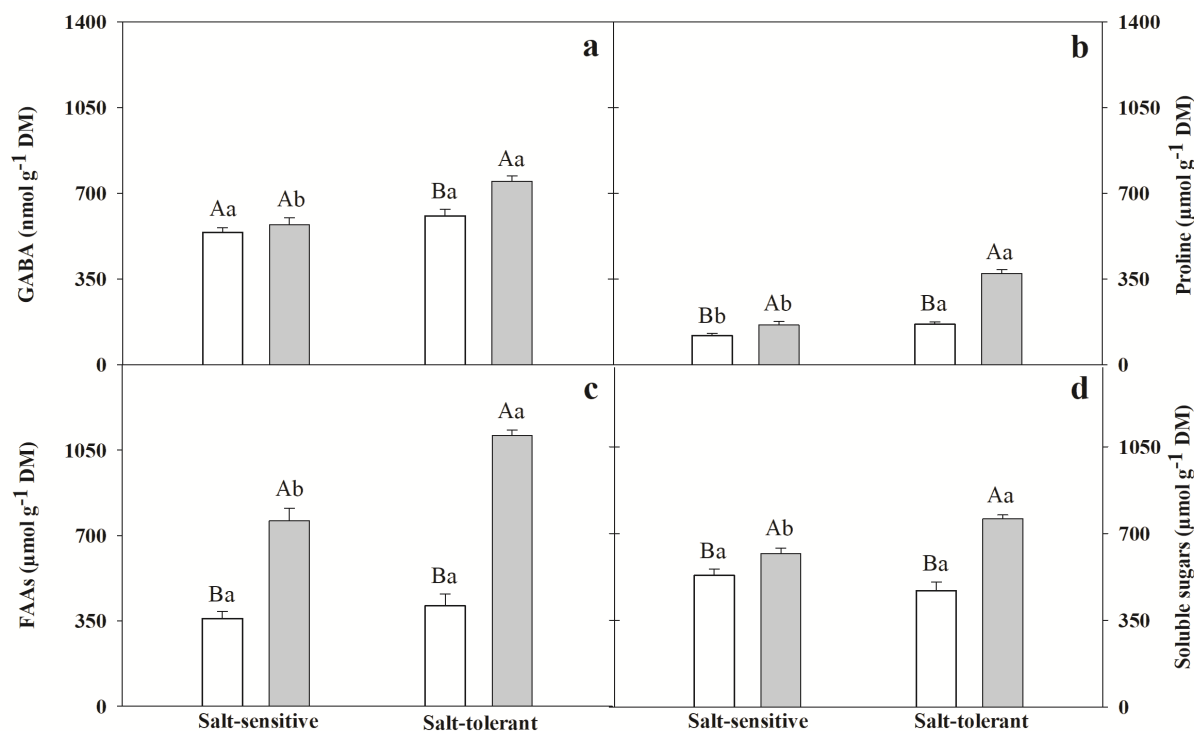
Among all endogenous free polyamines studied, Put was the predominant polyamine followed by Spd and Spm. Under salt stress, in salt-sensitive genotype, the Put content increased by 101% (Fig. 5a), whereas the Spd content showed a 10% reduction with respect to the control and the Spm content remained unchanged (Fig. 5b, c). Salinity caused an opposite effect in the salt-tolerant genotype, in this Put content decreased 41% (Fig. 5a), while Spd and Spm contents presented increases of 51% and 182%, respectively (Figs. 5b, c). The ratio of (Spm + Spd) / Put, which is related to increased tolerance to salt stress, enhanced in salt-tolerant genotype (CSF20) under salt stress, while in salt-sensitive genotype (CSF18) was sharply decreased (Fig. 5d).



**Fig. 3** Relative water content (RWC, a) and osmotic potential ( $\Psi_o$ , b) in leaves of salt-sensitive (CSF18) and salt-tolerant (CSF20) sorghum genotypes growing in the absence (white bars) or presence (gray bars) of 75 mM NaCl. Means followed by the same capital letter, for the same genotype, or lower-case letter, for the same salt stress treatment, do not differ statistically ( $p < 0.05$ ). Bars represent  $\pm$  standard error (SE) and means represent  $n = 5$ .

Exposure of sorghum to salt stress resulted in a significant increment in osmolytes compared with untreated control. The GABA content was 23% higher under NaCl treatment solely in salt-tolerant genotype comparing to control (Fig. 6a). The NaCl stress triggered the accumulation of proline by 35% and 126% in CSF18 and CSF20 genotypes, respectively, as compared with plants untreated (Fig. 6b). In addition, it was observed large increases in the free amino acid contents in both sorghum genotypes, however, this increase was higher in CSF20, about 170% of that of control versus 111% in CSF18 (Fig. 6c). In addition, salinity induced a marked increase in leaves soluble sugar contents of salt-tolerant genotype, about 62%, and just a 17% increase in salt-sensitive genotype, in relation to respective control (Fig. 6d).

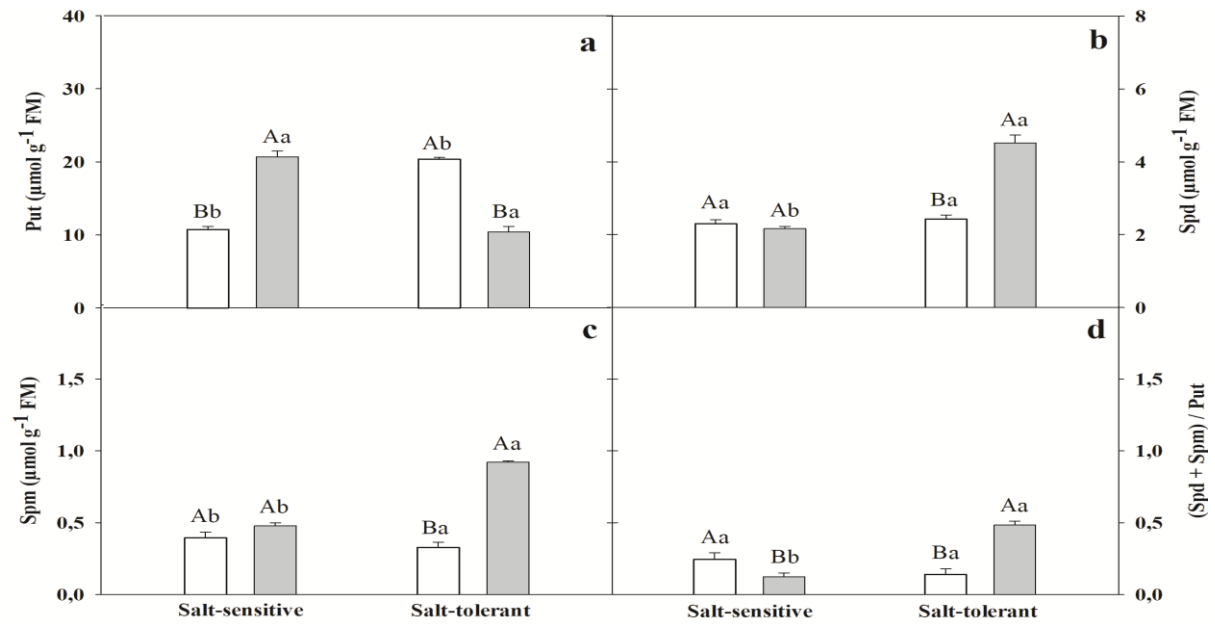
We compared the contents of each metabolite in the stressed plants to the levels in the control plants in order to determine the responses of each sorghum genotype to salt stress. The separation of metabolites analyzed by GC-MS resulted in a total of 62 kinds of metabolites, comprising 11 amino acids and derivatives, 17 organic acids, 31 sugars/polyols, and three polyamines quantified in leaf extracts of sorghum (Table S1). The highest metabolites ( $> 100$  nmol  $g^{-1}$  FM) were: sucrose, which was the highest metabolite in both genotypes, followed by D-cellobiose, 1,6-anhydro- $\beta$ -D-glucose, O-methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, D-glucose, 3-deoxyglucosone, glutamate, malic acid, and fumaric acid. In addition, the metabolites that presented lower concentrations ( $< 10$  nmol  $g^{-1}$  FM) were: trans-4-hydroxy-proline, 3-hydroxy benzoic acid, hexadecanoic acid, cadaverine, spermidine, D-arabinose, D-sorbitol, D-mannose, D-sorbose, trehalose, maltitol.



**Fig. 4**  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA, a), proline (b), free amino acids (FAAs, c) and soluble sugars (d) content in leaves of salt-sensitive (CSF18) and salt-tolerant (CSF20) sorghum genotypes growing in the absence (white bars) or presence (gray bars) of 75 mM NaCl. Means followed by the same capital letter, for the same genotype, or lower-case letter, for the same salt stress treatment, do not differ statistically ( $p < 0.05$ ). Bars represent  $\pm$  standard error (SE) and means represent  $n = 5$ .

In order to identify the different metabolites between CSF18 and CSF20 in response to salt stress, all metabolite profiles, consisting of 16 samples of sorghum leaves were performed by Heatmap analysis. According to Heatmap analysis (Fig. 7), an obvious separation could be observed between two genotypes.

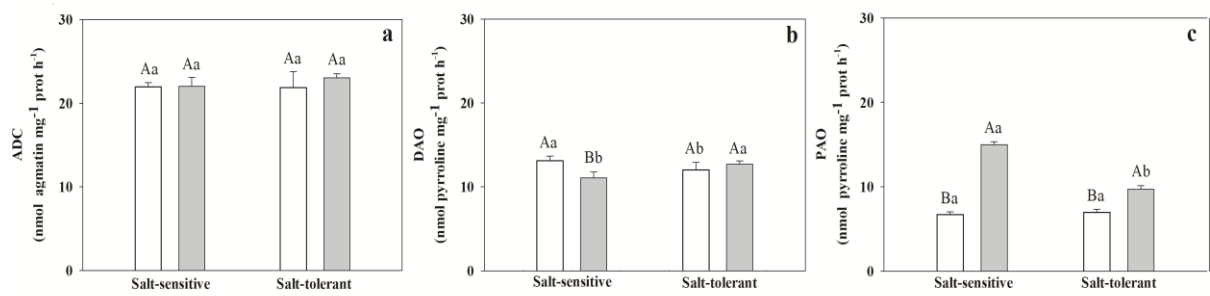
In order to reveal the effect of salt stress on metabolite alternation, principal component analysis (PCA) was conducted on those 62 metabolites. The PCA showed that the first two components accounted for 39.8% of the total variability in leaves (Fig. 8). Loading plots were generated to determine the variation of individual metabolites in the experiment (Fig. 9). In addition, the PCA showed that both controls and CSF18 salt-treated not could be clearly separated from each other (Fig. 8). This overlap reveals that such clusters share similar metabolic pathways. The main metabolites contributing to the PC1 included isoleucine, fructose-1,6-diphosphate, maleic acid and glucose (Fig. 9). The PC2 could clearly separate the CSF20 salt treatment samples from the other groups (Fig. 8).



**Fig. 5** Free putrescine (Put, a), spermidine (Spd, b), spermine (Spm, c) contents and (Spd+Spm)/Put ratio (d) in leaves of salt-sensitive (CSF18) and salt-tolerant (CSF20) sorghum genotypes growing in absence (white bars) or presence (gray bars) of 75 mM NaCl. Means followed by the same capital letter, for the same genotype, or lower-case letter, for the same salt stress treatment, do not differ statistically ( $p < 0.05$ ). Bars represent  $\pm$  standard error (SE) and means represent  $n = 5$ .

According to the metabolic profile analysis, the metabolites of sorghum leaves were significantly changed under salt stress. We focused on 37 metabolites that affected the metabolic pathways (Table S1). These included seven amino acids, ten organic acids, eighteen related to soluble sugar and sugar alcohol metabolism and two PAs. In the CSF20 genotype, six amino acids were upregulated (valine, serine, proline, leucine, tryptophan, and trans-4-hydroxy-proline), two were downregulated (glutamate and isoleucine), and two have not changed by salinity (asparagine and homoserine). While in the CSF18 genotype, only three amino acids were upregulated (glycine, tryptophan, and trans-4-hydroxy-proline), three others were downregulated (glutamate, isoleucine, homoserine), and five have not changed by salinity (valine, serine, proline, leucine, and asparagine).

Salt stress increased the contents of some soluble sugars mostly in CSF20, such as D-glucose, D-fructose, D-erythrose, 1,3-dihydroxyacetone, 2-deoxy-D-glucose, *O*-methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, isomaltose and D-lactulose in comparison with the control. On the other hand, CSF18 showed an increase in the contents of D-gulose, maltitol, D-ribose-5-phosphate, D-cellobiose, lactitol, and melibiose under salinity stress. Differently, the levels of fructose-1,6-diphosphate, raffinoseglyceric acid, D-fructose, and D-erythrose in CSF18 were downregulated, while in CSF20 the soluble sugars downregulated were D-talose, 1,6-anhydro- $\beta$ -D-glucose, 3-deoxyglucosone, fructose-1,6-difosphate, sucrose, and raffinose.

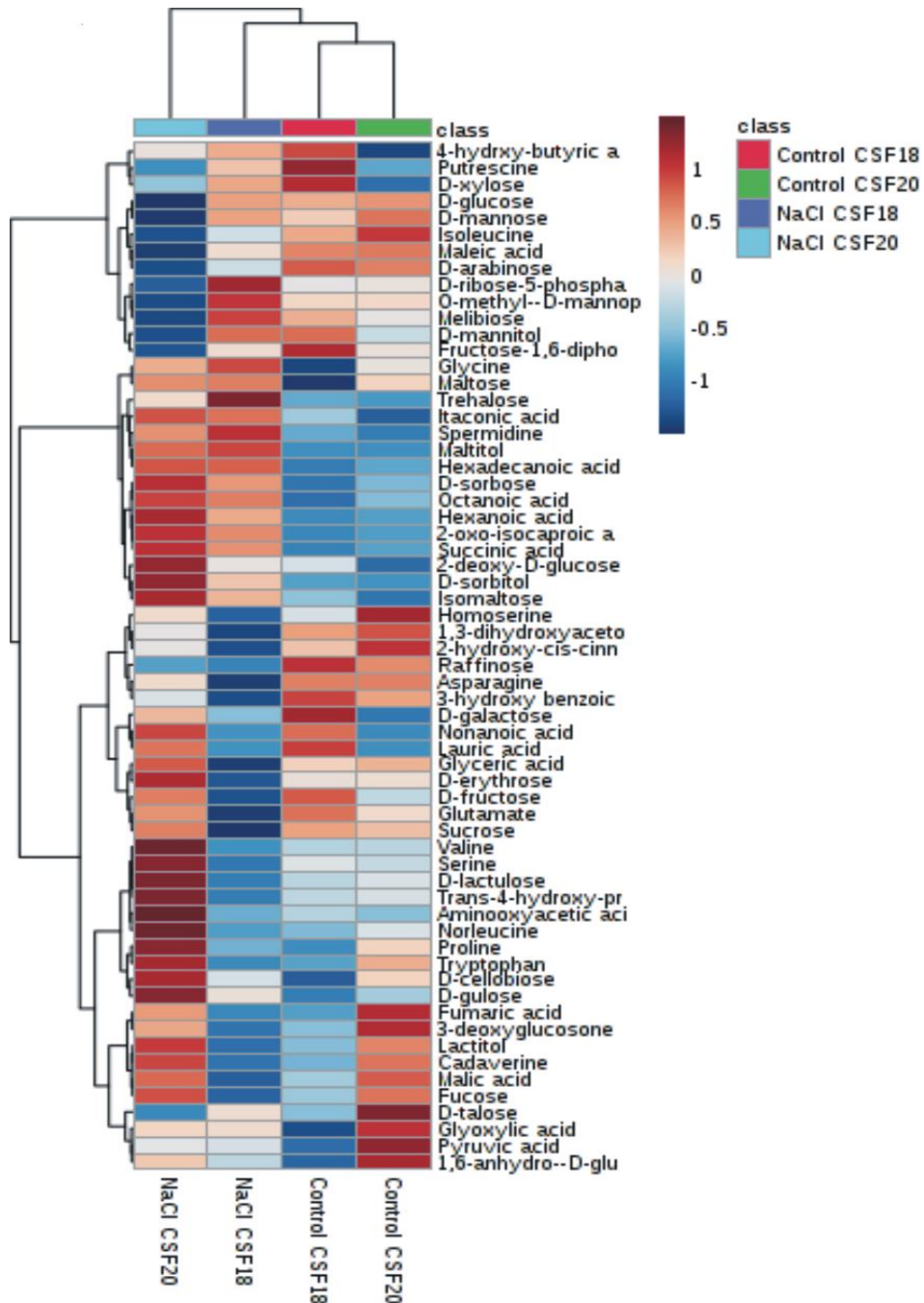


**Fig. 6** Arginine decarboxylase (ADC, a), diamine oxidase (DAO, b) and polyamine oxidase (PAO, c) activity in leaves of salt-sensitive (CSF18) and salt-tolerant (CSF20) sorghum genotypes growing in the absence (white bars) or presence (gray bars) of 75 mM NaCl. Means followed by the same capital letter, for the same genotype, or lower-case letter, for the same salt stress treatment, do not differ statistically ( $p < 0.05$ ). Bars represent  $\pm$  standard error (SE) and means represent  $n = 5$ .

In sorghum leaves, it was also observed that more than a third of the content organic acids increased significantly under salinity in CSF20 (succinic acid, aminooxyacetic acid, itaconic acid, hexanoic acid, 2-oxo-isocaproic acid, octanoic acid, and nonanoic acid), while the CSF18 genotype showed an increase in maleic acid, pyruvic acid, succinic acid, itaconic acid, hexanoic acid, 2-oxo-isocaproic acid, octanoic acid, and hexadecanoic acid levels in response to salinity. The contents of maleic acid and nonanoic acid were significantly decreased in CSF20 and CSF18, respectively. In addition, of the three polyamines quantified in sorghum leaves (Table S1), two were upregulated by salinity (Cad and Spm) but the Spd content no change in the CSF20 genotype, while in the CSF18 genotype, the Put was downregulated by salinity, without any change in Cad and Spd contents.

### 3.4 Discussion

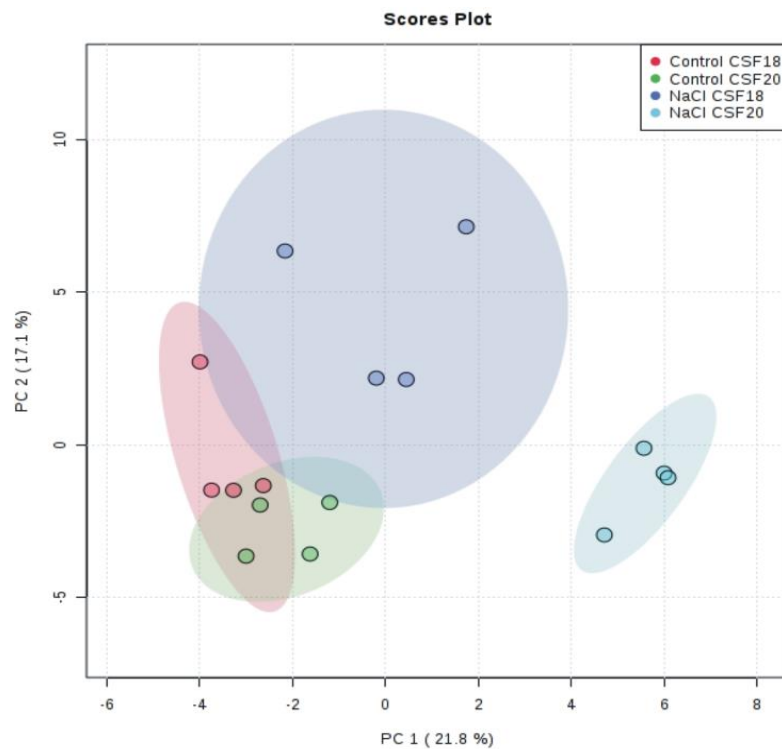
The adverse effects caused by salinity on the growth are attributed to the fact that excess salt is known to retard growth as a result of osmotic stress, ion toxicity, nutritional imbalance and oxidative stress (Zhu 2002; Liang *et al.* 2018). Excess absorption of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  ions by plants of both genotypes caused a reduction in biomass and the leaf area (Fig. 1). Although salinity significantly affected the leaf area and dry matter of the whole plant, the reduction was less pronounced in CSF20, salt-tolerant genotype. These growth responses to salinity have been described by many different authors (Chartzoulakis *et al.* 2002; Valdez-Aguilar *et al.* 2011; Borrelli *et al.* 2018).



**Fig. 7** Heatmap of metabolite concentrations in leaves of salt-sensitive (CSF18) and salt-tolerant (CSF20) sorghum genotypes growing in the absence (NaCl) or presence (Control) of 75 mM NaCl. Each colored cell represents metabolites concentrations for each treatment group (n=4). Samples are color-coded as the legend on the figure. Red and blue colors represent the increase and decrease of metabolites using a false-color scale, respectively.

Accumulation of  $\text{Na}^+$  or  $\text{Cl}^-$  ions have been suggested to be one of the primary causes of photosynthetic decline, reducing the growth of salt-stressed plants (Tavakkoli *et al.* 2010; Kumar and Khare 2015). In this study, the tolerant genotype accumulated  $\text{Na}^+$  preferentially in roots (Fig. 2b), while the sensitive genotype accumulated more  $\text{Na}^+$  in leaves (Fig. 2a). The  $\text{Cl}^-$  content was higher in the sensitive genotype, both shoot and root (Fig. 2e, f). Although the

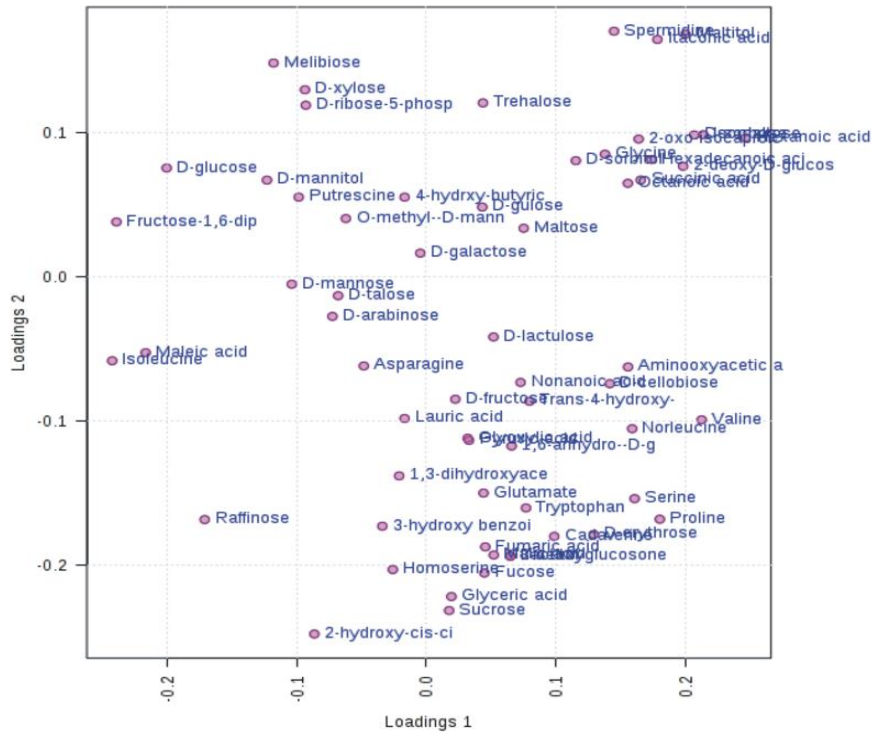
reduction in  $K^+$  content was observed in both genotypes and all the plant parts the decrease was less expressive in tolerant genotype (Fig. 2c, d). Our results closely resemble those obtained by Lacerda *et al.* (2001), when studying the effect of salinity in two genotypes of forage sorghum, suggesting that part of the salt tolerance differences between these genotypes may lie in their differences in  $K^+/Na^+$  selectivity and  $K^+$  transfer to shoots. Therefore,  $K^+$  is considered a crucial element in plant metabolic regulation, promoting  $Na^+$  exclusion and osmotic adjustment in CSF20, and there is still a positive and important correlation between the ability of root tissue to retain  $K^+$  and salinity stress tolerance as observed in many plant species (Ashraf *et al.* 2008; Munns and Tester 2008; Shabala *et al.* 2017).



**Fig. 8** Principal component analysis (PCA) of metabolic profiles in leaves of salt-sensitive (CSF18) and salt-tolerant (CSF20) sorghum genotypes. Scores Plot of the first principal component (PC1) and the second principal component (PC2) indicating the clustering of samples into four groups according to PC1.

In terms of RWC, the two genotypes responded similarly to salinity by decreasing their water status (Fig. 3). However, the leaves of CSF20 plants presented constitutively lower osmotic potential than those of CSF18 plants (Fig. 3b). Under saline conditions, plants often alter their metabolic activity to maintain turgor pressure that changes with an excessive amount of toxic ions. In this experiment, plants of the tolerant genotype presented a higher osmoregulatory capacity by increasing their osmolyte levels. In ascending order of contribution, free amino acids and soluble sugars were the primary compatible solutes in

osmotic adjustment, followed by proline and GABA (Fig. 4). The osmolytes operate in osmoregulation for the purpose of maintaining cell turgor in living organisms, as well as they contribute to stress tolerance by protecting important macromolecules and cell structures (Yang and Guo 2018).



**Fig. 9** Principal component analysis (PCA) of metabolic profiles in leaves of salt-sensitive (CSF18) and salt-tolerant (CSF20) sorghum genotypes. Loading plot of metabolites to the PC1 and PC2.

The presence of salt in the soil solution reduces the ability of the plant to take up water and this leads to cellular water deficit, resulting in decreased growth. The response to osmotic stress mainly involves osmotic adjustments, which is critical for maintaining cell turgor. Thus, plants synthesize osmolytes, as soluble sugars and various amino acids, to promote osmotic balance (Munns and Tester 2008). The content of free amino acids and soluble sugars increased in the plants of both genotypes subjected to salinity (Fig. 4c, d). However, the levels of these two compatible solutes were higher in CSF20 under saline conditions. In addition to the role in maintaining osmotic equilibrium, the accumulation of these compounds may be a crucial salt-tolerant mechanism because it provides energy and important intermediates that participate in various metabolic pathways.

It has been widely reported that proline accumulation in plants is a common physiological response to abiotic stresses (Hasegawa *et al.* 2000; Parida and Das 2005). In



this study, although the two genotypes accumulated more proline with the salinity, CSF20 possessed comparatively higher amounts of proline than CSF18, suggesting that this metabolite possesses an efficient role as osmoprotectant under salt stress (Fig. 4b). Studying the effect of salicylic acid (SA) in lentil plants under salt stress, Misra and Saxena (2009) observed that the proline content increased in the combined treatment of SA and NaCl as compared to other treatments. The acclimation of barley plants to saline and water stress was dependent on proline accumulation by the roots; proline content increased by 3-fold under NaCl stress and 2-fold under water stress, as compared to control (Meringer *et al.* 2016).

The GABA is a non-proteinogenic amino acid that accumulates in various plant species under environmental stresses (Seifikalhor *et al.* 2019). Many studies have assigned different functions to this metabolite as osmoregulation (Cheng *et al.* 2018), regulation of cytosolic pH (Crawford *et al.* 1994), contribution to the nitrogen storage (Scott-Taggart *et al.* 1999), protection against oxidative stress (Vijayakumari and Puthur 2016) and signaling molecule (Palanivelu *et al.* 2003; Ramesh *et al.* 2017). Regardless of the effect of GABA on sorghum plants, we can infer it is a stress-related metabolite, considering that its level has increased in plants of the salt-tolerant genotype when challenged with NaCl (Fig. 4a). Therefore, GABA may have contributed to CSF20 osmoregulation and signaling in response to salinity, as suggested by Al-Quraan *et al.* (2013) studying the effect of various abiotic stresses including high temperature (42 °C), low temperature (4 °C), salinity (NaCl), and osmotic stress (mannitol).

Another well-studied group of metabolites are PAs, proposed to protect and maintain the structure and function of cellular components in response to different types of stress, such as salt (Sudhakar *et al.* 2015), drought (Ebeed *et al.* 2017) and heavy metals (Shahid *et al.* 2018) stress. In this study, free PAs content increased significantly under salt stress and that CSF20 accumulated greater amounts of Spd and Spm (Fig. b, c) than CSF18, which accumulated more Put (Fig. 5a). Free Pas content may have contributed to both osmotic adjustment and protection of cellular structures in response to salinity and a possible explanation might be related to the presence of three and four amino groups in Spd and Spm, respectively, giving greater protective efficiency rather than two positive charges in Put, which allow interaction with other negatively charged biomolecules (Puyang *et al.* 2016). Enhancement of salt tolerance due to elevated endogenous PAs content has also been found in other crops so that endogenous levels of Spd and Spm are important indicators of salinity tolerance (Paul and Roychoudhury 2017; Freitas *et al.* 2018; Wu *et al.* 2018).

In parallel, we have studied metabolic control at levels of PAs, analyzing their anabolic and catabolic pathways. The ADC pathway is the major route of polyamine synthesis in plants under different stresses (Pathak *et al.* 2014). In this study, none of the genotypes showed ADC activity altered by salinity (Fig. 6a). Regarding salinity, previous study reports indicate that an increase of ADC activity is required for the synthesis of Put, Spd, and Spm (Mo and Pua 2002; Yin *et al.* 2016). Nevertheless, in leaves of lupin, which the content of Put and Spd significantly increased in the stress conditions, the activity of ADC was similar to control (Legocka and Kluk 2005). Li *et al.* (2016) evaluating the differential tolerance of two zoysiagrass cultivars to salinity found that ADC activity did not respond to salt stress, while ODC activity (an enzyme related to another Put synthesis pathway) of both cultivars was enhanced under salt stress. This implies that the Put synthesis by the ODC pathway may explain the higher levels of Spd and Spm in the salt-tolerant genotype, whereas those PAs are produced in subsequent reactions from Put and aminopropyl residues, which are gradually provided by methionine.

The catabolism of PAs in plants is primarily dependent on the action of amine oxidases and plays a critical signaling role. The known amine oxidases include DAO and PAO. DAO oxidizes Put into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ammonia, and 4-aminobutanal, which undergoes cyclization to generate pyrroline (PYRR). Then, PYRR is converted into GABA by the action of pyrroline dehydrogenase (PYRR-DH). GABA is a major intermediate of PAs oxidation (Wang *et al.* 2019).

In our experiment, DAO activity decreased in the CSF18 genotype and remained unchanged in the CSF20 genotype when plants were challenged with salt stress (Fig. 6b). Interestingly, the GABA content in CSF20 increased in saline treatment compared to control (Fig. 4a), while we expected GABA levels were like each other according to DAO enzymatic activity (Fig. 6b). Regarding CSF18 genotype, GABA contents were not modified by salinity (Fig. 4a), despite the decrease in DAO activity (Fig. 6b). We suppose that enzyme glutamate decarboxylase (GAD) is also involved in GABA synthesis in salt-stressed plants. In turn, the GABA catabolism provides a substrate in form of succinate to both the tricarboxylic acid cycle and the electron transport chain (ETC), so it would be a useful metabolic substrate to provide carbon skeletons and energy under salinity (Jacoby *et al.* 2011). Indeed, our results showed that in plants subjected to saline stress, the level of succinate in CSF20 leaves was superior to those found in CSF18 leaves (Table S1).

PAO catalyzes the formation of 4-aminobutanal or 3-aminopropyl-4-aminobutanal from the deamination of Spd or Spm, respectively, along with 1,3-diaminopropane and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(Wang *et al.* 2019). PAO activity was increased due to salinity in both genotypes (Fig. 6c). However, PAO activity was higher in CSF20 than in salt-sensitive genotype. There is a lack of information on PAs catabolism and the importance of their role in stressed plants remains inconclusive. Moschou *et al.* (2008) suggested that a crucial point in plant stress tolerance is the ratio of PAs catabolism to PAs anabolism, where anabolism must overcome catabolism of PAs. This could partially explain why the tolerant genotype sustained higher levels of Spd and Spm than the salt-sensitive genotype. Thus, enhanced stress tolerance in sorghum plants is associated with high PAs biosynthesis and a decrease in their catabolism.

Specific metabolic changes in plants subjected to salinity stress include the accumulation of amino acids, sugars, polyols or organic acids such as tricarboxylic acid cycle intermediates. According to our metabolic profile results, CSF20 genotype plants showed significant accumulation of primary metabolites in response to salt stress (Table S1). Besides the best-known marker of salt tolerance, the proline; other amino acids, such as valine, serine and tryptophan increased too. The changes of these amino acids were generally smaller in CSF18. Studying two green gram cultivars differing in salt tolerance, Misra *et al.* (2006) reported variation in the amount of amino acids was genotype and organ dependent; the shoot maintained a high content in salt-tolerant cultivar, specifically accumulated certain amino acids during the salt stress, including alanine, arginine, glutamic acid, glutamine, proline, cysteine, isoleucine, asparagine, and serine for a cellular osmotic adjustment aimed to keep the leaf turgor during this stress condition.

Our results showed that the sugar contents of salt-tolerant genotype increased in response to salinity (Table S1). However, a decrease in sugar levels was found in CSF18. Among the sugars found in CSF20, eight were upregulated, like glucose and fructose. Solely raffinose and fructose-1,6-diphosphate were downregulated in shoots of CSF20. Respecting the CSF18 genotype six sugars were upregulated, among which lactitol and cellobiose, and two were downregulated (fructose and erythrose). Activation of sugar biosynthesis pathway is found to be more prominent in salt-tolerant plants than the salt-sensitive ones. Rice suspension-cultured cells during the osmotic phase of the salt stress (100 mM NaCl for 1–24 h) show accumulation of galactose, glucose, fructose and phosphorylated sugars (Liu *et al.* 2013). Although the presence of phosphate sugars was scarce, the existence of other sugars such as polyols, among them with a significant increase in erythritol, lactulose, and isomaltose, contributed to the defense mechanisms, since these molecules can function as osmolytes and ROS scavengers (Bose *et al.* 2014).

The differential accumulation of the organic acids may contribute to the resistance strategies due to their role in the stress response pathways. Compared to CSF18 plants subjected to stress, CSF20 accumulated more metabolites associated with tricarboxylic acid cycle in leaves (Table S1), such as succinate and malate (although there was no significant difference compared to control), and other acids such, as hexanoic, a resistance inducer that protect tomato plants against biotic stress by activating the jasmonic acid and salicylic acid pathways (Scalschi *et al.* 2013; Finiti *et al.* 2014) and octanoic, a precursor to lipoic acid which has antioxidative property (Pérez-López *et al.* 2010). A natural depletion of many organic acids to occur during a stressful challenge because the plants must adjust their energy demand to maintain their growth, allocation of carbonic skeletons intermediates to amino acids or sugars pool required as compatible solutes. In short, the CSF18 plants were able to a small increase proline, free amino acids and soluble sugars contents under salt stress (Fig. 6b-c). However, no improvement in growth performance was observed, since biomass was more affected by salinity in CSF18 than in CSF20.

Lefèvre *et al.* (2001) studied the importance of ionic and osmotic components of salt stress on content of free PAs in the rice seedling of two tolerant (Pokkali) and sensitive (IKP) cultivars found that Cad was present at higher concentrations over Put content under water stress, but was not affected by salt stress. While our results agree with the metabolic profile findings, revealing an increase of Put and Spd in CSF18 and CSF20, respectively, under salt stress conditions, the presence of Cad, a diamine synthesized by decarboxylation of lysine, in the metabolic profile suggests that other polyamines may be involved in salinity tolerance process. Cad was induced by salinity in the salt salt-tolerant genotype, while in the salt salt-sensitive genotype its content did not change when compared to the control. The role of Cad is still little known but previous studies reported Cad-induced stress mitigation. Kuznetsov *et al.* (2007) showed that Cad accumulation mediated by NaCl plays a protective role in the adaptation of *Mesembryanthemum crystallinum* L. to salt stress. In addition, Liu *et al.* (2014) studied the effect of exogenous Cad in *Arabidopsis* mutants defective in polyamine metabolic genes could observe that Cad treatment activates spermine synthase and induced Spm accumulation. It is interesting to note that the effect of salt stress on Spm content differed greatly among genotypes. Indeed, Cad-mediated activation of Spm synthesis may have been more efficient in CSF20, than that observed in the salt salt-sensitive genotype.

### 3.5 Conclusion

The two sorghum genotypes studied, CSF18 and CSF20, were affected by salt stress, although the higher tolerance to salinity of CSF20 was confirmed. (i) Analysis of physiological and biochemical parameters indicates that this tolerance difference is due in part to differences in Na<sup>+</sup> accumulation in the roots and shoot, besides compatible solutes (amino acids, soluble sugars, proline, GABA, and PAs). (ii) The metabolic profiles of CSF18 plants under saline and control conditions were very similar, but the exposure of the CSF20 genotype to salinity, by contrast, provoked unique metabolic responses, so the CSF20 genotype presents plasticity in the face of environmental changes. These alterations were associated with tricarboxylic acid cycle intermediates and the metabolisms of sugars, amino acids, and polyamines, that may be related to their multiple functions in plant growth.

***Author contribution statement***

DFO and EGF conceived and designed the study. DFO performed experiments and analysis. DFO, LSL, and EGF analyzed the data, edited and finalized the paper. All authors reviewed the manuscript.

***Acknowledgments*** This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

**Compliance with ethical standards**

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

### 3.6 Supplementary material

**Table S1** - Concentrations (nmol/g FM) of amino acids, organic acids, polyamines and sugars/ polyols in leaves of two sorghum genotypes with differential tolerance to salinity CSF 18 (sensitive) and CSF 20 (tolerant), growing in absence or presence of 75 mM NaCl.

METABOLITE	CSF18		CSF20		METABOLITE	CSF18		CSF20	
	0 mM	75 mM	0 mM	75 mM		0 mM	75 mM	0 mM	75 mM
<b>AMINO ACIDS</b>					Spermidine	1.75 Aa	2.82 Ab	2.37 Ba	8.60 Aa
Glycine	44.59 Bb*	54.64 Aa	50.39 Aa	52.32 Aa	<b>SUGARS / POLYOLS</b>				
Valine	6.63 Aa	5.15 Ab	6.68 Ba	16.07 Aa	D-glucose	100.57 Bb	114.10 Ab	125.56 Ba	136.32 Aa
Serine	8.06 Aa	7.84 Ab	7.34 Ba	19.64 Aa	D-fructose	53.57 Aa	19.31 Bb	23.71 Bb	47.03 Aa
Proline	6.22 Aa	7.64 Ab	8.13 Ba	19.60 Aa	D-galactose	10.61 Aa	8.68 Aa	8.14 Aa	9.61 Aa
Glutamate	123.96 Ab	57.14 Bb	149.37 Aa	112.08 Ba	D-arabinose	9.25 Aa	7.53 Ab	8.86 Aa	10.22 Aa
Isoleucine	23.11 Ab	15.28 Ba	34.13 Aa	7.03 Bb	D-xylose	13.24 Aa	10.18 Ba	5.57 Ab	7.11 Ab
Leucine	7.41 Aa	7.12 Ab	8.01 Ba	10.78 Aa	D-mannitol	14.79 Aa	14.78 Aa	10.42 Ab	11.84 Aa
Asparagine	11.43 Aa	11.52 Aa	11.35 Aa	10.89 Aa	D-sorbitol	7.20 Aa	5.57 Aa	6.94 Aa	7.63 Aa
Tryptophan	11.16 Bb	18.30 Ab	18.22 Ba	25.38 Aa	D-mannose	6.97 Aa	7.54 Aa	7.97 Aa	7.72 Aa
Homoserine	10.17 Aa	6.15 Bb	11.28 Aa	11.67 Aa	D-sorbose	3.27 Aa	5.27 Aa	3.75 Ba	6.25 Aa
Trans-4-hydroxy-proline	2.03 Ba	1.65 Ab	2.13 Ba	6.14 Aa	Fucose	5.73 Ab	6.75 Ab	11.21 Aa	12.35 Aa
<b>ORGANIC ACIDS</b>					D-talose	13.30 Ab	9.91 Aa	18.13 Aa	11.24 Ba
Pyruvic acid	21.99 Bb	43.51 Aa	36.21 Ba	46.06 Aa	D-gulose	7.05 Bb	14.27 Aa	7.64 Ba	9.43 Ab
Fumaric acid	134.76 Ab	71.74 Bb	145.75 Aa	117.85 Ba	D-erythrose	19.45 Aa	14.35 Bb	20.95 Ba	62.27 Aa
Succinic acid	7.04 Ba	9.59 Ab	8.09 Ba	12.83 Aa	1,3-dihydroxyacetone	37.59 Aa	13.31 Bb	23.22 Bb	32.91 Aa
Malic acid	192.41 Aa	83.93 Bb	159.21 Ab	156.27 Aa	Maltitol	0.00 Bb	10.56 Aa	0.00 Bb	6.50 Ab
Maleic acid	65.82 Ba	81.80 Aa	68.60 Aa	17.75 Bb	2-deoxy-D-glucose	13.02 Ba	26.71 Ab	4.23 Bb	61.49 Aa
2-hydroxy-cis-cinnamic acid	10.59 Ab	6.10 Ba	18.42 Aa	8.50 Ba	1,6-anhydro-β-D-glucose	104.13 Bb	144.04 Ab	239.22 Aa	171.61 Ba
3-hydroxybenzoic acid	9.98 Aa	5.29 Ba	7.87 Ab	5.64 Ba	3-deoxyglucosone	87.02 Bb	118.79 Ab	195.68 Aa	140.23 Ba
Glyoxylic acid	27.79 Aa	17.43 Bb	28.08 Aa	31.87 Aa	O-methyl-α-D-mannopyranoside	146.52 Ba	170.88 Ab	145.95 Ba	200.61 Aa
Aminooxyacetic acid	7.07 Ab	6.03 Ab	11.29 Ba	15.98 Aa	Fructose-1,6-diphosphate	90.20 Aa	44.27 Ba	42.10 Ab	17.62 Bb
Itaconic acid	7.40 Ba	25.69 Ab	5.58 Ba	53.90 Aa	D-ribose-5-phosphate	9.13 Ba	16.04 Aa	9.38 Aa	9.69 Ab
4-hydroxy-butyric acid	9.14 Ab	8.60 Aa	12.28 Aa	8.25 Ba	Sucrose	200.03 Bb	241.04 Aa	288.61 Aa	240.82 Ba
Hexanoic acid	1.06 Bb	1.36 Ab	5.07 Ba	11.65 Aa	D-cellobiose	61.38 Bb	148.24 Aa	91.27 Ba	121.17 Ab
2-oxo-isocaproic acid	13.13 Bb	33.99 Ab	25.78 Ba	45.55 Aa	Maltose	28.74 Aa	32.84 Aa	27.82 Aa	39.77 Aa
Octanoic acid	4.55 Ba	12.76 Ab	6.29 Ba	26.66 Aa	Isomaltose	4.68 Ba	10.99 Ab	4.81 Ba	24.01 Aa

Nonanoic acid	18.04 Aa	7.78 Bb	13.35 Bb	19.83 Aa	Trehalose	8.27 Ba	11.82 Aa	8.18 Aa	9.39 Aa
Lauric acid	16.52 Aa	13.60 Aa	13.38 Aa	14.83 Aa	Lactitol	13.26 Bb	84.04 Aa	33.13 Ba	76.99 Ab
Hexadecanoic acid	1.40 Ba	9.74 Aa	1.73 Ba	10.15 Aa	D-lactulose	30.11 Aa	31.06 Ab	26.30 Ba	73.11 Aa
<b>POLYAMINES</b>					Melibiose	16.44 Ba	21.58 Aa	13.47 Aa	12.30 Ab
Putrescine	21.40 Aa	15.84 Ba	6.73 Ab	5.94 Ab	Raffinose	41.33 Aa	22.80 Ba	31.82 Ab	14.75 Bb
Cadaverine	1.95 Ab	2.87 Ab	4.90 Ba	9.97 Aa	Glyceric acid	23.21 Aa	10.65 Bb	14.30 Ab	17.81 Aa

\* Means followed by the same capital letter, for the same genotype, or lower-case letter, for the same salt stress treatment, do not differ statistically at 5% probability by F-test. Means of four replicates (n = 4).

## **4 CAPÍTULO III – Influência da salinidade na fotossíntese e no sistema de defesa antioxidativo em dois genótipos de sorgo**

### **RESUMO**

A salinidade afeta diversos processos fisiológicos centrais, como a fotossíntese. Anomalias na fotossíntese causadas pelo excesso de sais podem levar ao estresse oxidativo, promovendo a deterioração das células vegetais. Este estudo foi conduzido para determinar o efeito do estresse salino sobre os parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, conteúdo de pigmentos fotossintéticos, integridade das membranas celulares, conteúdo de íons superóxido e peróxido de hidrogênio, além de analisar componentes do sistema de defesa antioxidativo em dois genótipos de sorgo que apresentam tolerância diferencial à salinidade. Os genótipos CSF18 (sensível à salinidade) e CSF20 (tolerante à salinidade) foram submetidos ao estresse com NaCl a 75 mM durante 14 dias. Os resultados revelaram que estresse salino não afetou as trocas gasosas, exceto a assimilação de CO<sub>2</sub> e a EUA em CSF20. A salinidade teve efeito negativo na fluorescência da clorofila *a* em CSF18. A capacidade em responder ao estresse oxidativo causado pela salinidade apresentou diferenças entre os dois genótipos. Embora o vazamento de eletrólitos tenha aumentado em ambos os genótipos, a peroxidação lipídica foi mais intensa em CSF18 que em CSF20, devido aos elevados conteúdos de superóxido e peróxido de hidrogênio. CSF20 foi capaz de induzir as enzimas antioxidativas com mais eficiência quando submetido ao estresse salino, além de manter níveis mais altos de ascorbato e glutatona. Os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* e os resultados de peroxidação lipídica e sistema antioxidativo estão em correlação com o fato do genótipo CSF20 ser tolerante à salinidade.

### **4.1 Introdução**

A fotossíntese, juntamente com o crescimento celular, está entre os processos primários a serem afetados pela salinidade (MUNNS; JAMES; LÄUCHLI, 2006). Os efeitos podem ser diretos, como a diminuição da disponibilidade de CO<sub>2</sub> causada por limitações de difusão através dos estômatos ou alterações do metabolismo fotossintético ou podem surgir efeitos secundários, como o estresse oxidativo (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

O estresse oxidativo ocorre sob condições severas de estresse e se caracteriza pelas altas taxas de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), excedendo o potencial de eliminação do sistema de defesa celular. A acumulação de altas concentrações de EROs é



potencialmente prejudicial para as células, causando danos a biomoléculas como DNA, proteínas, lipídios, clorofilas, membranas entre outras (DEMIDCHIK, 2015). As EROs incluem os radicais de oxigênio, como superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ), e as formas moleculares, como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), os quais são tóxicos para o metabolismo das células vegetais (DEL-RÍO, 2015).

Para prevenir ou aliviar os danos provocados pelas EROs, as plantas desenvolveram um sistema de defesa antioxidante, que mantém os níveis de EROs sob controle. O sistema de defesa antioxidante compreende os componentes enzimáticos e não enzimáticos. As células vegetais são normalmente protegidas contra esse efeito por um complexo sistema antioxidante como antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos (DEMIDCHIK, 2015). Os antioxidantes não enzimáticos incluem duas classes gerais: i) antioxidantes lipossolúveis associados às membranas, como  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno, e ii) redutores solúveis em água, como glutathiona, ascorbato e fenólicos. As enzimas antioxidativas compreendem dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), e redutase da glutathiona (GR), que em conjunto eliminam  $\cdot\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  em cloroplasto e mitocôndrias. As enzimas antioxidativas catalase (CAT) e peroxidases (POX) são capazes de remover  $\text{H}_2\text{O}_2$  em peroxissomos, citosol e outros compartimentos extra e subcelulares (GILL; TUTEJA, 2010; MHAMDI *et al.*, 2010).

O sistema não enzimático de defesa consiste em moléculas antioxidativas como a glutathiona, ascorbato, tocoferóis, carotenoides e fenólicos e auxilia na proteção contra os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo (KASOTE *et al.*, 2015) e desempenham papel fundamental na eliminação de radicais livres nas plantas doando elétrons ou hidrogênio (ASADA, 2006).

O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos do estresse salino sobre os processos fotossintéticos, a cinética de emissão de fluorescência da Chl *a* e os desdobramentos causados pelo estresse oxidativo em folhas de dois genótipos de sorgo com tolerância diferencial à salinidade.

## **4.2 Material e métodos**

### ***4.2.1 Material vegetal e condições experimentais***

Sementes de sorgo sensíveis (CSF18) e tolerantes à salinidade (CSF20) (Lacerda, 2000), obtidas da Empresa Pernambucana de Pesquisa (IPA), foram selecionadas e desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% por 5 min e lavadas com água

destilada. água. Posteriormente, as sementes foram semeadas em recipientes plásticos com vermiculita. Após sete dias, as mudas foram transferidas para bacias plásticas contendo 12 L de solução nutritiva Clark - CNS (Clark, 1982) e permaneceram por sete dias para aclimação. Depois disso, as mudas foram transferidas para baldes contendo 5 L de CNS (duas plantas por balde) ou CNS com NaCl 75 mM (tratamento com sal). As plantas foram coletadas 14 dias após o início do tratamento com sal. O experimento foi realizado em casa de vegetação. As médias de temperatura diurna e umidade relativa foram de 30 °C e 63%, respectivamente, enquanto à noite registraram médias de 28 °C e umidade relativa de 70%.

#### **4.2.2 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a**

Os parâmetros de assimilação de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração interna de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), taxa de transpiração ( $E$ ) e eficiência no uso da água (EUA) foram mensurados, utilizando um analisador de gás no infravermelho (IRGA, Li-Cor-6400-XT, USA). As medições foram realizadas em folhas completamente expandidas, sob concentração de CO<sub>2</sub> (aproximadamente 380  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ) e densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD, 1.200  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) constantes.

Os parâmetros de fluorescência da clorofila  $a$  foram mensurados por meio de um fluorômetro portátil (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, UK) acoplado ao IRGA. Foram determinados os seguintes parâmetros: fluorescência máxima ( $F_m$ ) e variável ( $F_v$ ), após adaptação a 30 min de escuro; fluorescência máxima ( $F_m'$ ) e no estado de equilíbrio dinâmico ( $F_s$ ), na presença de luz; e fluorescência basal ( $F_0'$ ), após o estado de excitação do fotossistema I. Tais resultados foram utilizados para calcular as seguintes variáveis fotoquímicas (BILGER; SCHREIBER; BOCK, 1995):

eficiência quântica potencial do PSII =  $(F_v / F_m)$ ;

eficiência quântica efetiva do PSII ( $\Phi\text{PSII}$ ) =  $(\Delta F / F_m')$ ;

coeficiente de extinção fotoquímica ( $qP$ ) =  $(F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$ ;

coeficiente de extinção não fotoquímica ( $NPQ$ ) =  $(F_m - F_m') / F_m'$ ;

taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) =  $\Delta F / F_m' \times \text{PPFD} \times 0,5 \times 0,84$ .

#### **4.2.3 Pigmentos fotossintéticos**

A extração dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a*, *b* e totais e dos carotenoides) foi feita de acordo com Wellburn (1994). Três discos foliares medindo 1,0 cm de diâmetro retirados da segunda folha completamente expandida, foram colocados em tubos de ensaio revestidos com papel alumínio, contendo 2,0 mL de uma solução de dimetilsulfóxido saturada com CaCO<sub>3</sub>. Em seguida, as amostras foram incubadas a 65 °C em banho-maria, por 30 min. Decorrido esse tempo, e após terem atingido a temperatura ambiente, os discos foliares foram retirados e o extrato de pigmentos foi utilizado para a determinação da absorbância a 665, 649 e 480 nm. Por fim, os discos foliares foram lavados, para a retirada do excesso de solução, e secos em estufa a 60 °C, por 48 h, para a obtenção de sua massa seca. Os teores de clorofila *a* (Chl<sub>a</sub>), clorofila *b* (Chl<sub>b</sub>), clorofila total (Chl<sub>t</sub>) e carotenoides foram calculados com base nas seguintes equações:

$$\text{Chl}_a = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649});$$

$$\text{Chl}_b = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665});$$

$$\text{Chl}_t = (7,15 \times A_{665}) + (18,71 \times A_{649});$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times \text{Chl}_a - 53,78 \times \text{Chl}_b) / 220,$$

onde A representa a absorbância em um respectivo comprimento de onda, sendo expressos em mg g<sup>-1</sup> MS.

#### 4.2.4 Vazamento de eletrólitos e peroxidação de lipídios

O vazamento de eletrólitos (VE) foi avaliado nas folhas completamente expandidas e nas raízes de sorgo após a respectiva incubação de 10 discos foliares (1 cm de diâmetro), e de cerca de 100 mg do terço distal da raiz em água deionizada, a 25 °C, por 6 h. Decorrido esse tempo, a condutividade elétrica inicial (CE1) do meio foi medida, com auxílio de um condutivímetro (Micronal, modelo AJX-515), e, logo após, as amostras foram incubadas em banho-maria a 100 °C, por 30 min. Após alcançarem a temperatura ambiente novamente, a condutividade elétrica final (CE2) foi medida. O VE foi estimado através da seguinte equação:  $\text{VE} = (\text{CE1}/\text{CE2}) \times 100$  (SINGH *et al.*, 2007).

A peroxidação dos lipídios de membrana foi mensurada através do teste para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), proposto por Heath e Packer (1968). O extrato utilizado nessa determinação foi obtido após pulverização de tecido fresco de folha completamente expandida com nitrogênio líquido, seguida por maceração, a 4 °C, com ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Logo após, o homogenato foi centrifugado a 12.000 × g, por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante,

imediatamente homogeneizado com uma solução composta por ácido tiobarbitúrico a 0,5% e TCA a 20%. A mistura foi mantida em banho-maria a 100 °C, por 30 min, e resfriada em banho de gelo. Os teores de TBARS foram estimados após a subtração entre leituras de absorvância em 532 nm e 600 nm e utilizando-se seu coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### **4.2.5 Teores de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e de radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ )**

Os extratos para determinação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram preparados segundo a metodologia descrita por Cheeseman *et al.* (2006), com algumas modificações. Aproximadamente 0,5 g do tecido fresco de folhas foram pulverizados com nitrogênio líquido e homogeneizadas a 4 °C em solução tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 6,3. O homogenato foi centrifugado a  $12.000 \times g$  por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram imediatamente determinados como descrito por Fernando e Soysa (2015), com algumas modificações. O meio de reação para a determinação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi constituído por uma alíquota de extrato vegetal, fenol a 12 mM, 4-aminoantipireno a 0,5 mM, tampão fosfato de potássio a 84 mM (pH 7,0) e HRP (*horseradish peroxidase*) a  $1 \text{ U mL}^{-1}$ . A mistura foi agitada e mantida em banho-maria a 37 °C, por 30 min. Os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram determinados através de leituras de absorvância em 505 nm, tendo-se como referência uma curva padrão obtida a partir de concentrações crescentes de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

O extrato para a determinação dos teores de  $\text{O}_2^-$  foi obtido pela pulverização de 0,5 g de tecidos frescos de folhas com nitrogênio líquido, seguido por homogeneização, a 4 °C, com solução tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8 (XU *et al.*, 2010). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a  $12.000 \times g$  por 15 min, a 4 °C, e o sobrenadante coletado e utilizado imediatamente. A mistura reacional consistiu de uma alíquota do extrato e de uma mistura composta por solução tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8 e hidroxilamina (1:1). Os tubos contendo a mistura foram agitados e, após permanecer em repouso por 20 min, foi adicionado 1,0 mL de uma mistura composta por sulfanilamida e N-naftiletlenodiamina (1:1), sendo novamente mantidos em repouso por 15 min. Decorrido esse período, os teores de  $\text{O}_2^-$  foram mensurados a partir de leituras de absorvância a 530 nm e tendo como padrão uma curva obtida a partir de soluções com concentrações crescentes de  $\text{NaNO}_2$  (ELSTNER; HEUPEL, 1976).

#### **4.2.6 Enzimas antioxidativas**

O extrato para a determinação da atividade das enzimas SOD, CAT e APX foi obtido a partir da homogeneização em almofariz, a 4 °C, de 1 g de folha pulverizada em N<sub>2</sub> líquido de folhas com solução tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM. Para a extração da APX, a solução tampão continha, adicionalmente, ascorbato a 2 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 × g, a 4 °C, durante 15 min, e o sobrenadante resultante foi coletado e utilizado nas atividades.

A atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi mensurada pelo método fotoquímico descrito por Beauchamp e Fricovich (1971), que produz azul de formazana, resultante da fotorredução do nitro azul tetrazólio (NBT). Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da fotorredução do NBT a 560 nm.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foi medida de acordo com Nakano e Asada (1981), monitorando a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm ( $\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A mistura de reação continha tampão fosfato de potássio a 25 mM (pH 7,0), EDTA a 0,1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1,0 mM, AsA a 0,25 mM e extrato da enzima.

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com Havir e McHale (1987), através do decréscimo da absorbância em 240 nm, devido ao consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e usando seu coeficiente de extinção molar ( $\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

A atividade peroxidase da glutaciona (GPx, EC 1.11.1.9) foi medida de acordo com Takeda, Nakano e Shigeoka (1993), monitorando a oxidação do NADPH a 340 nm. Aproximadamente 100 mg de tecido foliar foram pulverizados com N<sub>2</sub> líquido e, em seguida, homogeneizados em 1 ml de solução tampão Tris-HCl a 100 mM (pH 8,2), contendo sorbitol a 10% (p/v) e GSH a 5 mM, usando um almofariz e pistilo. O homogenato foi centrifugado por 15 min a 12.000 × g e o sobrenadante foi utilizado na atividade. A mistura da reação continha 100 mM de solução tampão Tris-HCl (pH 8,2), glutaciona reduzida (GSH) a 1 mM, NADPH a 0,5 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,5 mM, 1 unidade de GR e o extrato enzimático.

#### ***4.2.7 Teores de ascorbato e glutaciona***

O ascorbato e a glutaciona foram extraídos mediante a pulverização de 250 mg de folhas com nitrogênio líquido, seguida pela homogeneização com solução de ácido tricloroacético (TCA) a 5%, a 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 × g, por 15 min, e o sobrenadante, coletado.

A determinação dos teores de ascorbato total [(ASC + DHA; O DHA foi reduzido a ASC devido à presença de ditioneitol (DTT)] foi feita através de leituras de absorvância em 525 nm, em decorrência da formação de um complexo entre biperidil e o íon  $\text{Fe}^{2+}$ , sendo este último resultante da redução do  $\text{Fe}^{3+}$  pelo ascorbato presente no meio de reação (LAW; CHARLES; HALLIWELL, 1983). Adotou-se esse mesmo procedimento para a determinação de ASC, diferindo apenas quanto ao DTT, que esteve ausente nesse caso. Nas duas determinações, teve-se como padrão uma curva obtida a partir de soluções com concentrações crescentes de ácido ascórbico. Os teores de DHA foram obtidos pela diferença entre os de ascorbato total e os de ASC. O *status* redox do ascorbato foi determinado pela razão entre ASC e o ascorbato total (ASC + DHA).

Os teores de glutatona total (GSH + GSSG; a GSSG presente no extrato foi inicialmente reduzida a GSH pela ação da enzima GR) foram determinados através de leituras de absorvância em 412 nm, resultantes da reação da GSH com o DTNB [ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzóico)], e usando-se o coeficiente de extinção molar para o TNB ( $\epsilon = 14,15 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), que é produto desta reação (GRIFFITH, 1980). Esse mesmo procedimento foi adotado para a determinação de GSH, diferindo apenas pela ausência de GR (GRIFFITH, 1980). Os teores de GSSG foram determinados pela diferença entre os de glutatona total e GSH, e o *status* redox da glutatona foi expresso pela razão entre GSH e a glutatona total (GSH + GSSG).

#### **4.2.8 Análise estatística**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2 \times 2$ , composto por dois genótipos de sorgo (CSF 20 e CSF 18), dois níveis de salinidade (0 e 75 mM de NaCl). Cada tratamento foi composto por cinco repetições (cada repetição composta por duas plantas). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o software Sisvar 5.3.

### **4.3 Resultados**

O estresse salino induziu aumento significativo na taxa de assimilação do  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) do genótipo tolerante, enquanto plantas do genótipo CSF18 não sofreram influência da salinidade, quando comparadas ao controle (Tabela 1). A salinidade não teve efeito significativo na condutância estomática ( $g_s$ ), concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e transpiração

(*E*) em ambos os genótipos estudados, embora o genótipo CSF18 tenha apresentado maiores valores de  $g_s$  e *E* quando comparado ao genótipo CSF20 (Tabela 1). A eficiência no uso da água (EUA) do genótipo CSF18 não apresentou qualquer alteração significativa em função da salinidade, enquanto a do genótipo CSF20 aumentou 27,4% (Tabela 1).

**Tabela 1** – Trocas gasosas de plantas de dois genótipos de sorgo com diferentes graus de tolerância ao estresse salino, CSF18, sensível e CSF20, tolerante, crescendo na ausência ou na presença de NaCl 75 mM.

	<i>A</i>	$g_s$	$C_i$	<i>E</i>	EUA
<b>CSF 18</b>					
0 mM	32,065 Aa	0,192 Aa	118,777 Aa	6,282 Aa	5,106 Aa
75 mM	34,067 Aa	0,212 Aa	116,987 Aa	6,227 Aa	5,464 Ab
<b>CSF 20</b>					
0 mM	30,311 Ba	0,167 Aa	111,657 Aa	4,533 Ab	6,601 Ba
75 mM	38,327 Aa	0,150 Ab	109,628 Aa	4,018 Ab	8,411 Aa

*A* – taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $g_s$  – condutância estomática ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $C_i$  – concentração interna de CO<sub>2</sub> ( $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); *E* – transpiração foliar ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); EUA – eficiência do uso da água ( $\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ ). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para o mesmo genótipo, ou minúscula, para o mesmo tratamento de estresse salino, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados representam a média de cinco repetições ( $n = 5$ ).

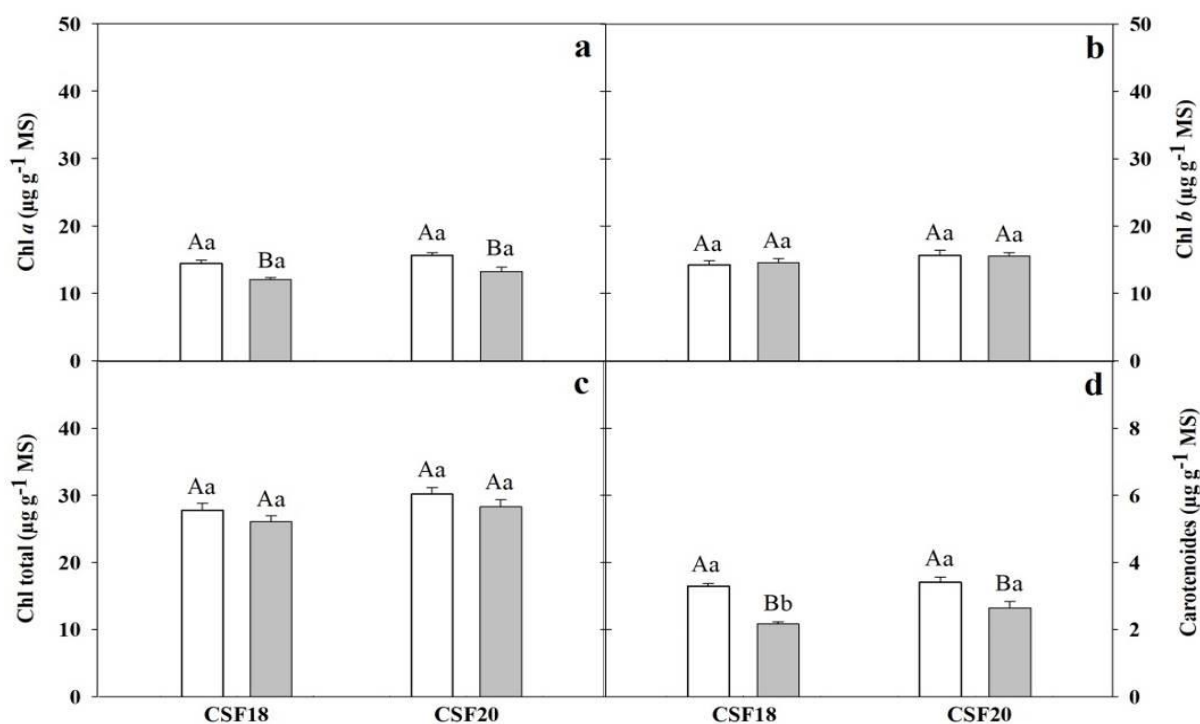
A eficiência quântica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) não sofreu influência do tratamento salino no genótipo tolerante, enquanto no CSF18 essa variável diminuiu significativamente (Tabela 2). A salinidade reduziu o rendimento quântico efetivo do PSII ( $\Phi\text{PSII}$ ) somente no genótipo CSF18 (Tabela 2). O tratamento salino causou efeitos contrários no coeficiente de extinção fotoquímica ( $qP$ ) dos dois genótipos: enquanto no genótipo sensível (CSF18) houve uma redução significativa nessa variável, no genótipo tolerante (CSF20), houve um aumento significativo no (Tabela 2). O tratamento salino aumentou os valores do coeficiente de extinção não fotoquímica ( $NPQ$ ) de ambos os genótipos, entretanto, o aumento em  $NPQ$  foi mais expressivo no genótipo tolerante à salinidade, sendo 25,2% *versus* 14,4%, no genótipo tolerante. A taxa de transporte de elétrons (ETR) não foi influenciada pela salinidade e se apresentou com valores semelhantes nos dois genótipos (Tabela 2).

A salinidade causou pequena redução nos conteúdos de Chl *a* de ambos os genótipos, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 1a). A salinidade não causou alteração nos conteúdos de Chl *b* e clorofila total de ambos os genótipos (Figura 1b, c). Por outro lado, o conteúdo de carotenoides foi significativamente reduzido em resposta ao estresse salino, sofrendo reduções de 34% no genótipo CSF18 e de 21% no CSF20 (Figura 3d).

**Tabela 2** – Fluorescência da clorofila *a* em plantas de dois genótipos de sorgo com diferentes graus de tolerância ao estresse salino, CSF18, sensível e CSF20, tolerante, crescendo na ausência ou na presença de NaCl 75 mM.

	$F_v/F_m$	$\Phi PSII$	$qP$	$NPQ$	ETR
<b>CSF 18</b>					
0 mM	0,776 Aa	0,528 Aa	0,655 Aa	0,817 Ba	203,7 Aa
75 mM	0,577 Bb	0,334 Bb	0,514 Bb	0,935 Aa	214,4 Aa
<b>CSF 20</b>					
0 mM	0,778 Aa	0,497 Aa	0,572 Bb	0,615 Bb	202,4 Aa
75 mM	0,779 Aa	0,469 Aa	0,755 Aa	0,770 Ab	212,9 Aa

$F_v/F_m$  - Eficiência quântica máxima do PSII;  $\Phi PSII$  - rendimento quântico efetivo do PSII,  $qP$  - coeficiente de extinção fotoquímica,  $NPQ$  - coeficiente de extinção não fotoquímica e ETR - taxa de transporte de elétrons ( $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para o mesmo genótipo, ou minúscula, para o mesmo tratamento de estresse salino, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados representam a média de cinco repetições ( $n = 5$ ).

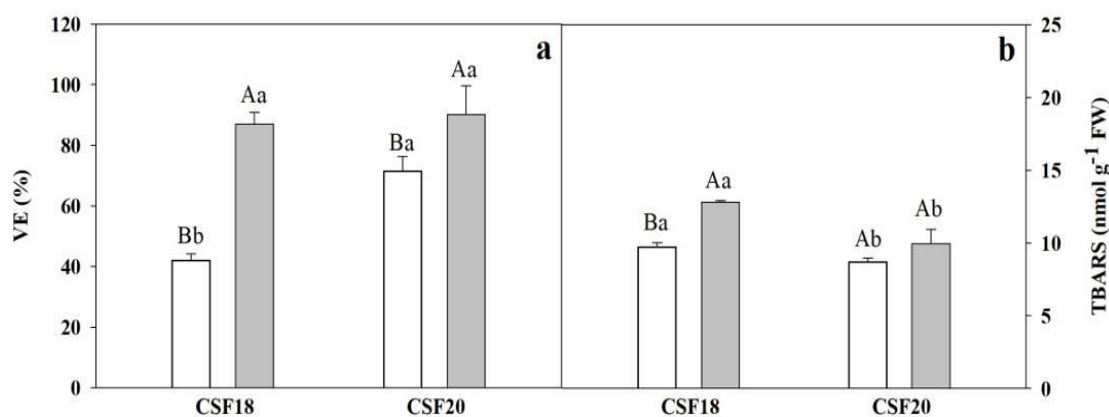


**Figura 1** - Teores de clorofila *a* (Chl*a*, **a**), clorofila *b* (Chl*b*, **b**) e clorofila total (Chl *total*, **c**) e carotenoides (**d**) em folhas de dois genótipos de sorgo com diferentes graus de tolerância ao estresse salino, CSF18, sensível e CSF20, tolerante, crescendo na ausência (barras brancas) ou na presença (barras cinzas) de NaCl 75 mM. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para o mesmo genótipo, ou minúscula, para o mesmo tratamento de estresse salino, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados representam a média de cinco repetições ( $n = 5$ ).

Para avaliar a extensão do dano oxidativo induzido pelo estresse salino, foram determinados o vazamento de eletrólitos (VE) e os teores de substâncias reativas ao ácido barbitúrico (TBARS), os quais são considerados indicadores de dano celular. O tratamento das



plantas de sorgo com NaCl a 75 mM, causou aumentos em VE de ambos os genótipos, em comparação com seus respectivos controles (Figura 2a), enquanto o conteúdo de TBARS teve aumento significativo somente no genótipo CSF18 (Figura 2b).

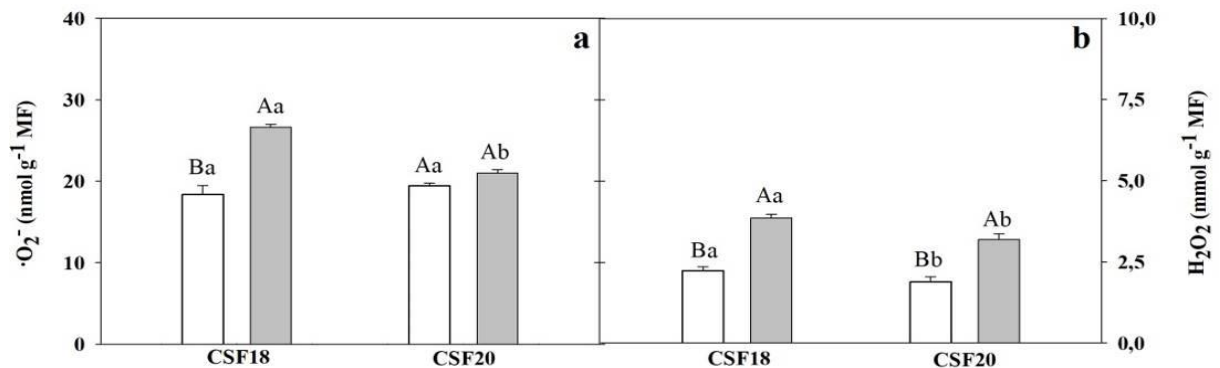


**Figura 2** – Vazamento de eletrólitos (VE, **a**) e teores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, **b**) em folhas de dois genótipos de sorgo com diferentes graus de tolerância ao estresse salino, CSF18, sensível e CSF20, tolerante, crescendo na ausência (barras brancas) ou na presença (barras cinza) de NaCl 75 mM. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para o mesmo genótipo, ou minúscula, para o mesmo tratamento de estresse salino, não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados representam a média de cinco repetições ( $n = 5$ ).

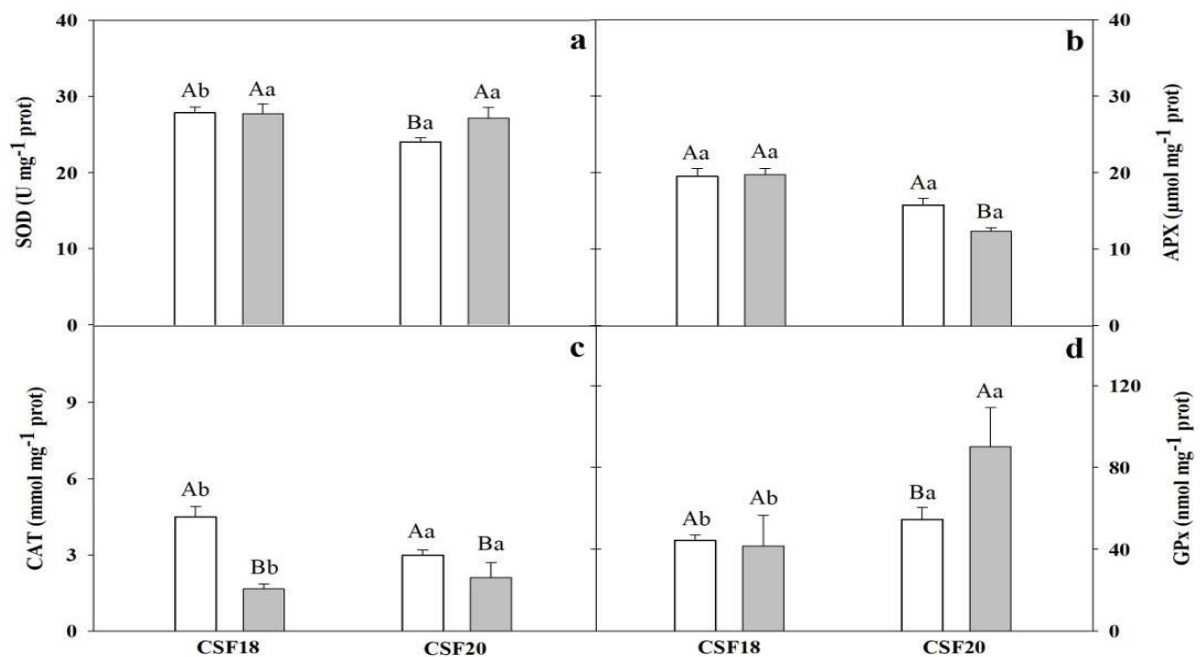
O efeito do estresse salino na homeostase das EROs de folhas dos dois genótipos foi analisado quanto à produção do radical livre superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) e do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). De modo geral, os níveis de EROs aumentaram durante o período de estresse, com exceção do teor de  $\cdot\text{O}_2^-$  do genótipo tolerante, que não se alterou (Figura 3a). Em relação ao controle, o teor de  $\cdot\text{O}_2^-$  aumentou no genótipo sensível com a imposição do estresse salino (Figura 3a). Com relação aos teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foram observados aumentos pela salinidade de ambos os genótipos, porém os teores de  $\text{H}_2\text{O}_2$  apresentaram um acréscimo pouco maior no genótipo CSF18 (Figura 3b).

No estudo das atividades das enzimas antioxidativas, observou-se que os genótipos avaliados divergiram entre si na resposta ao estresse salino. A atividade da SOD nas folhas do genótipo CSF18 não foi afetada pela salinidade, porém no genótipo tolerante (CSF20) houve um aumento na atividade dessa enzima (Figura 4a). A atividade da APX nas folhas do genótipo sensível não foi alterada pela salinidade, enquanto no genótipo tolerante observou-se um declínio na atividade dessa enzima (Figura 4b). A atividade da CAT nas folhas de ambos os genótipos de sorgo foi reduzida pelo estresse salino, porém, a queda na atividade dessa enzima foi maior nas plantas no genótipo tolerante (Figura 4c). A salinidade aumentou a

atividade da GPX nas folhas do genótipo CSF20, enquanto no genótipo CSF18 essa atividade permaneceu equivalente àquela do seu respectivo controle (Figura 4d).



**Figura 3** – Teores de superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ , **a**) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , **b**) em folhas de dois genótipos de sorgo com diferentes graus de tolerância ao estresse salino, CSF18, sensível e CSF20, tolerante, crescendo na ausência (barras brancas) ou na presença (barras cinzas) de NaCl 75 mM. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para o mesmo genótipo, ou minúscula, para o mesmo tratamento de estresse salino, não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados representam a média de cinco repetições ( $n = 5$ ).



**Figura 4** – Atividade das enzimas dismutase do superóxido (SOD, **a**), peroxidase do ascorbato (APX, **b**), catalase (CAT, **c**) e peroxidase da glutaciona (GPX, **d**) em folhas de dois genótipos de sorgo com diferentes graus de tolerância ao estresse salino, CSF18, sensível e CSF20, tolerante, crescendo na ausência (barras brancas) ou na presença (barras cinza) de NaCl 75 mM. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para o mesmo genótipo, ou minúscula, para o mesmo tratamento de estresse salino, não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados representam a média de cinco repetições ( $n = 5$ ).

Os níveis de ascorbato reduzido (AsA) e ascorbato oxidado (DAsA) apontam diretamente para a indução do estresse oxidativo pelo NaCl. No genótipo sensível, o teor de AsA não foi alterado pelo tratamento com NaCl a 75 mM, todavia no genótipo tolerante observou-se um aumento de (Figura 5a). Por outro lado, o teor de DAsA, foi aumentado em pela salinidade no genótipo CSF18, porém, no genótipo CSF20 o teor de DAsA não foi alterado pela salinidade (Figura 5b). O teor de glutathiona reduzida (GSH) não foi alterado pelo estresse salino no genótipo sensível, mas no genótipo tolerante observou-se um aumento nesse teor (Figura 5c). Já os teores de glutathiona oxidada (GSSG) foram aumentados pela salinidade em ambos os genótipos, sendo o aumento muito maior no CSF18 no genótipo tolerante (Figura 5d).

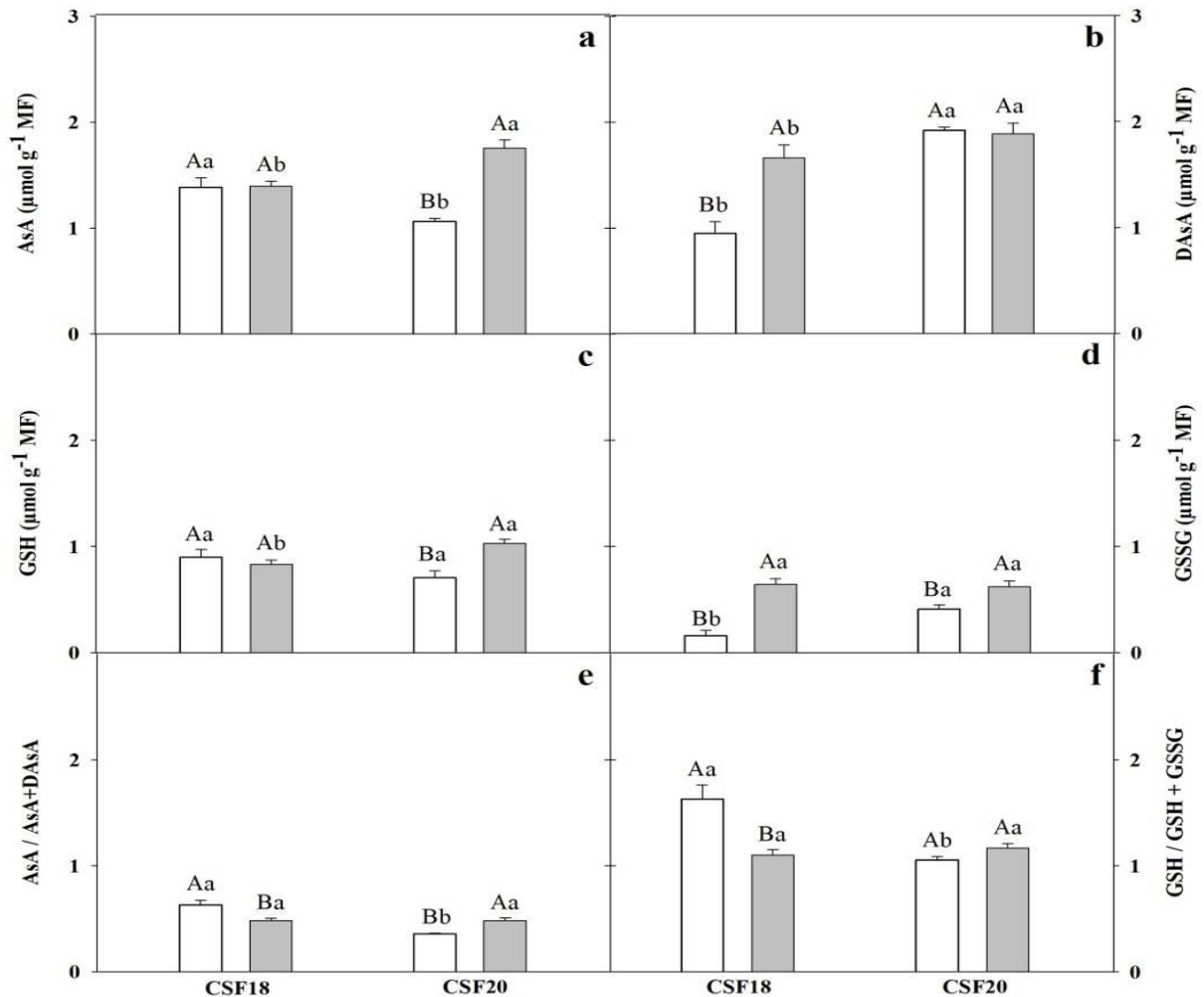
As alterações nos teores dos antioxidantes não enzimáticos, nas formas reduzida (GSH) e oxidadas, causaram significativas alterações no estado redox do ascorbato e da glutathiona, expressas respectivamente pelas relações de concentrações:  $AsA/(AsA + DAsA)$  e  $GDH/(GSH+GSSG)$ . O estado redox do ascorbato apresentou comportamentos diferentes entre os dois genótipos; enquanto no genótipo sensível o estresse salino causou uma diminuição nessa grandeza, no genótipo tolerante, houve um aumento (Figura 5e). Já o estado redox da glutathiona, como pode ser observado na figura 5f, foi reduzido pelo tratamento com NaCl a 75 mM nas plantas do genótipo CSF18, enquanto as plantas do genótipo tolerante mantiveram o estado redox da glutathiona equivalente ao do controle.

#### 4.4 Discussão

A maior capacidade de assimilação de  $CO_2$  no genótipo CSF20 não foi determinada por fatores estomáticos, tampouco pela concentração interna de  $CO_2$  (Tabela 1). Dessa forma, pode-se inferir que o CSF20, devido às suas características genéticas, possui maior capacidade de realizar fotossíntese em condições de salinidade, quando comparado ao genótipo CSF18. Em geral, as plantas respondem ao excesso de NaCl diminuindo a fotossíntese líquida por causar fechamento estomático, provocando uma redução na pressão parcial intercelular de  $CO_2$  (DIONISIO-SESE; TOBITA, 2000).

A EUA, expressa pela relação entre a assimilação de  $CO_2$  e a transpiração, relaciona a quantidade de carbono que a planta fixa por unidade de água que perde (ELLSWORTH; COUSINS, 2016). Dessa forma plantas que tenham capacidade de aumentar a eficiência no uso da água sob condições de salinidade, como observado para o genótipo CSF20 (Tabela 1), possivelmente apresentam alta capacidade de tolerância aos efeitos do estresse salino, já que a

redução do consumo de água implica na redução da absorção de íons específicos evitando o efeito tóxico iônico nos tecidos vegetais (LIANG *et al.*, 2018), o que pode estar relacionado ao mecanismo de exclusão de sais pelas raízes (MUNNS; TESTER, 2008).



**Figura 5** – Teores de ascorbato reduzido (AsA, **a**) e oxidado (DAsA, **b**), glutatona reduzida (GSH, **c**) e oxidada (GSSG, **d**) e estado redox do ascorbato (AsA/(AsA+DAsA), **e**) e da glutatona (GSH/(GSH+GSSG), **f**) em folhas de dois genótipos de sorgo com diferentes graus de tolerância ao estresse salino, CSF18, sensível e CSF20, tolerante, crescendo na ausência (barras brancas) ou na presença (barras cinza) de NaCl 75 mM. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para o mesmo genótipo, ou minúscula, para o mesmo tratamento de estresse salino, não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os resultados representam a média de cinco repetições ( $n = 5$ ).

O estresse salino teve efeito diverso na fotoquímica do PSII nos dois genótipos. As mudanças ocasionadas pelo estresse salino conduziram a decréscimos em  $F_v/F_m$  e  $\Phi_{PSII}$  em plantas do genótipo CSF18 (Tabela 2). Além disso, a redução em  $qP$  (Tabela 2) pode ter favorecido a redução nos valores de  $F_v/F_m$  nas plantas do genótipo CSF18 em condições

salinas (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989). Reduções nas variáveis  $F_v/F_m$  e  $\Phi PSII$  sugerem que o estresse salino induziu maior susceptibilidade de PSII à fotoinibição nas plantas do genótipo sensível à salinidade. Os resultados deste estudo permitem ainda afirmar que o genótipo tolerante ao sal apresenta maior estabilidade do seu aparato fotossintético, o que foi refletido pelos valores das variáveis  $F_v/F_m$ ,  $\Phi PSII$  e  $qP$  (Tabela 2).

O teor de clorofila é um importante índice fisiológico diretamente relacionado à fotossíntese nas plantas (Ma *et al.*, 2011). De modo geral, a diminuição nos teores desses pigmentos sob estresse salino é considerada como resultado da síntese lenta ou rápida oxidação dos pigmentos nas células (ASHRAF, 2003). No presente trabalho, os teores de Chl *b* e Chl *total* permaneceram inalterados pela salinidade, enquanto os de Chl *a* apresentaram pequena redução em função do estresse (Figura 1a, b, c). Todavia, o conteúdo de carotenoides como pigmentos auxiliares foram reduzidos significativamente, em ambos os genótipos, quando sujeitos à salinidade (Figura 1d). Esses resultados coincidem com os encontrados em fava (GADALLAH, 1999) e em genótipos de milho e trigo (SINGH; SINGH; KUMAR, 2008). Além de desempenharem o papel de pigmentos acessórios de captação de luz durante a fotossíntese, os carotenoides agem como um antioxidante eficaz que protege e estabiliza os processos fotoquímicos da fotossíntese em condições de estresse (ESTEBAN *et al.*, 2015). Portanto, pode-se inferir que a produção de pigmentos não estaria envolvida na redução dos efeitos nocivos do estresse salino e, por conseguinte, na tolerância à salinidade de sorgo.

A salinidade promove danos às membranas biológicas, tendo sido relatados efeitos deletérios a sua integridade em diversas plantas sensíveis aos sais. Tais efeitos estão associados à redução no conteúdo lipídico total, indicando uma perda de integridade da membrana (GUO; LIU; BARKLA, 2019). A salinidade impôs uma desordem nas membranas celulares de ambos os genótipos (Figura 2), contudo, esse desarranjo estrutural foi maior nas membranas das células de CSF18, representado por uma maior VE e peroxidação dos seus lipídios (TBARS), quando comparado com plantas tratadas com NaCl do genótipo CSF20 (Figura 2a, b). A redução induzida pelo estresse no conteúdo lipídico da membrana pode estar relacionada não só à peroxidação, mas também à lipólise, bem como a inibição da rota de biossíntese de lipídios (GIGON *et al.*, 2004; YASAR; UZAL; OZPAY, 2010).

Provavelmente, os elevados teores elevados de  $\cdot O_2^-$  e  $H_2O_2$ , especialmente no genótipo sensível, levaram a danos às membranas e consequente vazamentos de eletrólitos (Figuras 2 e 3). Menores teores de  $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e TBARS no genótipo CSF20 foram observados durante o estresse salino, quando comparados ao genótipo CSF18. A manutenção da integridade das membranas e os níveis mais baixos de EROs no genótipo CSF20 estão

relacionados ao seu sistema de defesa antioxidativo (Figuras 4 e 5). Em genótipos tolerantes à salinidade, foram relatadas atividades mais altas das enzimas que eliminam EROs em comparação com as suscetíveis, sugerindo que o sistema antioxidativo desempenha um papel importante no aumento da tolerância das plantas contra condições de estresse ambiental (KIBRIA *et al.*, 2017; MOHAMMADKHANI; ABBASPOUR, 2017; ZHAO *et al.*, 2017).

Sob condições de estresse, enzimas antioxidantes protegem as estruturas celulares contra as EROs (DEMIDCHIK, 2015). No presente estudo, as respostas das atividades das enzimas SOD e GPX e os conteúdos de ascorbato e glutathiona sugerem que o sistema antioxidativo do genótipo tolerante CSF20 é um componente importante contra a condição de estresse oxidativo (Figuras 4 e 5). Apesar da enzima APX ter sustentado sua atividade nas plantas de CSF18 em condições salinas, isso não foi suficiente na eliminação de EROs, sobretudo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provocando danos moleculares e estruturais (Figuras 3 e 4). O aumento da atividade da GPX induzida por NaCl indica que o genótipo CSF20 tem maior capacidade de decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado pela SOD (Figura 4). Portanto, a tolerância ao estresse salino em plantas do genótipo CSF20 está positivamente correlacionada com atividades de enzimas antioxidantes, como SOD e GPX, e antioxidantes não-enzimáticos, como ascorbato e glutathiona (CHOUDHURY *et al.*, 2017).

#### 4.5 Conclusão

No presente estudo, os efeitos do NaCl foram determinantes nos processos fotossintéticos de plantas de dois genótipos com tolerância contrastante à salinidade. O estresse salino resultou em aumento da assimilação de CO<sub>2</sub> e na EUA em CSF20, e reduções nos teores de carotenoides em ambos os genótipos. O uso das informações fisiológicas de fluorescência da Chl *a* forneceram indícios adicionais na compreensão das respostas das plantas de sorgo à salinidade. O excesso de energia dos fótons foi dissipado na forma de calor (*NPQ*) nas plantas estressadas de ambos os genótipos, embora o genótipo CSF18 tenha eliminado mais calor, provavelmente devido a maior captação de energia radiante. Tal excesso de energia provocou danos fotoinibitórios do aparato fotossintético de CSF18, mas não em CSF20. Esses resultados sugerem que o estresse salino causa sérios danos estruturais no genótipo sensível à salinidade, o que pode estar relacionado à produção acentuada de EROs. Simultaneamente, o sistema de defesa antioxidativo de CSF18 não se mostrou eficiente na eliminação do excesso de EROs formado durante a fotossíntese. No que diz respeito ao genótipo CSF20, a sua tolerância relativa ao sal está associada a um sistema

antioxidante eficiente, incluindo: aumento da atividade da GPX e da SOD; maior conteúdo de ascorbato/glutationa, que funcionam como substâncias antioxidativas; e menores conteúdos de TBARS,  $\cdot\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , quando comparado ao genótipo CSF18.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Os dois genótipos de sorgo estudados, CSF18 e CSF20, foram afetados pelo estresse salino, mas as diferenças no crescimento indicaram que o CSF20 foi mais tolerante ao estresse salino do que o CSF18. A análise dos parâmetros fisiológicos e bioquímicos indica que essa diferença na tolerância se deve em parte às diferenças no acúmulo de sal nas raízes e na parte aérea, e aos solutos compatíveis (aminoácidos, açúcares solúveis, prolina, GABA e PAs). Diferenças metabólicas evidentes foram detectadas em plantas de sorgo cultivadas sob estresse salino. Os perfis metabólicos das plantas de sorgo em condições de controle e das plantas com estresse salino do genótipo CSF18 foram mais semelhantes entre si. Além disso, a exposição do genótipo CSF20 ao sal induziu respostas metabólicas únicas. Alterações metabólicas entre os dois genótipos de sorgo sob a mesma condição adversa permitem dizer que o genótipo CSF20 apresenta plasticidade frente às mudanças ambientais. Essas alterações foram associadas aos intermediários do ciclo do TCA e ao metabolismo de açúcares, aminoácidos e PAs e podem estar relacionadas às suas múltiplas funções no crescimento das plantas. Essas características suportam o potencial de tolerância eficiente da cultivar CSF20 à salinidade.

O aumento da salinidade foi verificado como uma condição de estresse nas plantas, provocando, sobretudo, alterações no aparato fotossintético do genótipo CSF18, afetando tanto sua estrutura quanto função. De especial importância na manutenção homeostática fisiológica e bioquímica, pode-se indicar uma efetito protetivo de diversas substâncias, como os osmólitos e as moléculas do sistema antioxidativo, mantendo a integridade da estrutura molecular do aparato fotossintético para a aclimação aos efeitos severos da salinidade. O aumento da atividade das enzimas antioxidativas, conteúdo de clorofila, conteúdo de substâncias antioxidantes podem ser alguns dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos subjacentes à tolerância à salinidade no genótipo CSF20. É evidente que nenhum parâmetro isolado pode ser responsável pela tolerância à salinidade em qualquer um dos genótipos de sorgo estudados, ao passo que uma combinação de diferentes características contribui para a tolerância à salinidade. Com base no desempenho de crescimento e em ensaios bioquímicos, o genótipo CSF20 apresentou maior tolerância ao estresse salino do que o genótipo CSF18. Portanto, pesquisas futuras devem ser focadas nos mecanismos biomoleculares envolvidos na tolerância ao estresse salino para a determinação das principais vias de controle da tolerância à salinidade em plantas.



## REFERÊNCIAS

ALCÁZAR, R.; ALTABELLA, T.; MARCO, F.; BORTOLOTTI, C.; REYMOND, M.; KONCZ, C.; CARRASCO, P.; TIBURCIO, A. F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. **Planta**, v. 231 (6), p. 1237-49, 2010.

AL-QURAN, N. A.; SARTAWA, F. A.; QARYOUT, M. M. Characterization of gamma-aminobutyric acid metabolism and oxidative damage in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under salt and osmotic stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 170 (11), p. 1003-1009, 2013.

AMJAD, M.; AKHTAR, J.; ANWAR-UL-HAQ, M.; YANG, A.; AKHTAR, S. S.; JACOBSEN, S. E. Integrating role of ethylene and ABA in tomato plants adaptation to salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 172, p. 109-116, 2014.

ANJANEYULU, E.; REDDY, P. S.; SUNITA, M.S.; KISHOR, P.B.K.; MERIGA, B. Salt tolerance and activity of antioxidative enzymes of transgenic finger millet overexpressing a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene (*SbVPPase*) from *Sorghum bicolor*. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 789-798, 2014.

ARMENGAUD, P.; THIERY, L.; BUHOT, N.; GRENIER-DE MARCH, G., SAVOURÉ, A. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 442-450, 2004.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v. 141, p. 391-39, 2006.

ASHRAF, M. Relationships between leaf gas exchange characteristics and growth of differently adapted populations of blue panic grass (*Panicum antidotale* Retz.) under salinity or waterlogging. **Plant Science**, v. 165, p. 69-75, 2003.

ASHRAF, M.; ATHAR, H. R.; HARRIS, P. J. C.; KWON, T. R. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. **Advances in Agronomy**, v. 97, p. 45-110, 2008.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments. **Photosynthetica**, v. 51, p. 163-190, 2013.

ASSAHA, D.; UEDA, A.; SANEOKA, H.; AL-YAHYAI, R.; YAISH, M. The role of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transporters in salt stress adaptation in glycophytes. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 509, 2017.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

- BATUSHANSKY, A.; KIRMA, M.; GRILLICH, N.; TOUBIANA, D.; PHAM, P.A.; BALBO, I.; FROMM, H.; GALILI, G., FERNIE, A.R.; FAIT, A. Combined transcriptomics and metabolomics of *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to exogenous GABA suggest its role in plants is predominantly metabolic. **Molecular Plant**, v. 7, p. 1065–1068, 2014.
- BEAUCHAMP, C.; FRICOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276–287, 1971.
- BEJAOU, F.; SALAS, J. J.; NOUAIRI, I.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C.; MARTÍNEZ-FORCE, E.; YOUSSEF, N. B. Changes in chloroplast lipid contents and chloroplast ultrastructure in *Sulla carnosa* and *Sulla coronaria* leaves under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 198 (1), p. 32–38, 2016.
- BEUVE, N.; RISPAIL, N.; LAINE, P.; CLIQUET, J. B.; OURRY, A.; LE DEUNFF, E. Putative role of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. **Plant Cell Environmental**, v. 27, p. 1035–1046, 2004.
- BIANCUCCI, M.; MATTIOLI, R.; FORLANI, G.; FUNCK, D.; COSTANTINO, P.; TROVATO, M. Role of proline and GABA in sexual reproduction of angiosperms. **Frontiers in Plant Science**, 2015.
- BILGER, W.; SCHREIBER, U.; BOCK, M. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Oecologia**, v. 102, p. 425–432, 1995.
- BLOOM A. J. Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. **Photosynthesis Research**, v. 123, p.117–128, 2015.
- BLOOM, A. J.; BURGER, M.; KIMBALL, B. A.; PINTER, P. J. Nitrate assimilation is inhibited by elevated CO<sub>2</sub> in field-grown wheat. **Nature Climate Change**, v. 4, p. 477–480, 2014.
- BLUM, A. Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. **Crop Science**, v. 29, p. 230–233, 1989.
- BORELLI, G. M.; FRAGASSO, M.; NIGRO, F.; PLATANI, C.; PAPA, R.; BELEGGIA, R.; TRONO, D. Analysis of metabolic and mineral changes in response to salt stress in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) genotypes, which differ in salinity tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 133, p. 57–70, 2018.
- BOSE, J.; RODRIGO-MORENO, A.; SHABALA, S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 65 (5), p. 1241–1257, 2014.
- BOWDITCH, M. I.; DONALDSON, R. P. Ascorbate free-radical reduction by glyoxysomal membranes. **Plant Physiology**, v. 94, p. 531–537, 1990.
- BOWN, A. W.; SHELPS, B. J. The Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1–5, 1997.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.
- CATALDO, D. A.; HAROONH, M.; SHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71–80, 1975.
- ČATSKÝ, J. Determination of water deficit in discs cut out from leaf blades. **Biologia Plantarum**, v. 2, p. 76–77, 1960.
- CHARTZOULAKIS, K.; LOUPASSAKI, M.; BERTAKI, M.; ANDROULAKIS, I. Effects of NaCl salinity on growth, ion content and CO<sub>2</sub> assimilation rate of six olive cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 96, p. 235–247, 2002.
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103 (4), p. 551–560, 2009.
- CHEESEMAN, J. M. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. **Journal of Experimental Botany**, 57(10), p. 2435–2444, 2006.
- CHEN, Z.; ZHOU, M.; NEWMAN, I.; MENDHAM, N.; ZHANG, G.; SHABALA, S. Potassium and sodium relations in salinised barley tissues as a basis of differential salt tolerance. **Functional Plant Biology**, v 34 (2), p. 150–162, 2007.
- CHENG, B.; LI, Z.; LIANG, L.; CAO, Y.; ZENG, W.; ZHANG, X.; MA, X.; HUANG, L.; NIE, G.; LIU, W.; PENG, Y. The  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) alleviates salt stress damage during seeds germination of white clover associated with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transportation, dehydrins accumulation, and stress-related genes expression in white clover. **International Journal of Molecular Science**, v. 19 (9), p. 2520, 2018.
- CHOUDHURY, F. K.; RIVERO, R. M.; BLUMWALD, E.; MITTLER, R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90 (5), p. 856-867, 2017.
- CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU, J. K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, v. 45, p. 437–448, 2005.
- CLARK, R. B. Nutrient solution growth of sorghum and corn in mineral nutrition studies. **Journal of Plant Nutrition**, v. 5 (8), p. 1039–1057, 1982.
- CONAB – COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira – grãos. **Safra 2019/20**, n.3 – Terceiro levantamento, dezembro 2019.
- CRAWFORD, L. A.; BOWN, A. W.; BREITKREUZ, K. E.; GUINEL, F. C. The synthesis of [ $\gamma$ ]-aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. **Plant Physiology**, v. 104 (3), p. 865–871, 1994.
- CUIN, T. A.; SHABALA, S. Amino acids regulate salinity-induced potassium efflux in barley root epidermis. **Planta**, v. 225, p. 753–761, 2007a.

CUIN, T. A.; SHABALA, S. Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. **Plant, Cell and Environment**, v 30 (7), p. 875–885, 2007b.

DAVILA-GOMEZ, F. J.; CHUCK-HERNANDEZ, C.; PEREZ-CARRILLO, E.; ROONEY, W. L.; SERNA-SALDIVAR, S. O. Evaluation of bioethanol production from five different varieties of sweet and forage sorghums (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Industrial Crops and Products**, v. 33(3): p. 611–616, 2011.

DELAUNEY, A.J.; VERMA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v. 4, p. 1037–1047, 1993.

DEL RÍO, L. A. ROS and RNS in plant physiology: an overview. **Journal of Experimental Botany**, v. 66 (10), p. 2827–2837, 2015.

DEL RÍO, L. A.; CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; PALMA, J. M.; GÓMEZ, M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53(372)1, p. 1255–1272, 2002.

DEL DUCA, S.; SERAFINI-FRACASSINI, D.; CAI, G. An unconventional road for the secretion of transglutaminase in pollen tubes? **Plant Signal and Behavior**, v. 8 (6), 2013.

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

DIAS, A. S.; LIMA, G. S.; GHEYI, H. R.; SOARES, L. A. A.; SOUZA, L. P.; BEZERRA, I. L. Crescimento do algodoeiro ‘brs rubi’ em função da irrigação com águas salinas e adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v.11 (7), p. 1945–1955, 2017.

DIONISIO-SESE, M. L.; TOBITA, S. Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 157(1), p. 54–58, 2000.

DOGGETT, H. Utilization of grain sorghum. In: **Sorghum** (ed) Longman Scientific and Technical, Wiley/CBRS, New York, 1988.

DUARTE, B.; SANTOS, D.; MARQUES, J. C.; CAÇADOR, I. Ecophysiological adaptations of two halophytes to salt stress: Photosynthesis, PS II photochemistry and anti-oxidant feedback – Implications for resilience in climate change. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 67, p. 178–188, 2013.

DUAN, J.; LI, J.; GUO, S.; KANG, Y. Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1620–1635, 2008.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28 (3), p. 350–356, 1956.

EBEED, H. T.; HASSAN, N. M.; ALJARANI, A. M. Exogenous applications of Polyamines modulate drought responses in wheat through osmolytes accumulation, increasing free polyamine levels and regulation of polyamine biosynthetic genes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 438–448 2017

ELLSWORTH, P. Z.; COUSINS, A. B. Carbon isotopes and water use efficiency in C4 plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 155–161, 2016.

ELSTNER, E. F.; HEUPEL, A. Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: a simple assay for superoxide dismutase. **Analytical Biochemistry**, v. 70(2), p. 616–620, 1976.

FREITAS, V. S.; MIRANDA, R. S.; COSTA, J. H.; FARIAS DE OLIVEIRA, D.; PAULA, S. O.; CASTRO, E. FREIRE, R. S.; PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Ethylene triggers salt tolerance in maize genotypes by modulating polyamine catabolism enzymes associated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. **Environmental and Experimental Botany**, v. 145, p. 75–86, 2018.

EMBRAPA MILHO E SORGO. **Sistemas de Produção**, 2 ISSN 1679-012X Versão Eletrônica – 3ª edição, 2007.

ESHDAT, Y.; HOLLAND, D.; FALTIN, Z.; BEN-HAYYIM, G. Plant glutathione peroxidases. **Physiologia Plantarum**, v. 100 (2), p. 234–240, 1997.

ESTEBAN, R.; MORAN, J. F.; BECERRIL, J. M.; GARCÍA-PLAZAOLA, J. I. Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 119, p. 63–75, 2015.

FAIT, A.; FROMM, H.; WALTER, D.; GALILI, G.; FERNIE, A.R. Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. **Trends in Plant Science**, v. 13, p. 14–19, 2008.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

FERNANDO, C. D.; SOYSA, P. Optimized enzymatic colorimetric assay for determination of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) scavenging activity of plant extracts. **MethodsX**, v. 18(2), p. 283–91, 2015.

FINITI, I.; LEYVA, M. O.; VICEDO, B.; GÓMEZ-PASTOR, R.; LÓPEZ-CRUZ, J.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; REAL, M. D.; GONZÁLEZ-BOSCH, C. Hexanoic acid protects tomato plants against *Botrytis cinerea* by priming defence responses and reducing oxidative stress. **Molecular Plant Pathology**, v. 15 (6), p. 550–562, 2014.

FLORES, H. E.; GALSTON, A. W. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. **Plant Physiology**, v. 69, p. 701–706, 1982.

- FRANCOIS, L. E.; DONOVAN, T.; MAAS, E. V. Salinity effects on seed yield, growth and germination of grain sorghum. **Agronomy Journal**, v. 76(5), p. 741–744, 1984.
- GADALLAH, M. A. A. Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* response to salt stress. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 249–257, 1999.
- GAINES, T.P.; PARKER, M.B.; GASCHO, G.J. Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate extraction. **Agronomy Journal**, v. 76, p. 371–374, 1984.
- GECHEV, T. S.; BREUSEGEM, F. V.; STONE, J. M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, v. 28 (11), p. 1091–1101, 2006.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 990, p. 87–92, 1989.
- GIGON, A.; MATOS, A. R.; LAFFRAY, D.; ZUILY-FODIL, Y.; PHAM-THI, A. T. Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). **Annals of Botany**, v. 94, p. 345–351, 2004.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 5, p. 26–33, 2010a.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909–930, 2010b.
- GRENE, R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. **The Arabidopsis Book**, v. 1, p. 1–20, 2002.
- GRIFFITH, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, p. 207–212, 1980.
- GROPPA, M. D.; BENAVIDES, M. P. Polyamines and abiotic stress: recent advances. **Amino Acids**, v. 34 (1), p. 35–45, 2008.
- GUO, Q.; LIU, L.; BARKLA, B. J. membrane lipid remodeling in response to salinity. **International Journal Molecular Sciences**, v. 20 (17), p. 4264, 2019.
- GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. **International Journal of Genomics**, v. 1, p. 1–18, 2014.
- GUPTA, K.; DEY, A.; GUPTA, B. Plant polyamines in abiotic stress responses. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35 (7), p. 2015–2036, 2013.

- HAMILTON, E. W.; HECKATHORN, S. A. Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. **Plant Physiology**, v. 126(3), p. 1266–1274, 2001.
- HAMAMOTO, S.; HORIE, T.; HAUSER, F.; DEINLEIN, U.; SCHROEDER, J. I.; UOZUMI, N. HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 113–120, 2015.
- HAMDANI, S.; YAAKOUBI, H.; CARPENTIER, R. Polyamines interaction with thylakoid proteins during stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 104 (1-2), p. 314–319, 2011.
- HANFREY, C.; SOMMER, S.; MAYER, M. J.; BURTIN, D.; MICHAEL, A. J. *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. **The Plant Journal**, v. 27 (6), p. 551–560, 2001.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A.; STADEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 413–434, 1999.
- HARLAN, J. R.; DE WET, J.M.J. A simplified classification of cultivated sorghum. **Crop Science**, v. 12 (2), p. 172–176, 1972.
- HASEGAWA, P. M.; BRESSA, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463–499, 2000.
- HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450–455, 1987.
- HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M. N.; WANI, A.S.; PICHTEL, J.; AHMAD, A. Role of proline under changing environments: a review. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7(11), p. 1–11, 2012.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 385–395, 1968.
- HOLMSTEDT, B.; LARSSON, L.; THAM, R. Further studies on spectrophotometric method for the determination of amine oxidase activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 48, p. 182–186, 1961.
- IOANNIDIS, N. E.; KOTZABASIS, K. Effects of polyamines on the functionality of photosynthetic membrane *in vivo* and *in vitro*. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1767 (12), p. 1372–1382, 2007.
- ISAYENKOV, S. V.; MAATHUIS, F. J. M. Plant salinity stress: many unanswered questions remain. **Frontiers in Plant Science**, 2019.

JACOBY, R. P.; TAYLOR, N. L.; MILLAR, A. H. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 16 (11), p. 614–623, 2011.

JANG, S. J.; WI, S. J.; CHOI, Y. J.; NA, G.; PARK, K. Y. Increased polyamine biosynthesis enhances stress tolerance by preventing the accumulation of reactive oxygen species: T-DNA mutational analysis of *Oryza sativa* lysine decarboxylase-like protein 1. **Molecules and Cells**, v. 34, p. 251–262, 2012.

JIANG, D.; HAO, M.; FU, J.; LIU, K. YAN, X. Potential bioethanol production from sweet sorghum on marginal land in China. **Journal of Cleaner Production**, v. 220, p. 225–234, 2019.

JIMENEZ-BREMONT, J. F.; MARINA, M.; GUERRERO-GONZALEZ, M. L.; ROSSI, F. R.; SANCHEZ-RANGEL, D.; RODRIGUEZ-KESSLER, M.; RUIZ, O. A.; GÁRRIZ, A. Physiological and molecular implications of plant polyamine metabolism during biotic interactions. **Frontiers in Plant Science**, 2014.

KASOTE, D. M.; KATYARE, S. S.; HEGDE, M. V.; BAE, H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11(8), p. 982–991, 2015.

KIBRIA, M. G.; HOSSAIN, M.; MURATA, Y.; HOQUE, A. Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. **Rice Science**, v. 24 (3), p. 155–162, 2017.

KITAOKA, S.; NAKANO, Y. Colorimetric determination of  $\omega$ -amino acids. **The Journal of Biochemistry**, v. 66 (1), p. 87–94, 1969.

KUMAR, R. Role of naturally occurring osmolytes in protein folding and stability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 491 (1–2), p. 1–6, 2009.

KUMAR, V.; KHARE, T. Individual and additive effects of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  ions on rice under salinity stress. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 61 (3), p. 381–395, 2015.

KUMAR, V.; KHARE, T.; SHAIKH, S.; WANI, S. H. Compatible solutes and abiotic stress tolerance in plants. In: Ramakrishna, A.; Gill, S. S. (eds) **Metabolic adaptations in plants during abiotic stress**, CRC Press, p. 213–220, 2018

KUZNETSOV, V.; SHORINA, M.; ARONOVA, E.; STETSENKO, L.; RAKITIN, V.; SHEVYAKOVA, N. NaCl- and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress. **Plant Science**, v. 172, p. 363–370, 2007.

LACERDA, C. F. **Crescimento e acúmulo de solutos orgânicos e inorgânicos em dois genótipos de sorgo forrageiro submetidos a estresse salino**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p. 163, 2000.



- LACERDA, C. F.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. O.; RUIZ, H. A. Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes, under NaCl stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, vol.13 no.3 Lavras 2001.
- 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**, v. 210, p. 899–903, 1983.
- LEFÈVRE, I.; GRATIA, E.; LUTTS, S. Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice *Oryza sativa*. **Plant Science**, v. 161 (5), p. 943–952, 2001.
- LEGOCKA, J.; KLUK, A. Effect of salt and osmotic stress on changes in polyamine content and arginine decarboxylase activity in *Lupinus luteus* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 162 (6), p. 662–668, 2005.
- LEI, P.; XU, Z.; LIANG, J.; LUO, X.; ZHANG, Y.; FENG, X.; XU, H. Poly( $\gamma$ -glutamic acid) enhanced tolerance to salt stress by promoting proline accumulation in *Brassica napus* L. **Plant Growth Regulation**, v. 78 (2), p. 233–241, 2016.
- LIANG, W.; MA, X.; WAN, P.; LIU, L. Plant salt-tolerance mechanism: A review. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495(1), p. 286–291, 2018.
- LI, S.; JIN, H.; ZHANG, Q. The effect of exogenous spermidine concentration on polyamine metabolism and salt tolerance in zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud) subjected to short-term salinity stress. **Frontiers in Plant Science**, 2016.
- LI, J.; HU, L.; ZHANG, L.; PAN, X.; HU, X. Exogenous spermidine is enhancing tomato tolerance to salinity–alkalinity stress by regulating chloroplast antioxidant system and chlorophyll metabolism. **BMC Plant Biology**, v. 15, p. 303, 2015.
- LI, Z.; YU, J.; PENG, Y.; HUANG, B. Metabolic pathways regulated by  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) contributing to heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). **Scientific Reports**, 2016.
- LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1(1), p. 387–96, 2006.
- LIU, D.; FORD, K. L.; ROESSNER U.; NATERA, S.; CASSIN, A. M.; PATTERSON, J. H.; BACIC, A. Rice suspension cultured cells are evaluated as a model system to study salt responsive networks in plants using a combined proteomic and metabolomic profiling approach. **Proteomics**, v. 13, p. 2046–2062, 2013.
- LIU, J. H.; WANG, W.; WU, H.; GONG, X.; MORIGUCHI, T. Polyamines function in stress tolerance: from synthesis to regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 827, 2015.
- LIU, T.; DOBASHI, H.; KIM, D. W.; SAGOR, G. H. M.; NIITSU, M.; BERBERICH, T.; KUSANO, T. *Arabidopsis* mutant plants with diverse defects in polyamine metabolism show

unequal sensitivity to exogenous cadaverine probably based on their spermine content. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 20 (2), p. 151–159, 2014.

MA, Q.; YUE, L. J.; ZHANG, J. L.; WU, G. Q.; BAO, A. K.; WANG, S. M. Sodium chloride improves photosynthesis and water status in the succulent xerophyte *Zygophyte xanthoxylum*. **Tree Physiology**, v. 32, p. 4–13, 2011.

MAATHUIS, F. J.; AHMAD, I.; PATISHTAN, J. Regulation of Na<sup>+</sup> fluxes in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1–9, 2014.

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

MATTIOLI, R.; COSTANTINO, P.; TROVATO, M. Proline accumulation in plants: not only stress. **Plant Signaling and Behavior**, v. 4 (11), p. 1016–1018, 2009.

MATTIOLI, R.; MARCHESE, D.; D'ANGELI, S.; ALTAMURA, M.; COSTANTINO, P.; TROVATO, M. Modulation of intracellular proline levels affects flowering time inflorescence architecture in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 66, p. 277–288, 2008.

MENG, F.; LUO, Q.; WANG, Q.; ZHANG, X.; QI, Z.; XU, F.; LEI, X.; CAO, Y.; CHOW, W. S.; SUNA, G. Physiological and proteomic responses to salt stress in chloroplasts of diploid and tetraploid black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). **Nature Scientific Reports**, v. 6, n. 23098, 2016.

MERINGER, M. V.; VILLASUSO, A. L MARGUTTI, M. P.; USORACH, J.; PASQUARÉ, S. J.; GIUSTO N. M.; MACHADO, E. E. RACAGNI, G. E. Saline and osmotic stresses stimulate PLD/diacylglycerol kinase activities and increase the level of phosphatidic acid and proline in barley roots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 128, p. 69–78, 2016.

MHAMDI, A.; QUEVAL, G.; CHAOUCH, S.; VANDERAUWERA, S.; VAN BREUSEGEM, F.; NOCTOR, G. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61(15), p. 4197–4220, 2010.

MISRA, N.; GUPTA, K.; DWIVEDI, U. N. Changes in free amino acids and stress protein synthesis in two genotypes of green gram under salt stress. **Journal of Plant Sciences**, v. 1 (1), p. 56–66, 2006.

MISRA, N.; SAXENA, P. Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. **Plant Science**, v. 177 (3), p. 181–189, 2009.

MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22(1), p. 11–19, 2017.

MITTOVA, V.; TAL, M.; VOLOKITA, M.; GUY, M. Up-regulation of the leaf mitochondrial and peroxisomal antioxidative systems in response to salt-induced oxidative stress in the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. **Plant Cell Environmental**, v. 6, p. 845–856, 2003.

MIYAKE, C.; ASADA, K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. **Plant and Cell Physiology**, v. 33(5), p. 541–553, 1992.

MO, H.; PUA, E. Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress. **Physiologia Plantarum**, v. 114 (3), p. 439–449, 2002.

MOHAMMADKHANI, N.; ABBASPOUR, N. Effects of salinity on antioxidant system in ten grape genotypes. **Iranian Journal Plant Physiology**, v. 8 (1), p. 2247–2255, 2017.

MONTILLA-BASCÓN, G.; RUBIALES, D.; ALTABELLA, T.; PRATS, E. Free polyamine and polyamine regulation during pre-penetration and penetration resistance events in oat against crown rust (*Puccinia coronata* f. sp. *avenae*). **Plant Pathology**, v. 65 (3), p. 392–401, 2016.

MOSCHOU, P. N.; PASCHALIDIS, K. A.; DELIS, I. D.; ANDRIOPOULOU, A. H.; LAGIOTIS, G. D.; YAKOUMAKIS, D. I.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signatures that direct tolerance responses in tobacco. **The Plant Cell**, v. 20 (6): p. 1708–1724, 2008.

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

MUNNS, R.; JAMES, R. A.; LÄUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 1025–1043, 2006.

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

NAEEM, M. S.; WARUSAWITHARANAA, H.; LIUA, H.; LIUA, D.; AHMADB, R.; WARAICHB, E. A.; XUA, L.; ZHOU, W. 5-aminolevulinic acid alleviates the salinity-induced changes in *Brassica napus* as revealed by the ultrastructural study of chloroplast. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 57, p. 84–92, 2012.

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

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249–279, 1998.

NOCTOR, G.; REICHHELD, J.P.; FOYER, C. H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 80, p. 3–12, 2018.

PAIVA, F. I. G.; GURGEL, M. T.; OLIVEIRA, F. A.; MOTA, A. F.; COSTA, L. R.; OLIVEIRA JUNIOR, H. S. Qualidade da fibra do algodoeiro BRS Verde irrigado com água de diferentes níveis salinos. **Irriga**, v. 1 (1), p. 209–220, 2016.

- PALANIVELU, R.; BRASS, L.; EDLUND, A. F.; PREUSS, D. Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. **Cell**, v. 114 (1), p. 47–59, 2003.
- PANDEY, S.; RANADE, A. S.; NAGAR, P. K.; KUMAR, N. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. **Journal of Biosciences**, v. 25, p. 291–299, 2000.
- PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324–349, 2005.
- PARIDA, A. K.; PANDA, A.; RANGANI, J. Metabolomics-guided elucidation of abiotic stress tolerance mechanisms in plants. In: **Plant metabolites and regulation under environmental stress**, AHMAD, P.; AHANGER, M. A.; SINGH, V. P.; TRIPATHI, D. K.; ALAM, P.; ALYEMENI, M. N. (eds), p. 89–131, Academic Press, Cambridge, 2018.
- PATHAK, M. R.; SILVA, J. A T.; WANI, S. H. Polyamines in response to abiotic stress tolerance through transgenic approaches. **GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain**, v. 5 (2), p. 87–96, 2014.
- PAUL, S.; ROYCHOUDHURY, A. Seed priming with spermine and spermidine regulates the expression of diverse groups of abiotic stress-responsive genes during salinity stress in the seedlings of indica rice varieties. **Plant Gene**, v. 11 (B), p. 124–132, 2017.
- PEDROTTI, A.; CHAGAS, R. M.; RAMOS, V. C.; PRATA, A. P. N.; LUCAS, A. A. T.; SANTOS, P. B. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19 (2), p. 1308–1324, 2015.
- PÉREZ-LÓPEZ, U.; ROBREDO, A.; LACUESTA, M.; MENA-PETITE, A.; MUÑOZ-RUEDA, A. Elevated CO<sub>2</sub> reduces stomatal and metabolic limitations on photosynthesis caused by salinity in *Hordeum vulgare*. **Photosynthesis Research**, v. 111 (3), p. 269–283, 2012.
- PÉREZ-LÓPEZ, U.; ROBREDO, A.; LACUESTA, M.; SGHERRI, C.; MENA-PETITE, A.; NAVARI-IZZO, F.; MUÑOZ-RUEDA, A. Lipoic acid and redox status in barley plants subjected to salinity and elevated CO<sub>2</sub>. **Physiologia Plantarum**, v. 139 (3), p. 256–268, 2010.
- PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Fisiologia e bioquímica do estresse salino em plantas. In: GREYI, H.R.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, p. 143–159, 2010.
- PUYANG, X.; AN, M.; XU, L.; HAN, L.; ZHANG, X. Protective effect of exogenous spermidine on ion and polyamine metabolism in *Kentucky bluegrass* under salinity stress. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 57 (1), p. 11–19, 2016.
- RAMESH, A. S.; TYERMAN, S. D.; GILLIHAM, M.; XU, B.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1–27, 2016.

- RHODES, D. NADOLSKA-ORCZYK, A.; RICH, P. Salinity, osmolytes and compatible solutes. In: Läubli A., Lüttge U. (eds) **Salinity: Environment - Plants – Molecules**, p. 181–204, Springer, Dordrecht, 2002.
- RHOADS, D. M.; Umbach, A. L.; Subbaiah, C. C.; Siedow, J. N. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. **Plant Physiology**, v. 141(2), p. 357–366, 2006.
- RIZHSKY, L. HALLAK-HERR, E.; VAN BREUSEGEM, F.; RACHMILEVITCh, S.; BARR, J. E.; RODERMEL, S.; INZÉ, D.; MITTLER, R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **The Plant Journal**, v. 32 (3), p. 329–342, 2002.
- ROESSNER, U.; LUEDEMANN, A.; BRUST, D.; FIEHN, O.; LINKE, T.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. **The Plant Cell**, v. 13, p. 11–29, 2001.
- RONDA, V.; ARUNA, C.; VISARADA, K.; BHAT, B. Sorghum for animal feed. In: **Breeding sorghum for diverse end uses**. Aruna, C.; Visarada, K.; Bhat, B.; Tonapi, V. (eds), p. 229–238, Woodhead Publishing, Cambridge, 2018.
- ROOSENS, N. H. THU, T. T.; ISKANDAR, H. M.; JACOBS, M. Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 117 (1), p. 263–71, 1998.
- SAADIA, M.; JAMIL, A.; AKRAM, N. A.; ASHRAF, M. A study of proline metabolism in canola (*Brassica napus* L.) seedlings under salt stress. **Molecules** v. 17, p. 5803–5815, 2012.
- SAH, S.K.; KAUR, G.; WANI, S.H. Metabolic engineering of compatible solute trehalose for abiotic stress tolerance in plants. In: Iqbal, N. Nazar, R.; Khan, A.N. (eds) **Osmolytes and plants acclimation to changing environment: Emerging Omics Technologies**, Springer, New Delhi, 2016.
- SAMI, F.; YUSUF, M.; FAIZAN, M.; FARAZ, A.; HAYAT, S. Role of sugars under abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 54–61, 2016.
- SAPSE, A. Gamma-aminobutyric acid (GABA). In: **Molecular orbital calculations for amino acids and peptides**, SAPSE, A. (ed), p. 27–40, Springer, Berlin, 2012.
- SCALSCHI, L.; VICEDO, B.; CAMAÑES, G.; FERNANDEZ-CRESPO, E.; LAPEÑA, L.; GONZÁLEZ-BOSCH, C.; GARCÍA-AGUSTÍN, P. Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against *Pseudomonas syringae* by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways. **Molecular Plant Pathology**, v. 14 (4), p. 342–355, 2013.
- SCOTT-TAGGART, C. P.; CAUWENBERGHE, O. R.; MCLEAN, M. D.; SHELPS, B. J. Regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis in situ by glutamate availability. **Physiologia Plantarum**, v. (4), p. 363–369, 1999.

SEIFIKALHOR, M.; ALINIAEIFARD, S.; HASSANI, B.; NIKNAM, V.; LASTOchkina, O. Diverse role of  $\gamma$ -aminobutyric acid in dynamic plant cell responses. **Plant Cell Reports**, v. 38 (8), p. 847–867, 2019.

SHABALA, S. Signalling by potassium: another second messenger to add to the list? **Journal of Experimental Botany**, v. 68 (15), p. 4003–4007, 2017.

SHAHID, M. A.; BALAL, R. M.; KHANC, N.; ROSSI, L.; RATHINASABAPATHI, B.; LIU, G.; KHAN, J.; CÁMARA-ZAPATA, J. M.; MARTÍNEZ-NICOLAS, J. J.; GARCIA-SANCHEZ, F. Polyamines provide new insights into the biochemical basis of Cr-tolerance in Kinnow mandarin grafted on diploid and double-diploid rootstocks. **Environmental and Experimental Botany**, v. 156, p. 248–260. 2018.

SHAHID, S. A.; ZAMAN, M.; HENG, L. Soil salinity: historical perspectives and a world overview of the problem. In: **Guideline for salinity assessment, mitigation and adaptation using nuclear and related techniques**, Zaman, M.; Shahid, S. A.; Heng, L (ed), Springer, Cham, p. 43–53, 2018.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, 2012.

SHELP, B. J.; BOWN, A. W.; MCLEAN, M. D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 446–452, 1999.

SHELP, B. J.; BOZZO, G. G.; TROBACHER, C. P.; ZAREI, A.; DEYMAN, K. L.; BRIKIS, C. J. Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. **Plant Science**, v. 193, p. 130–135, 2012.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53 (372), p. 1305–1319, 2002.

SHINOZAKY, K.; UEMARA, M.; BAILEY-SERRES, J.; BRAY, E. A.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, 2 ed., BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (ed), Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1051–1100, 2015.

SHU, S.; GUO, S. R.; SUN, J.; YUAN, L. Y. Effects of salt stress on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Cucumis sativus* and its protection by exogenous putrescine. **Physiologia Plantarum**, v. 146 (3), p. 285–296, 2012.

SHU, S.; YUAN, Y.; CHEN, J.; SUN, J.; ZHANG, W.; TANG, Y.; ZHONG, M.; GUO, S. The role of putrescine in the regulation of proteins and fatty acids of thylakoid membranes under salt stress. **Nature Scientific Reports**, n. 5, 2015.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. V.; ARORA, K. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, v. 53, p. 65–73, 2007.

- SINGH, A. K.; SINGH, R. A.; KUMAR, S. Influence of salinity on seedling growth and metabolism in maize genotypes. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 95–99, 2008.
- SOBAHAN, M. A.; ARIAS, C. R.; OKUMA, E.; SHIMOISHI, Y.; NAKAMURA, Y.; HIRAI, Y.; MORI, I. C.; MURATA, Y. Exogenous proline and glycinebetaine suppress apoplastic flow to reduce Na<sup>+</sup> uptake in rice seedlings. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, p. 2037–2042, 2009.
- SOBIESZCZUK-NOWICKA, E.; LEGOCKA, J. Plastid-associated polyamines: their role in differentiation, structure, functioning, stress response and senescence. **Plant Biology**, v. 16 (2), p. 297–305, 2014.
- SUDHAKAR, C.; VEERANAGAMALLAIAH, G.; NARESHKUMAR, A.; SUDHAKARBABU, O.; SIVAKUMAR, M.; PANDURANGAIAH, M.; KIRANMAI, K.; LOKESH, U. Polyamine metabolism influences antioxidant defense mechanism in foxtail millet (*Setaria italica* L.) cultivars with different salinity tolerance. **Plant Cell Reports**, v. 34 (1), p. 141–156, 2015.
- SUPRASANNA, P.; NIKALJE, G. C.; RAI, A. N. Osmolyte Accumulation and Implications in Plant Abiotic Stress Tolerance. In: Iqbal, N.; Nazar, R.; Khan, N. A. (eds) **Osmolytes and plants acclimation to changing environment: Emerging Omics Technologies**, Springer, New Delhi, 2016.
- TAVAKKOLI, E.; RENGASAMY, P.; MCDONALD, G. K. High concentrations of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 61(15), p; 4449–4459, 2010.
- TAKEDA, T., NAKANO, Y. SHIGEOKA, S. Effects of selenite, CO<sub>2</sub> and illumination on the induction of selenium-dependent glutathione peroxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Science**, v. 94, p. 81–88, 1993.
- TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T.; BITRIÁN, M., ALCÁZAR, R. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. **Planta**, v. 240, p. 1–18, 2014.
- TURANO, F. J.; KRAMER, G. F.; WANG, C. Y. The effect of methionine, ethylene and polyamine catabolic intermediates on polyamine accumulation in detached soybean leaves. **Physiology Plantarum**, v. 101, p. 510–518, 1997.
- US SALINITY LABORATORY STAFF. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. **USDA Handbook 60**, U.S. Government Printing Office, Washington, D. C., 1954.
- VALDEZ-AGUILAR, L. A.; GRIEVE, C.M.; RAZAK-MAHAR, A.; MCGIFFEN, M.; MERHAUT, D. J. Growth and ion distribution is affected by irrigation with saline water in selected landscape species grown in two consecutive growing-seasons: Spring-summer and fall-winter. **HortScience**, v. 46 (4), p. 632–642, 2011.
- VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. T.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) priming enhances the osmotic stress tolerance in *Piper nigrum* Linn. plants subjected to PEG-induced stress. **Plant Growth Regulation**, v. 78 (1), p. 57–67, 2016.

WANG, W.; PASCHALIDIS, K.; FENG, J.; SONG, J.; LIU, J. Polyamine catabolism in plants: a universal process with diverse functions. **Frontiers in Plant Science**, 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**, v. 144 (3), p. 307–313, 1994.

WU, J.; SHU, S.; LI, C.; SUN, J.; GUO, S. Spermidine-mediated hydrogen peroxide signaling enhances the antioxidant capacity of salt-stressed cucumber roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 128, p. 152–162, 2018.

XUE, X.; LIU, A.; HUA, X. Proline accumulation a transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. **BMB Reports**, v. 42, p. 28–34, 2009.

XU, Y.; SUN, X.; JIN, J.; ZHOU, H. Protective effect of nitric oxide on light-induced oxidative damage in leaves of tall fescue. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 512–518, 2010.

YADAV, S.; IRFAN, M.; AHMAD, A.; HAYAT, S. Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: A review. **Journal of Environmental Biology**, v. 167 (7), p. 667–685, 2011.

YAMASAKI, H.; COHEN, M. F. NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 522–524, 2006.

YANG, Y.; GUO, Y. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. **New Phytologist**, v. 217 (2), p. 523–539, 2018.

YASAR, F.; UZAL, O.; OZPAY, T. Changes of the lipid peroxidation and chlorophyll amount of green bean genotypes under drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, p. 2705–2709, 2010.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209–213, 1955.

YIN, L.; WANG, S.; TANAKA, K.; FUJIHARA, S.; ITAI, A.; DEN, X.; ZHANG, S. Silicon-mediated changes in polyamines participate in silicon-induced salt tolerance in *Sorghum bicolor* L. plant. **Cell and Environment**, v. 39 (2), p. 245–258, 2016.

ZANELLA, M.; BORGHI, G. L.; PIRONE, C.; THALMANN, M.; PAZMINO, D.; COSTA, A.; SANTELIA, D.; TROST, P.; SPARLA, F.  $\beta$ -amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 67 (6), p. 1819–1826, 2016.

ZHANG, G.; XU, S.; HU, Q.; MAO, W.; GONG, Y. Putrescine plays a positive role in salt-tolerance mechanisms by reducing oxidative damage in roots of vegetable soybean. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 13, p. 349–357, 2014.



ZHANG, J. L.; SHI, H. Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. **Photosynthesis Research**, v. 115 (1), p. 1–22, 2013.

ZHAO, X.; WEI, P.; LIU, Z.; YU, B.; SHI, H. Soybean Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter *GmsSOS1* enhances antioxidant enzyme activity and reduces Na<sup>+</sup> accumulation in *Arabidopsis* and yeast cells under salt stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, p.19, 2017.

ZHU, J.K. Plant salt tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 66–71, 2001.

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

ZHU, J. K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current Opinion in Plant Biology**, Volume 6 (5), p. 441–445, 2003.