

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

MARIA REIS VALOIS COELHO

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Calotropis procera* SOB SALINIDADE E
EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE AQUAPORINAS**

Recife

2019

MARIA REIS VALOIS COELHO

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Calotropis procera* SOB SALINIDADE E
EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DE AQUAPORINAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Ecologia e Conservação

Orientador: Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Coelho, Maria Reis Valois

Respostas fisiológicas de *Calotropis procera* sob salinidade e expressão gênica diferencial de aquaporinas / Maria Reis Valois Coelho - 2019.

110 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Mauro Guida dos Santos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. *Calotropis procera* 2. Salinidade 3. Aquaporinas
I. Santos, Mauro Guida dos (Orientador) II. Título

583.93

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-005

MARIA REIS VALOIS COELHO

**FISIOLOGIA DE *Calotropis procera* SOB SALINIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA
DIFERENCIAL DE AQUAPORINAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Biologia Vegetal. Área de Concentração: Ecologia e Conservação.

Aprovada em: 22/02/2019

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos / UFPE

Dra. Gabriella Frosi Albuquerque Figueirôa Faria / UFPE

Prof. Dr. Marciel Teixeira de Oliveira / UFPE

Prof. Dr. Hiram Marinho Falcão / UPE

À minha família, que incentivou e apoiou meus estudos (Dedico).

Ao meu esposo Fábio, meu companheiro de vida (ofereço).

AGRADECIMENTOS

A tese de doutorado é fruto da construção de uma vida, em que cada pessoa que encontramos e convivemos neste caminho de alguma forma contribui para que a tese seja concretizada.

Não poderia deixar de agradecer a Deus por me proteger, guiar meus pensamentos e passos, e por me fortalecer nas adversidades.

À minha família, pelo amor, cuidado e apoio a mim dedicados, por ser base de toda minha existência. Em especial ao meu pai Neto e minha mãe Marina por serem exemplos de boas pessoas e pela construção do meu caráter. As minhas irmãs Marise e Semari pela parceria incondicional. E as minhas sobrinhas (Luma, Alice, Sofia e Cecília) por trazerem tanta leveza a minha vida.

Ao meu esposo Fábio, pelo amor e esforços a mim dedicados e por dar suporte para que minhas metas de vida sejam alcançadas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos pelo exemplo de comprometimento e seriedade, apoio e ensinamentos.

À Profa. Dra. Rebeca Rivas por contribuir extensivamente para que o experimento, análises, e confecção deste trabalho fossem realizados. Por compartilhar seus ensinamentos e principalmente pela construção da nossa linda amizade.

À Profa. Dra. Valesca Pandolfi pelo carinho, amizade, ensinamentos e por não medir esforços para meu aprendizado nas análises moleculares.

Ao Dr. José Ribamar Neto pelos ensinamentos, amizade e companhia que sempre alegrava o meu dia.

À Profa. Dra. Ana Maria Benko, pela orientação e por abrir as portas do seu laboratório para que análises moleculares fossem realizadas.

Aos professores Dr. Marciel Oliveira, Dr. Fernando Oliveira, Dr. Hiram Falcão e Dra. Gabriella Frosi pela participação na banca e pelas valiosas contribuições a tese.

Ao grupo LGBV, minha casa adotiva, pelo carinho e pelas experiências compartilhadas.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Gabriella, Gleice, Rafaela, Luana, Hiram, Mariana, Vanessa, Marciel, Diego, Laís e Silvia pela amizade, pelo conhecimento compartilhado e por contribuir para que o experimento e as análises fisiológicas fossem realizados. Sem o trabalho em equipe de vocês este trabalho nem começaria.

Aos colegas da pós-graduação em Biologia Vegetal pela sincera amizade, em especial Eline, Nayara, Gésica e Maryana.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO

A salinidade é considerada um dos principais problemas da produtividade agrícola afetando diversos processos fisiológicos, metabólicos e moleculares responsáveis pelo crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das plantas. *Calotropis procera* (Apocynaceae) é uma espécie invasora encontrada sempre-verde em regiões adversas de seca e salinidade, exibindo grande potencial para estudos ecofisiológicos e para a identificação de genes de tolerância aos estresses abióticos. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar respostas fisiológicas e moleculares de plantas jovens de *Calotropis procera* sob salinidade. Sob condições de choque salino (200 mM de NaCl) de curto prazo (três dias) foram avaliados os parâmetros conteúdo hídrico relativo, trocas gasosas, solutos orgânicos de raízes e folhas, como também a expressão gênica de aquaporinas (*PIPs*, *TIPs*) no sistema radicular. Sob diferentes condições de estresse salino (50, 100, 200 mM de NaCl) foi avaliada a estabilidade de dez genes de referência (GRs) para normalização da expressão gênica (qPCR) de raízes e folhas de *C. procera* em diferentes tempos de coleta utilizando os algoritmos de estabilidade *geNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper*. Comparado ao controle, plantas de *C. procera* submetidas ao choque salino mostraram redução de condutância estomática, assimilação de CO₂, transpiração e baixo decréscimo do conteúdo hídrico relativo foliar, principalmente ao 3º dia de choque salino. Em geral, após horas (2 h, 8 h, 24 h) e dias (30 h, 48 h, 54 h) de imposição do choque salino foi observada regulação positiva dos metabólitos em raízes, com maior acúmulo de frutose (251%) às 2 h, prolina às 8 h (259%), carboidratos solúveis (294%) e sacarose (373%) às 48 h, aminoácidos (1193%) às 54 h. As aquaporinas de raízes apresentaram expressão diferencial sob choque salino. Regulação positiva foi observada somente às 2 h, com maior indução *TIP1.4* (4 vezes), e a regulação negativa ocorreu principalmente às 8 h, com repressão mais acentuada de *PIP1.2* (4 vezes). Os quatro RGs mais estáveis apresentaram alta congruência entre todas as combinações de tempo de coleta, para cada *software* estudado, com pequenas divergências. *CYP23* foi o melhor RG (rank dos quatro melhores) para todas as condições experimentais. Os dados indicaram que a alta salinidade promove uma resposta rápida nos parâmetros fisiológicos de plantas de *C. procera* sob condições de casa de vegetação. Essa espécie utiliza metabólitos envolvidos nos processos de osmorregulação e osmoproteção para aclimação ao estresse osmótico, com rápida regulação da dinâmica destes metabólitos no sistema radicular. Além de exibir modulação da expressão de aquaporinas de raízes para o controle do fluxo de água sob choque salino. Neste sentido, o acúmulo de carboidratos e

aminoácidos associado à regulação da expressão de aquaporinas contribuem para a alta performance do sistema radicular e alívio do status hídrico foliar sob choque salino. Além disso, este estudo forneceu a primeira seleção de genes de referência estáveis para *C. procera* sob estresse salino.

Palavras chave: qPCR. Genes normalizadores. Proteínas intrínsecas de membrana plasmática. Proteínas intrínsecas de tonoplasto. Trocas gasosas. Solutos osmóticos

ABSTRACT

Salinity is considered one of the main problems of agricultural productivity affecting various physiological, metabolic and molecular processes responsible for plant growth, development and survival. *Calotropis procera* (Apocynaceae) is an invasive species found evergreen in adverse regions of drought and salinity, showing great potential for ecophysiological studies and for the identification of abiotic stress tolerance genes. Given the above, the objective of the present work was to characterize physiological and molecular responses of young plants of *C. procera* under salinity. Under salt shock conditions (200 mM of NaCl) short-term (three days) were evaluated regarding water content parameters, gas exchange, organic solutes roots and leaves, as well as gene expression of aquaporin (*PIPs*, *TIPs*) in the root system. Under different conditions of stress (50, 100, 200 mM of NaCl) was evaluated stability ten reference genes (GRs) for normalization of gene expression (qPCR) of roots and leaves of *C. procera* at different times of collection using the algorithms stability geNorm, NormFinder and, BestKeeper. Compared to the control, *C. procera* plants submitted to salt shock showed reduction of stomatal conductance, CO₂ assimilation, transpiration and low decrease of leaf relative water content, especially on the 3rd day of salt shock. In general, after hours (2 h, 8 h, 24 h) and days (30 h, 48 h, 54 h) of saline imposition, positive regulation of the metabolites in roots was observed, with higher fructose accumulation (251%) at 2 h, proline at 8 h (259%), soluble carbohydrates (294%) and sucrose (373%) at 48 h, amino acids (1193%) at 54 h. Twelve aquaporins associated with water transport showed differential expression in *C. procera* roots under salinity. Transcriptional induction was observed only after 2 h, with greater induction of *TIP1.4* (4 times), transcriptional repression, in turn, occurred mainly after 8 h, with greater repression associated with aquaporin *PIP1.2* (4 times). The four most stable RGs showed high congruence among all collection time combinations for each software studied, with small divergences. *CYP23* was the best RG (top four rank) for all experimental conditions. The data indicated that high salinity promotes a fast response in physiological parameters of *C. procera* plants under greenhouse conditions. This species uses metabolites involved in osmoregulation and osmoprotection processes for acclimation to osmotic stress, with rapid regulation of the dynamics of these metabolites in the root system. It also exhibits modulation of root aquaporin expression for salt shock water flow control. In this sense, the presence of a stomatal control robot associated with the accumulation of amino acids and carbohydrates and the regulation of aquaporin expression in the root contribute to the high performance of the root system and to

the relief of leaf water status of *C. procera* under salt shock. In addition, this study provided the first selection of stable reference genes for *C. procera* under saline stress.

Keywords: qPCR. Normalizing genes. Plasma membrane intrinsic proteins. Tonoplast intrinsic proteins. Gas exchange. Osmotic solutes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1	<i>CALOTROPIS PROCERA</i>	14
2.2.	SALINIDADE	15
2.2.1	Respostas e mecanismos de tolerância ao estresse salino.....	16
2.3	AQUAPORINAS	18
2.4	NORMALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	21
3	SELECTION AND VALIDATION OF SUITABLE REFERENCE GENES OF <i>CALOTROPIS PROCERA</i> UNDER DIFFERENT SALT STRESS CONDITIONS	24
4	CHOQUE SALINO EM <i>CALOTROPIS PROCERA</i> LEVA AO ACÚMULO DE AÇÚCARES, AMINOÁCIDOS E MODULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE AQUAPORINAS EM RAÍZES ALIVIANDO O STATUS HÍDRICO FOLIAR	61
5	CONCLUSÃO.....	98
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXO A - NORMAS DO PERIÓDICO PLOS ONE	109
	ANEXO B - NORMAS DO PERIÓDICO JOURNAL PLANT PHYSIOLOGY	110

1 INTRODUÇÃO

Condições de estresse salino sujeitam as plantas a grandes perdas de água e toxicidade iônica, o que põe em risco a conservação de água nos tecidos e sua sobrevivência. Ambientes salinos acarretam um desenvolvimento vegetal limitado, e em geral, as plantas respondem por meio de mudanças na morfologia, fisiologia, processos bioquímicos e moleculares que coletivamente irão permitir um grau de tolerância (FLOWERS, 2004; NEGRÃO et al., 2017).

As respostas ao estresse salino ocorrem a partir do uso de mecanismos de conservação de água nos tecidos, como por exemplo, redução da transpiração por meio do fechamento estomático, acúmulo de solutos orgânicos para a redução do potencial osmótico e regulação da expressão de aquaporinas (CUSHMAN, 2001; FLEXAS et al., 2004; MOSHELION et al., 2014). Mas também, pelo desenvolvimento de mecanismos de tolerância do tecido, exclusão de sódio e osmoproteção a partir da ativação de transportadores de Na^+ , acúmulo de solutos orgânicos e aumento da atividade de enzimas antioxidantes (CUSHMAN, 2001; DEINLEIN et al., 2014; HANIN et al., 2016; TAÏBI et al., 2016).

A espécie invasora *Calotropis procera* (Aiton) W. T. Aiton (Apocynaceae) possui alta capacidade de ocupar, crescer e se reproduzir em ambientes adversos de seca e salinidade (FABRICANTE et al., 2013; HASSAN et al., 2015), e por isso adaptou-se muito bem desde a restinga até as regiões semiáridas brasileiras. A espécie pode ser um importante modelo de estudo ecofisiológico, pois apesar de apresentar metabolismo C_3 , é uma espécie bem adaptada as condições de estresse hídrico e salino, e com alta performance fotossintética sob baixa condutância estomática (TEZARA et al., 2011; FROSI et al., 2013; RIVAS, 2016; RIVAS et al., 2017).

O controle da entrada e saída de água pelo sistema radicular de *C. procera* pode ser responsável em parte pela tolerância as condições estressantes em que se estabelece esta espécie. Visto que, quando em condições de salinidade, o sistema radicular deve atuar de forma não limitante, desenvolvendo mecanismos que permita contrabalancear a resistência na captação de água do solo e as perdas de água pela transpiração a fim de manter o balanço hídrico e evitar a desidratação da planta (MOSHELION et al., 2014; ROBBINS; DINNENY, 2015).

O controle da expressão de aquaporinas (proteínas canais de membrana) tem sido relatado como o principal mecanismo utilizado pelas raízes para manter a hidratação das plantas, porque estes canais de membrana são responsáveis pela maior proporção de entrada e saída de água das células vegetais, exercendo efeitos na absorção de água nas raízes,

condutância hidráulica e transpiração. Todos esses fatores conferem as aquaporinas uma importância na fisiologia da planta como um todo, inclusive estando envolvidas em diversos mecanismos de tolerância aos estresses abióticos (LI et al., 2014; MOSHELION et al., 2014).

Dessa forma, o conhecimento do comportamento fisiológico de *C. procera* sob condições de salinidade poderá responder como uma espécie de metabolismo C₃, pode promover a manutenção do balanço hídrico, mantendo-se sempre-verde sob condições adversas. Neste sentido, este estudo teve como objetivo caracterizar respostas fisiológicas e moleculares de *C. procera* sob salinidade com foco na habilidade de absorção de água do sistema radicular por meio da atividade das aquaporinas e acúmulo de solutos osmóticos a fim de fornecer informações relevantes para o melhoramento genético de plantas do metabolismo C₃.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CALOTROPIS PROCERA

A espécie *Calotropis procera* é conhecida popularmente como algodão-de-seda, flor-de-seda, ciúme, leiteira, queimadeira, paininha-de-seda, janaúba (GALLEGOS-OLEA et al., 2008; RANGEL; NASCIMENTO, 2011) pertence à família Apocynaceae e a um pequeno gênero constituído pelas espécies *C. procera*, *C. acia*, e *C. gigantea* (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP 2009). É uma espécie xerófita, perene, de porte arbustivo/semi-arbóreo, de crescimento rápido e raízes profundas (até 4 m) com alta capacidade de regeneração (HASSAN et al., 2015). Sua floração e frutificação ocorre todo o ano, com pico na estação seca. Apresenta grande produção de sementes aladas de alta capacidade de germinação e dispersão pelo vento (VOGT, 1996; BARBOSA et al., 2007; CSURHES, 2009; HASSAN et al., 2015). Nativa da Ásia e da África, a espécie é amplamente distribuída no globo, predominando em regiões tropicais e subtropicais (RAHMAN; WILCOCK, 1991; HASSAN et al., 2015). No Brasil a espécie é altamente distribuída na região Nordeste (exceto Alagoas), podendo ser encontrada no sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo), norte (Amapá, Pará, Tocantins) e região centro-oeste (Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal) (KOCH et al., 2015). *C. procera* é comumente encontrada em ambientes áridos e semiáridos habitando áreas salinizadas, desertos, áreas degradadas, terrenos baldios e beira de estrada (CAB INTERNATIONAL, 2005; KHAN et al., 2007).

Calotropis procera é utilizada na medicina por possuir diversos princípios ativos com funções antiinflamatória, analgésica, antitumoral, antidiarreica, hepatoprotetora, contraceptiva e antidiabética (HUSSEIN et al., 1994; TANIRA et al., 1994; MUEEN et al., 2005; KUMAR e ARYA, 2006; SILVA et al., 2010). A espécie também é usada na fitorremediação de solos contaminados, forragem animal, como corante têxtil, e a sua biomassa é um recurso para a produção de combustíveis renováveis (HASSAN et al., 2015; ALMEIDA et al., 2017; HUSSAAN et al., 2017).

Essa espécie exibe metabolismo C_3 , alto potencial colonizador, crescimento e manutenção das folhas sempre-verde em ambientes salinos e desérticos (COLOMBO et al., 2007; TEZARA et al., 2011; HASSAN et al., 2015), mostrando tolerância a diversos estresses abióticos. Estudos evidenciam a capacidade de *C. procera* em manter elevadas taxas fotossintéticas sob baixa condutância estomática, o que garante a espécie alta eficiência do uso da água sob seca e salinidade (TEZARA et al., 2011; FROSI et al., 2013; RIVAS, 2016; RIVAS

et al., 2017). Sua alta performance fotossintética sob déficit hídrico foi atribuída a fatores não-estomáticos, como aumento da condutância do mesófilo, taxa de carboxilação da Rubisco e transporte de elétrons (RIVAS et al. 2017, RIVAS, 2016). Além do mais, a espécie também apresenta mecanismos de osmoregulação e osmoproteção a partir de solutos compatíveis, robusto sistema de defesa antioxidante e plasticidade anatômica frente a seca e a salinidade (TEZARA et al., 2011; FROSI et al., 2013; RIVAS, 2016; RIVAS et al., 2017). Recentemente o transcriptoma foliar da espécie frente ao choque salino e ao déficit hídrico foi descrito, evidenciando a presença de resposta transcricional rápida e altamente dinâmica ao longo do tempo. Os genes regulados estavam envolvidos principalmente na resposta ao estresse abiótico, citocininas e sinalização do inositol (MUTWAKIL et al., 2017).

2.2. SALINIDADE

O processo de salinização dos solos ocorre quando os níveis de sais alcançam 4dS/m, equivalente a uma concentração de 40 mM (BUI, 2013). Os principais sais acumulados são os cloretos e sulfatos de Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} . A salinização do solo pode ocorrer por meios naturais a partir intemperismo das rochas e evaporação, como também por interferências antrópicas por meio do mau uso da terra, em que incluem irrigação com águas salinas, uso excessivo de sais em solo de cultivo e deposição de águas de resíduos industriais (PEDROTTI et al., 2015).

O excesso de sal no solo afeta a produtividade e sobrevivência das plantas sendo um dos principais fatores responsáveis pelo processo de desertificação no mundo (D'ODORICO et al., 2013). Estima-se que 1128 milhões de hectares dos solos no mundo são salinizados, em que incluem 20% das terras aráveis (WICKE et al., 2011). Além de causar graves problemas ambientais, a salinidade leva a perdas consideráveis para a agricultura mundial inviabilizando também a exploração de novas terras agricultáveis (PEDROTTI et al., 2015). São contabilizados prejuízos de US \$ 27,3 bilhões a economia por ano (QADIR et al., 2014), e de acordo com especulações a tendência é que os impactos ambientais e econômicos gerados pela salinidade sejam ainda maiores devido a necessidade do aumento de áreas aráveis e consequentemente de irrigação para suprimento de alimentos da população mundial crescente (HANIN et al., 2016).

Em climas áridos e semiáridos a salinização dos solos é favorecida por proporções de evapotranspiração maiores do que os volumes de precipitação ao longo do ano (HANIN et al., 2016) sendo um problema para a agricultura no nordeste do Brasil, em que grande proporção dos solos irrigados são afetados pela salinidade (AGUIAR NETTO et al., 2007).

2.2.1 Respostas e mecanismos de tolerância ao estresse salino

O estresse salino caracteriza-se como a exposição das plantas à salinidade, cujo principal componente é o NaCl. Pode ocorrer por meio da exposição gradual ou por baixos níveis de sal, entretanto, quando as plantas são expostas repentinamente a elevados níveis de salinidade o estresse salino caracteriza-se como choque salino (SHAVRUKOV, 2012).

O estresse salino pode ser separado em duas etapas: estresse osmótico em que ocorre imediatamente após a exposição a salinidade, e o estresse iônico que geralmente ocorre de forma mais lenta, porém quando as plantas são expostas a níveis extremos de sal pode ocorrer de forma mais rápida. O estresse osmótico ocorre devido ao excesso de sal reduzir o potencial hídrico do solo dificultando a captação de água, o que provoca déficit hídrico e redução da turgescência celular (MUNNS, 2002; MUNNS; TESTER, 2008; SHAVRUKOV, 2012). Já o estresse iônico é consequência da entrada de íons Na^+ e Cl^- na planta de forma excedente causando toxicidade iônica, que resulta em danos nas estruturas subcelulares, inibição da síntese de proteínas, fotossíntese e respiração (MUNNS, 2002; MUNNS; TESTER, 2008; RUIZ-LOZANO et al., 2012; SHAVRUKOV, 2012).

Durante a salinidade o crescimento é afetado imediatamente após a exposição ao sal, por meio da redução do alongamento celular e posteriormente pela redução da divisão celular em resposta ao déficit hídrico. Nessa fase inicial, a redução de crescimento da parte aérea ocorre antes que as células da lâmina foliar sejam afetadas pela redução do turgor, devido a rápida sinalização hormonal transmitida pelas raízes. A fase de resposta mais tardia está relacionada a redução da produção de fotoassimilados resultante das injúrias provocadas pelo excesso sal nas células. Além disto, o excesso de sal afeta o crescimento da parte aérea em maior proporção que o sistema radicular, reduzindo o tamanho e o aparecimento de folhas (MUNNS, 2002; MUNNS; TESTER, 2008).

Devido a presença de déficit hídrico, uma das primeiras respostas à salinidade é a redução da condutância estomática para amenizar as perdas de água pela transpiração. Esta resposta afeta a disponibilidade de CO_2 causando a redução da fotossíntese. Em adição, alterações na estrutura física dos espaços intercelulares, na bioquímica (conversão de gás carbônico a bicarbonato) e na permeabilidade de membrana (aquaporinas) ocorridas durante a salinidade afetam a condutância do mesófilo reduzindo ainda mais a disponibilidade de CO_2 para a produção de fotoassimilados. Sob altas concentrações de sal a fotossíntese também é afetada pelas alterações do metabolismo do carbono, a exemplo da inibição da atividade de

enzimas do ciclo de Calvin e pelos danos ao aparato fotoquímico causado pelo estresse oxidativo (FLEXAS et al., 2004; CHAVES et al., 2009; HANIN et al., 2016).

A tolerância ao sal é geralmente avaliada como a porcentagem de produção de biomassa (espécies anuais), mas também pela capacidade de sobrevivência das plantas (espécies perenes) (MUNNS, 2002). As plantas apresentam diferentes graus de tolerância a salinidade podendo ser classificadas como glicófitas, plantas sensíveis a salinidade, que apresentam o crescimento inibido em concentrações de sais de 100-200 mM, estando a maioria das plantas cultiváveis; e como halófitas: plantas altamente tolerantes que podem crescer sob altas concentrações de NaCl (300-400 mM) (ROY et al., 2014).

Diante da salinidade, as plantas desencadeiam mecanismos de tolerância exibindo alterações anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares para lidar com o estresse osmótico e iônico. Estas respostas de tolerância em plantas podem ser categorizadas em: tolerância ao estresse osmótico, tolerância por meio da exclusão de Na^+ foliar e tolerância do tecido ao Na^+ (MUNNS; TESTER, 2008)

Na tolerância ao estresse osmótico a planta promove o ajuste osmótico para manter a conteúdo de água dos tecidos por meio do acúmulo de solutos orgânicos no citosol e acúmulo de íons no vacúolo (SLAMA et al., 2015). A tolerância osmótica permite a planta aumentar a capacidade de manter a produção de novas folhas e crescimento para um dado acúmulo de Na^+ no tecido foliar (MUNNS; TESTER, 2008). No entanto, altos custos metabólicos são necessários para a realização do ajuste osmótico (MUNNS, 2002).

Os solutos orgânicos que participam desse processo também são denominados osmólitos compatíveis devido a capacidade acumular-se às altas concentrações dentro das células sem prejudicar a função celular (SLAMA et al., 2015). Entre os osmólitos compatíveis que são acumulados durante a salinidade estão os carboidratos, aminoácidos, polióis e compostos nitrogenados (CUSHMAN, 2001; SILVEIRA et al., 2009; SZABADOS; SAVOURE, 2010; SLAMA et al., 2015; SAMI et al., 2016; MANSOUR; ALI, 2017).

A prolina é um dos aminoácidos que mais é acumulado em plantas sob condições de estresse. Geralmente sob condições de salinidade o acúmulo desse aminoácido em cultiváveis tolerantes aumenta em maior proporção que em cultiváveis sensíveis (MANSOUR; ALI, 2017). Durante o estresse salino, a prolina pode exercer funções de estabilizador de estruturas subcelulares, melhoria da atividade enzimática, estabilização de proteases, eliminação de espécies reativas de oxigênio, aumento da atividade de enzimas de desintoxicação, manutenção

do fluxo de elétrons, redução do acúmulo de Na^+ e Cl^- e aumento da homeostase citosólica de K^+ (SZABADOS; SAVOURE, 2010; MANSOUR; ALI, 2017).

Os carboidratos são uma classe de metabólitos compatíveis reconhecidos por apresentar inúmeras funções, mediando processos fisiológicos vitais das plantas (SAMI et al., 2016; MARTÍNEZ-NOËL; TOGNETTI, 2018). Os carboidratos como sacarose, trealose, glicose e frutose são acumulados para aliviar os efeitos negativos do estresse salino atuando na homeostase osmótica, eliminação de radicais livres e estabilização de membranas. Além disto, os carboidratos estão relacionados com a sinalização do estresse modulando expressão de genes, redução do Na^+ e aumento da captação de K^+ sob salinidade (SAMI et al., 2016; MARTÍNEZ-NOËL; TOGNETTI, 2018).

O principal local de toxicidade do Na^+ são as folhas e por isto as plantas desencadeiam mecanismos para evitar que o sódio seja transportado e acumulado nos órgãos fotossintetizantes. As vias pelas quais o sal é excluído ocorrem desde a seletividade na captação de Na^+ pela raiz, carregamento do xilema preferencial ao K^+ ao invés do Na^+ e remoção de sódio do xilema realizado pelas raízes, caule, pecíolo e bainhas foliares (WILLADINO; CAMARA, 2010).

Outros mecanismos que contribuem para a exclusão de sódio são a exportação de Na^+ das folhas para o floema, extensão da via apoplástica radial e também presença de glândulas e vesículas de sal encontradas especificamente em plantas halófitas (WILLADINO; CAMARA, 2010). Os transportadores envolvidos no processo de exclusão de Na^+ são as proteínas SOS1 (trocaador de Na^+/H^+ 7) que promovem o transporte antiporte de Na^+ e H^+ na membrana plasmática excluindo o Na^+ das células radiculares. Além das proteínas *HKTs* (transportador de cátions HKT) que atuam no transporte simporte de Na^+ / K^+ ou uniporte de Na^+ promovendo o influxo de Na^+ do xilema para as raízes e descarregamento do Na^+ da parte aérea para o floema (DEINLEIN et al., 2014; HANIN et al., 2016).

O mecanismo de compartimentalização de íons intracelular permite que a célula vegetal mantenha sua funcionalidade mesmo sob altas concentrações salinas. Neste mecanismo as plantas acumulam o sal no vacúolo para evitar que o Na^+ citosólico iniba grande número de enzimas (WILLADINO; CAMARA, 2010). Os transportadores envolvidos no processo influxo de Na^+ para os vacúolos são as proteínas NHX (trocaador de Na^+/H^+ 1) que promovem o transporte antiporte de Na^+ e H^+ excluindo o sódio do citosol (DEINLEIN et al., 2014).

2.3 AQUAPORINAS

Aquaporinas são proteínas de membranas celulares responsáveis pela maior proporção de transporte de água nas células. Estas proteínas são bastante diversas e estão presentes em todos os organismos. As aquaporinas de plantas fazem parte de uma grande família chamada *MIP* (*Major Intrinsic Protein*) e com base na homologia da sequência e localização sub-celular constituem cinco sub-famílias em plantas superiores: *PIPs* (plasma membrane intrinsic proteins) *TIPs* (tonoplast intrinsic proteins), *NIPs* (Nodulin-26-like major intrinsic protein), *SIPs* (Small basic intrinsic protein) e *XIPs* (X-intrinsic proteins) (WALLACE; ROBERTS, 2004; GOMES et al., 2009; CHAUMONT; TYERMAN, 2017).

Diferente dos animais, as aquaporinas de plantas possuem uma grande diversidade de isoformas (CHAUMONT et al., 2005) sendo identificadas 55 aquaporinas na espécie arbórea *Populus trichocarpa* (GUPTA; SANKARARAMAKRISHNAN, 2009). As proteínas intrínsecas de membrana também possuem grande diversidade funcional, realizando o transporte de água, peróxido de hidrogênio, ureia, amônia, ácido bórico, arsenito, e também de gases como o CO₂ e óxido nítrico (MAUREL et al., 2008; GASPAR, 2011; CHAUMONT; TYERMAN, 2017).

As principais características estruturais da aquaporinas é a presença de seis alfa-hélices hidrofóbicas localizadas em seis domínios transmembrana (H1-H6), conectados por cinco *loops* (LA-LE), dois domínios alfa-hélices nos *loops* B e E, contendo os dois motivos NPA (*asparagine-proline-alanine*) (FORREST; BHAVE, 2007; GOMES et al., 2009). As aquaporinas se estruturam em homotetrâmeros ou heterotetrâmeros, onde cada tetrâmero é formado por quatro canais independentes e um poro central formado pela a união das quatro subunidades, (JUNG et al., 1994; ENGEL et al., 2000; CHAUMONT et al., 2005). Os dois motivos NPA nos *loops* B e E se juntam para formar o poro da proteína (JUNG et al., 1994) e o filtro de seletividade ar/R (*aromatic / arginine*) localizado na região extracelular acima do poro constitui o principal filtro de seletividade de solutos (FU et al., 2000; WALLACE; ROBERTS, 2004; BEITZ et al., 2006; HUB; DE GROOT, 2008; GOMES et al., 2009). As substituições de aminoácidos em filtros ar/R está provavelmente associada a especializações funcionais de transporte em aquaporinas (WALLACE; ROBERTS, 2004; FORREST; BHAVE, 2007).

Membros PIPs são as aquaporinas mais conservadas e mais numerosas em plantas superiores, presentes na membrana plasmática, podem ser encontradas em outras endomembranas (GOMES et al., 2009). Esta subfamília atua no transporte água de alta eficiência controlando quase que a totalidade do potencial de permeabilidade de água da

membrana plasmática por meio dos membros PIP1 e PIP2 (MAESHIMA; ISHIKAWA, 2008, BELLATI et al., 2010). Entre as PIPs, os representantes PIP2 mostram-se mais eficientes, chegando a transportar até 20 vezes mais água que os membros PIP1 em ensaios com oócitos de *Xenopus* (DANIELS et al., 1994). Nestas aquaporinas a abertura e fechamento do poro é regulada por múltiplos efetores, sendo ativadas por fosforilação e inativadas pelo aumento de H^+ , Ca^{2+} e H_2O_2 (MAUREL et al., 2009).

Os membros TIP, estão localizados principalmente na membrana do vacúolo (tonoplasto), e geralmente possuem atividade no transporte de água superior a encontrada para os membros PIP (MAUREL et al., 1997, MAUREL, 2008). Além de água, TIPs são capazes de transportar glicerol, uréia, amônia e CO_2 (MAESHIMA; ISHIKAWA, 2008, MAUREL et al., 2009). As aquaporinas NIP estão localizadas nas membranas peribacteróides de nódulos radiculares atuando no transporte glicerol, boro, ácido silícico e arsenito, porém mostram-se com baixa capacidade de transporte de água (WALLACE et al., 2006, MAESHIMA; ISHIKAWA, 2008, MAUREL et al., 2009). A sub-família SIP é encontrada no retículo endoplasmático e transportam principalmente pequenos solutos básicos e água (baixas proporções) (MAESHIMA; ISHIKAWA, 2008, MAUREL et al., 2009). Já as aquaporinas XIP mostram afinidade de transporte ao H_2O_2 , boro e glicerol e baixa eficiência no transporte de água (BIENERT et al., 2011).

A atividade de aquaporinas exercem grande efeitos na homeostase da água e fisiologia da planta, contribuindo para que o transporte de água seja adaptado constantemente a um ambiente variável e a vários tipos de estresses abióticos (LI et al., 2014). As aquaporinas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos da planta em que incluem o controle da turgescência celular, absorção de água pela raiz, ajuste osmótico, condutância hidráulica, condutância estomática, transpiração, condutância do mesófilo, transporte de nutrientes, fotossíntese, crescimento e desenvolvimento (LI et al. 2014, MOSHELION et al. 2014). As aquaporinas participam na osmorregulação das células vegetais, por meio da regulação da atividade de *PIPs* na membrana plasmática e *TIPs* na membrana do vacúolo permitindo que a planta controle os fluxos de água entre o apoplasto, citosol e vacúolo (MAUREL et al., 2002, ZHAO et al 2007, MAUREL et al 2015) contribuindo para o tamponamento das flutuações osmóticas do citosol causadas pelo estresse hídrico e salino (JOHANSSON et al., 2000).

De acordo com Moshelion et al. (2014), as aquaporinas podem exercer fortes impactos sobre o comportamento fotossintético em plantas condicionadas ao déficit hídrico de forma indireta, por meio de seus efeitos sobre o transporte de H_2O na condutância estomática, e

diretamente por meio de seus efeitos sobre o transporte de CO₂ na condutância do mesófilo. O impacto de aquaporinas nas trocas gasosas foi relatado em estudo com arroz submetido a condições de déficit hídrico. Esse trabalho mostrou que a expressão inadequada de aquaporinas em raízes promovia a limitação na absorção de água, na fotossíntese e eficiência do uso da água em arroz (NADA; ABOGADALLAH, 2014).

Durante o estresse abiótico a regulação transcricional e pós-transcricional de isoformas de aquaporinas é complexa e com padrões por vezes opostas (KAPILAN et al., 2018). Neste contexto existem duas hipóteses divergentes quanto ao comportamento de aquaporinas em condições de déficit hídrico (GASPAR, 2011, HUSSAIN et al. 2011): 1) A melhora na capacidade de plantas em lidar com o déficit hídrico está associada ao aumento dos níveis de aquaporinas nas células vegetais; 2) O desligamento de aquaporinas evitaria maiores perdas de água nas plantas sujeitadas ao déficit hídrico. Em adição, em plantas halófitas a capacidade de manter os níveis de aquaporinas sob salinidade tem sido associada com a tolerância destas espécies (VITALI et al. 2015).

Esta família de proteínas tem sido utilizada como uma importante ferramenta na prospecção de melhoramento de tolerância de plantas as condições de estresses abióticos, devido a resultados positivos obtidos por meio da manipulação genética. Sob condições de seca e salinidade a superexpressão de aquaporinas promove a melhora de parâmetros fisiológicos em muitas espécies (KAPILAN et al., 2018). Estudos com plantas transgênicas destacam a participação de algumas sub-famílias de aquaporinas nos mecanismos de tolerância sob estresses abióticos. Em *Arabidopsis* transgênicas os níveis de condutividade hidráulica e taxas de sobrevivência foram mais elevadas sob condições normais e de seca devido a superexpressão de *SIPIP2; 1*, *SIPIP2; 5*, *SIPIP2; 7* (LI et al., 2016). O gene *PgTIP1* conferiu maior tolerância a salinidade e a seca em soja transgênica, ao manter a homeostase da água, Na⁺ e de espécies reativas de oxigênio (AN et al., 2018). A inibição da expressão de *PIPs* provocava redução no transporte de água nas raízes, condutância hidráulica e potencial hídrico foliar e retardamento na recuperação de plantas após o déficit hídrico (SIEFRITZ et al., 2002).

2.4 NORMALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Nos últimos anos, os avanços nas técnicas de sequenciamento de próxima geração revolucionaram a transcriptômica e rapidamente estabeleceram o RNA-Seq como a metodologia robusta para a análise da expressão gênica (WANG et al, 2009, HASS et al. 2010; JAIN, 2012; GOODWIN et al., 2016). O grande número de dados inéditos sobre a identidade e

níveis de transcritos obtidos pelo sequenciamento em sistemas de plantas contribuiu para o desenvolvimento de técnicas mais precisas e sensíveis de análise de expressão de genes como a PCR em tempo real (qPCR). (USADEL; FERNIE, 2013). A qPCR é uma técnica estabelecida para quantificar mRNA de amostras biológicas amplamente utilizada no estudo de expressão gênica pois é considerada uma técnica, precisa, sensível, de alto rendimento, especificidade e reprodutibilidade (WONG; MEDRANO, 2005). A performance e confiabilidade da técnica de qPCR é dependente da normalização dos dados de expressão por controles endógenos. A normalização corrige as variações entre as amostras consequentes de erros de pipetagem, diferenças no material de partida, na qualidade e quantificação do RNA extraído, eficiência da síntese de cDNA e da reação da PCR (HUGGETT et al. 2005, WONG; MEDRANO, 2005).

Os controles endógenos ou genes de referências usados no processo de normalização são genes que apresentam expressão estável dentro do grupo de amostras do ensaio (WONG; MEDRANO, 2005). Normalmente usam-se genes envolvidos em funções básicas dos processos celulares. Entre os genes amplamente utilizados estão: *ACT*, *GAPDH*, *rRNA*, *TUB*, *UBQ* e *ELF* (HUGGETT et al., 2005, GUTIERREZ et al., 2008, PATANKAR et al., 2016, ZHANG et al., 2017).

Quando a técnica de qPCR foi implantada acreditava-se que os genes de referência apresentavam estabilidade de expressão universal, e por isto eram utilizados sem a prévia validação de estabilidade. Entretanto, genes amplamente empregados na normalização podem exibir expressão variável diante de diversas condições experimentais como a salinidade, seca, frio, calor, injúrias, estresse biótico, entre espécies, tecidos, estágios de desenvolvimento, entre outras (WONG; MEDRANO, 2005, SINGH et al. 2015, ZHUANG et al., 2015, XIAO et al., 2015, MARTINS et al., 2016, ZHANG et al., 2016, SHIVHARE; LATA 2016, NIU et al., 2017). Neste contexto, a ausência de normalização de dados de qPCR é um grande problema pois pode levar à interpretação errônea dos dados de expressão dos genes (WONG; MEDRANO, 2005, GUTIERREZ et al., 2008, ZHUANG et al., 2015, MARTINS et al., 2016).

Para seleção de controle endógenos, a variação dos níveis de expressão dos candidatos a genes de referência deve ser testada em algoritmos de estabilidade. Entre os algoritmos mais utilizados estão o *geNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper* (VANDESOMPELE et al., 2002, ANDERSEN et al., 2004, PFAFFL et al., 2004). O uso destes algoritmos estatísticos permitem avaliar a estabilidade dos níveis de expressão dos genes candidatos e selecionar genes mais apropriados para a normalização dos dados de qPCR, evitando que os níveis de expressão dos

genes sejam superestimados ou subestimados (GUTIERREZ et al., 2008, ZHUANG et al., 2015).

O *geNorm* calcula a estabilidade de expressão (M) com base na média da variação de pares (V) para um gene de referência candidato com todos os outros genes testados, ao limite padrão $M \leq 1,5$. O *geNorm* também estima o número ideal de genes de referência que devem ser usados para o processo de normalização (VANDESOMPELE et al., 2002). O *NormFinder* por exemplo, calcula a estabilidade de expressão usando algoritmo de modelagem matemática considerando a variação intra e intergrupos dos genes de referência candidatos (ANDERSEN et al., 2004). Já o algoritmo *BestKeeper* calcula o coeficiente de correlação de Pearson (r), obtido pela comparação pareada entre o índice *BestKeeper* gerado pelo algoritmo e os genes de referência candidatos. A correlação de Pearson é determinada como um indicador de estabilidade de expressão, em que genes com maior valor de r e valor de p < 0,05 são mais estáveis (PFAFFL et al., 2004).

Os principais estudos envolvendo expressão gênica em plantas, são focados para o entendimento dos processos chaves que envolvem a tolerância aos estresses abióticos e reconhecimento de genes de tolerância para a bioengenharia molecular. Espécies que habitam ambientes salinizados destacam-se como um importante modelo para descoberta de genes e vias envolvidos com a tolerância a salinidade, portanto a seleção de genes normalizadores para estas espécies é fundamental (HANIN et al., 2016).

3 SELECTION AND VALIDATION OF SUITABLE REFERENCE GENES OF *CALOTROPIS PROCERA* UNDER DIFFERENT SALT STRESS CONDITIONS

Submetido ao periódico Plos One

Normas do periódico estão disponíveis no website:

<https://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

ANEXO A

Reference genes selection for *Calotropis procera* under different salt stress conditions

Maria R. V. Coêlho¹, Rebeca Rivas¹, José Ribamar C. Ferreira-Neto², Valesca Pandolfi², João P. Bezerra-Neto², Ana Maria Benko-Iseppon², Mauro G. Santos^{1*}

¹*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Fisiologia Vegetal, 50670-901, Recife-PE, Brazil.*

²*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório Genética e Biotecnologia Vegetal, 50670-901, Recife-PE, Brazil.*

*Author for correspondence. Tel.: +55 81 2126 8844. Fax: +55 81 2126 7803;
Email: mauro.gsantos@ufpe.br (M.G. Santos).

Abbreviations: ACT, Actin/actin-like conserved site-containing protein; ACT104, Actin 104; CNBL4, calcineurin B-like protein 4; CYP23, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 23; FBOX, F-box protein PP2-A12; MAPK2, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2; NAC78, NAC domain-containing protein 78-like; ND1, NADH dehydrogenase subunit 1; PPR, Putative pentatricopeptide repeat-containing protein; r40S, 40S ribosomal protein S3a; TBB4, Tubulin beta-4-chain; UBQ11, Polyubiquitin 11- like; UBP25, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25; RG, reference gene; TG, target gene; Cq, quantification cycle.

ABSTRACT

Calotropis procera is a perennial Asian shrub with significant adaptation to adverse climate conditions and poor soils. Given its increased salt and drought stress tolerance, *C. procera* stands out as a powerful candidate to provide alternative genetic resources for biotechnological approaches. The qPCR (real-time quantitative polymerase chain reaction), widely recognized among the most accurate methods for quantifying gene expression, demands suitable reference genes (RGs) to avoid over- or underestimations of the relative expression and incorrect interpretation. This study aimed at evaluating the stability of ten RGs for normalization of gene expression of root and leaf of *C. procera* under different salt stress conditions and different collection times. The selected RGs were used on expression analysis of three target genes. Three independent experiments were carried out in greenhouse with young plants: i) Leaf₁₀₀ = leaf samples collected 30 min, 2 h, 8 h and 45 days after NaCl-stress (100 mM NaCl); ii) Root₅₀ and iii) Root₂₀₀ = root samples collected 30 min, 2 h, 8 h and 1day after NaCl-stress (50 and 200 mM NaCl, respectively). Stability rank among the three algorithms used showed high agreement for the four most stable RGs. The four most stable RGs showed high congruence among all combination of collection time, for each software studied, with minor disagreements. *CYP23* was the best RG (rank of top four) for all experimental conditions (Leaf₁₀₀, Root₅₀, and Root₂₀₀). Using appropriated RGs, we validated the relative expression level of three differentially expressed target genes (*NAC78*, *CNBL4*, and *ND1*) in Leaf₁₀₀ and Root₂₀₀ samples. This study provides the first selection of stable reference genes for *C. procera* under salinity. Our results emphasize the need for caution when evaluating the stability RGs under different amplitude of variable factors.

Keywords: Abiotic stress. C₃ species; Invasive plants. Leaf and root tissues. Normalization gene. Plant ecophysiology. qPCR.

1 INTRODUCTION

Calotropis procera (Aiton) W. T. Aiton (Apocynaceae) is an evergreen shrub highly tolerant to drought and salt stresses with remarkable invasive ability in arid and semiarid regions [1]. Due to its pharmacognostic features, this shrub has been used in traditional medicine for the treatment of various diseases [1]. Ecophysiological studies have emphasized the superior physiology of *C. procera*, which show reduced stomatal conductance with a high photosynthetic rate under water deficit [2,3]. These characteristics point the referred species as a rich and attractive source of genes to be used in plant breeding programs for enhancing drought and salinity tolerance. In this sense, gene expression analysis can be used to evaluate the molecular mechanisms involved in plant response to different stresses. In the past years, advances in next-generation sequencing techniques have revolutionized transcriptomics and quickly established RNA-Seq as a robust methodology for gene expression analysis [4–7].

Efforts have focused on transcriptome and/or metabolomics of *C. procera* to study biosynthetic pathways of genes associated to the production of pharmacological compounds [8] and those involved in responses to heat, drought, and salt stresses [9–11]. Because of its sensitivity, accuracy, reproducibility and rapid execution, qPCR has become a routine and robust approach for monitoring differential gene expression and validating data obtained by other methods, including RNA-Seq [12,13]. However, the accuracy of the qPCR results is largely influenced by RNA quality, cDNA preparation method and qPCR efficiency [14]. Such variables can cause quantitative and qualitative differences between the analyzed samples. Thus, a normalization step using endogenous controls [also called reference genes (RGs)] is essential [14–16]. RGs should ideally be constitutively expressed in the studied tissue or cell type and should not be affected by the treatments performed. Additionally, the uniform distribution of their transcripts across different treatments is required, functioning as a calibrator to compare different samples at the same quantitative level. The use of suitable RGs ensures the observed variation in target transcripts quantification is due to changes in expression, avoiding false positives or negatives in the process of gene expression analysis.

The most common RGs used in plants are those involved in fundamental cellular processes such as *actin* (*ACT*), *ubiquitin* (*UBQ*), α -*tubulin* (*TUA*), β -*tubulin* (*TUB*), *18S ribosomal RNA* (*18S rRNA*), *elongation factor 1- α* (*EF1 α*), and *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) [17–19]. Nevertheless, there is evidence that the transcription level of commonly used RGs can vary considerably, depending on the studied species, tissue type,

developmental stage and, physiological and experimental conditions [16,20]. In this context, statistical algorithms such as geNorm [21], NormFinder [22], and BestKeeper [23] have been effectively employed to evaluate the best RGs for normalization of qPCR data.

Regarding *C. procera*, there are no reports to date on the selection of RGs previously submitted to a careful statistical analysis to determine their stability. In addition, considering the available reports, only one RG *GAPDH* [24] or *ACT* [8] has been used for qPCR assays in *C. procera*. This action reduces the statistical robustness of the results. According to MIQE guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative real-time PCR Experiments) [25], the normalization step should be carried out against multiple RGs chosen from a variety of candidate RGs tested with the application of at least one algorithm.

This work verified the expression stability of 10 candidates RGs of *C. procera* in two tissue types (root and leaf) under different salt (NaCl) concentrations and different collect time combinations. Statistical algorithms, including geNorm, NormFinder, and BestKeeper, were used. In this sense, the present study provides the most stable and reliable RGs for each experimental condition. We also tested the selected RGs in the study of the three target genes expression in two tissue types (root and leaf), under different salt concentrations and different imposition of times.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 PLANT MATERIAL AND SALT STRESS ASSAYS

Calotropis procera seeds were collected on the seacoast of Pernambuco state, Brazil (7°50'32.9" S, 34°50'21.2" W, and 160 m away from the sea). Their surface was disinfected by immersion in 0.5 % (v/v) sodium hypochlorite solution for 5 min. Seeds were germinated in Petri dishes with wet filter paper and kept in a growth chamber (at 25 °C, 12 h photoperiod, and 70 % relative humidity). After radicle emergence, seedlings were transferred to pots containing 7 kg of sandy soil and maintained in a greenhouse for three months. Plants were distributed in three independent experiments (S1 Table): i) Leaf₁₀₀ - young plants watered every day with NaCl (100 mM), during 45 days. At 30 min, 2 h, 8 h and 45 days of salt stress, youngest fully expanded leaves were collected; ii) Root₅₀ and iii) Root₂₀₀ - young plants watered every day with NaCl (50 or 200 mM for Root₅₀ and Root₂₀₀, respectively). At 30 min, 2 h, 8 h and 1 day of salt stress, root tissue samples were collected. Control samples were watered daily with distilled water and collected for each salt stress time, respectively in each experiment. All samples were collected from three plant replicates. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until RNA isolation.

2.2 TOTAL RNA ISOLATION AND CDNA SYNTHESIS

Total RNA was isolated from samples (leaf and root tissues) using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Fitchburg WI, USA) by following the manufacturer's instructions. RNA integrity was checked in 1.5 % (w/v) agarose gel electrophoresis, stained with blue-green loading dye I (LGC Biotecnologia, SP, Brazil) and the quantity and quality of RNA samples were evaluated by fluorometry (Qubit, Oregon, USA). Reverse transcription reaction was carried out with 1 µg of total RNA, using the GoScript™ Reverse Transcription System Kit by (Promega, Fitchburg WI, USA) according to manufacturer's instructions (Promega) and stored at -20 °C.

2.3 RNA-SEQ LIBRARIES: SYNTHESIS, SEQUENCING, AND ANALYSIS

We also performed transcriptome sequencing of *C. procera* leaves samples (NCBI Sequence Read Archive identification: PRJNA508417) exposed to NaCl (100 mM) at 30 min, 2 h, 8 h and 45 days after salt stress, including not stressed control samples (0 h and 45 days), according to the Leaf₁₀₀ experiment description (S1 Table and S1 Fig.). Each of the six RNA-Seq libraries was composed by a bulk combining equimolar RNA amounts of the three biological replicates were sequenced using Illumina paired-end sequencing technology on Illumina Hi-Seq TM 2500 platform (S1 Fig.). After cleaning the raw reads and discarding low-quality reads, we ran Trinity [26] to assemble the clean reads into transcripts as described in Haas et al. [27].

Transcript quantification for RNA-Seq reads was performed with RSEM based on mapping the RNA-Seq reads of each experimental library (treatments 30 min, 2 h, 8 h compared to 0 h control and 45 days after stress imposition x 45 days control), against the assembled transcriptome [28] (S1 Fig.). To estimate differential gene expression between our libraries, we used the edgeR tool [29], implemented in the Bioconductor package [30], requiring R software for statistical computing. The differentially expressed transcripts [$\log_2$ Fold-Change (FC) > 2.0 or < - 2.0, and P-value < 0.05] were identified based on comparisons between experimental libraries and respective controls, using the normalized number of fragments mapping on each library. The ‘Fold-Change’ (FC) term afore-mentioned is a measure describing how much a quantity changes as compared with an initial (control) to a final value (treatment).

2.4 SELECTION OF TARGET AND CANDIDATE REFERENCE GENES IN THE *Calotropis procera* RNA-seq LIBRARIES

Ten RGs were selected based on promising candidate genes according to previously published papers for other plant species [31–33], besides Log₂FC between +1.0 and -1.0 and P-value > 0.05 for all the RNA-Seq expression contrasts (Table 1).

We selected, additionally, three target genes (TGs) related to salt stress response from the *C. procera* leaf transcriptome (RNA-Seq) to be used in qPCR gene expression analyses. TGs choice was based on two factors: (i) on their up-regulation (Log₂FC > 2.0 and P-value < 0.05), at least one RNA-Seq expression contrast; and (ii) reported participation in the plant response to saline stress. The following TGs were scrutinized: *ND1* (*NADH dehydrogenase subunit 1* [34], *CNBL4* (*Calcineurin B-like protein 4* [35,36], and *NAC78* (*NAC domain-containing protein 78-like* [37,38] (Table 1).

Table 1. Statistical parameters [Log₂Fold-Change (FC) and *P*-value] of the candidate reference genes (RGs) and target genes (TGs) selected from *Calotropis procera* leaf transcriptome (Illumina HiSeq 2500) under salt stress.

Category	Gene	30 min x Control (0 h)		2 h x Control (0 h)		8 h x Control (0 h)		45 d x Control (45 d)	
		FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value	FC	P-value
RG	<i>MAPK2</i>	- 0.16	0.82	0.14	0.85	- 0.42	0.56	- 0.07	0.93
RG	<i>CYP23</i>	0.35	0.67	0.18	0.83	0.71	0.36	- 0.18	0.79
RG	<i>ACT104</i>	- 0.10	0.88	- 0.17	0.80	0.19	0.78	- 0.07	0.91
RG	<i>TBB4</i>	- 0.95	0.26	0.36	0.35	- 0.47	0.55	0.79	0.24
RG	<i>UBQ11</i>	0.44	0.51	1.00	0.11	0.77	0.24	- 0.34	0.60
RG	<i>ACT</i>	- 0.23	0.76	- 0.41	0.58	0.40	0.58	0.45	0.53
RG	<i>r40S</i>	0.11	0.87	0.03	0.97	1.00	0.50	- 0.12	0.86
RG	<i>PPR</i>	0.29	0.70	0.03	0.98	0.23	0.79	0.15	0.82
RG	<i>UBP25</i>	- 0.48	0.47	- 0.50	0.45	- 1.00	0.30	- 0.07	0.92
RG	<i>F-BOX</i>	- 0.27	0.73	0.28	0.68	0.13	0.87	- 0.69	0.30
TG	<i>NDI</i>	2.69 ^{up}	0.02*	0.77	0.67	- 1.04	0.73	0.24	0.88
TG	<i>CNBL4</i>	0.63	1.00	1.22	0.44	2.75 ^{up}	0.03*	- 1.14	0.35
TG	<i>NAC78</i>	2.74	0.12	2.61 ^{up}	0.01*	3.61 ^{up}	0.01*	0.33	0.71

* means statistical significance ($P < 0.05$), ^{up} Up-regulation of gene expression.

Both RGs and TGs were submitted to the BLASTx (cut-off: $e\text{-value} \leq 3e^{-20}$) at NCBI [Non- redundant protein sequences (nr)] for annotation (Table 2).

Table 2. Primer pair of the candidate reference genes and target genes used in this study.

Gene	Description	Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	T _a (°C)	E (%)		R ²		BLASTx	
					Leaf	Root	Leaf	Root	e-value	ID (%)
Reference genes										
MAPK2	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	F: AATGCTTCTGGGATTCTATGG R: CTTGATCCTATCTGTCGGAGA	94	62	101	100	0.998	0.987	3e-159	59
CYP23	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 23 isoform X2	F: CATGTTCAATCCAGTCGAAGTC R: ATCATCCTTACCAGCAACCAGT	119	62	109	98	0.991	0.987	3e-50	95
ACT104	Actin-104	F: CACAATATGGCTGAGGGTGAG R: GAGCATCATCACCAGCAAATC	91	62	105	103	0.996	0.988	0.0	98
TBB4	Tubulin beta-4 -chain	F: CTTGCACCCTAACTCCACAAA R: CAACTTCCCAGAACTTTGATCC	99	62	107	102	0.998	0.999	0.0	95
UBQ11	Polyubiquitin 11- like	F: GGACCCTTGCTGACTATAATATCC R: CGTGAAGGAACTTAGACATGACC	88	62	101	105	0.994	0.998	7e-129	99
ACT	Actin/actin-like conserved site-containing protein	F: GAGGAGCACCCATTCTTCTCA R: ACTGACTCCATCTCCAGAGTCC	186	62	102	108	0.995	0.991	2e-159	69
r40S	40S ribosomal protein S3a	F: ATACCAGTCCTTCTTGGCAAAC R: CGGGTGATTTATGTGATGCAG	101	62	105	101	0.986	0.957	2e-88	95
PPR	Putative pentatricopeptide repeat-containing protein	F: ATTACCTTGCCTCATTCTGCTC R: AGAAGTCCTCCAGAGATGGTTG	148	62	100	111	0.999	0.999	0.0	73
UBP25	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25	F: AATCACTTCTCTCACCGCTCTC R: ATCAGAGGGAGGGTGCTATTG	138	62	101	100	0.999	0.999	0.0	54
F-BOX	F-box protein PP2-A12	F: CCAGCAACACCACAGAAGAA R: AAGCAGGAAAGGGATTGGT	143	62	107	108	0.994	0.998	2e-69	81
Target genes										
ND1	NADH dehydrogenase subunit 1	F: TTCAAGTATTGCTCCCGTTGGA R: CAGCGCGTAAACCACCTAAAAA	83	62	93	110	0.979	0.999	4e-33	97
CNBL4	Calcineurin B-like protein 4	F: CTTTTGCACGAGTCCGATCTTC R: AGCATCTCTGAACGTCTTATCCA	75	62	96	99	0.999	0.999	1e-45	75
NAC78	NAC domain-containing protein 78-like	F: TGGCGAAGGAAACGTTAGGTAT R: AATTCTCAAGTCTGTCGCCGAT	67	62	103	93	0.890	0.999	3e-20	39

2.5 PRIMER DESIGN PARAMETERS

Transcript-specific primers were designed using the Primer3 web tool (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) with the following parameter settings: length 18 - 22 bp, GC content of 45 % - 55 % (ideal content of 50 %), annealing temperature (T_a) of 58 °C – 62 °C (ideal of 60 °C) and amplified products of 65 - 200 bp (Table 2).

2.6 qPCR SETUP

The qPCR reactions were performed on PCR LineGene 9600 (Bioer, Hangzhou, China) using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Fitchburg WI, USA). Briefly, a 10 µL reaction mixture consisted of 5 µL *SYBR Green Super Mix* (Applied Biosystems, Foster City CA, USA), 2 µL of diluted cDNA (1/10), 0.3 µL for each primer (5 µM) and 2.4 µL ddH₂O. Non-template controls were also included for each primer pair. Reactions were carried out under the following conditions: 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 62 °C for 1 min. The melting curve was generated by varying the amplification temperature from 65 – 95 °C. All qPCR reactions were carried out in triplicate (biological and technical) [25]. The amplification efficiency (E) was determined from a standard curve generated by serial dilutions of cDNA (1/10, 1/100, 1/1000, and 1/10000) for each primer, in triplicate, and calculated by using the equation: $E = 10^{(-1/\text{slope of the standard curve})} - 1$ [39]. Slopes in the range of -3.58 to -3.10 were considered acceptable for the qPCR assay [40]. These slope values correlated to amplification efficiencies between 90% ($E = 1.9$) and 110% ($E = 2.1$).

2.7 ANALYSIS OF THE REFERENCE GENES EXPRESSION STABILITY

Three of the most notorious softwares available – geNorm v 3.5 [21], NormFinder v. 0.953 [22], and BestKeeper [23] – were used to evaluate the expression stability of ten candidate RGs: *ACT104*, *ACT*, *CYP23*, *FBOX*, *MAPK2*, *UBQ11*, *UBP25*, *PPR*, *r40S* and *TBB4* (Table 2). For geNorm and NormFinder, the raw C_q-values were transformed into relative quantities – $Q = E^{\Delta C_q}$, where E represents the average efficiency for each gene, ΔC_q is the difference between the lowest quantification cycle (C_q-value) of a sample of a particular gene and the C_q-value of each sample in a dataset [41].

In geNorm, the expression stability value (M) was calculated based on the average of the pairwise variation (V) for a candidate RG with all other genes tested, the default limit $M \leq 1.5$. Genes with the lowest M -value have the most stable expression [21]. The average M of all genes together is then calculated by stepwise exclusion of the least stable gene until the two most stable genes in the remaining set cannot be ranked any further. Besides, geNorm also allows estimating the optimal number of RGs that must be used for normalization process. Normalization factor (NF) is calculated based on the geometric mean of the expression of the two most stable RGs and then the NF_{n+1} with the next most stable gene. To determine the number of genes to be used for accurate normalization, the pairwise variation ($V_{n/n+1}$) was determined out of two sequential NFs (NF_n and NF_{n+1}) [21]. Vandesompele et al. proposed $V \leq 0.15$ as a cut-off, below which the inclusion of an additional RG is not required [21].

NormFinder calculates the stability value using mathematical modeling algorithm to consider the intra- and inter-group variation of the candidate RGs. The lower stability value represents the highest stability. The fundamental principle is that a stable RG should have minimal variation across experimental groups and subgroups [22].

In BestKeeper, the raw Cq-values were used to calculate the Pearson correlation coefficient (r), which was obtained by the pairwise comparison between the BestKeeper index generated by the algorithm and the candidate RGs. Pearson correlation was determined as an indicator of expression stability, in which genes with higher r -value and P-value < 0.05 were more stable [23]. Samples with SD-value (standard deviation) > 1 were excluded from analysis [23]. Data from geNorm (M -values), NormFinder (stability values) and BestKeeper (r -value and SD) were used to generate rankings.

The expression stability of the candidate RGs was evaluated in all time combinations together: 30 min, 2 h, 8 h and 45 days, for Leaf₁₀₀; 30 min, 2 h, 8 h and 1 day, for Root₅₀ and Root₂₀₀. Additionally, we also analyzed expression stability in a factorial time combination for each experiment, totaling 15 time combinations per experiment.

2.8 EVALUATION OF TARGET GENES EXPRESSION BY qPCR

The expression pattern of three TGs (Table 1) was performed on Leaf₁₀₀ (2 h, 8 h and 45 days) and Root₂₀₀ (2 h, 8 h and 1 day) using the most stable candidate RGs suggested by the software applied. The Rest2009 software package (REST Standard mode) was used to calculate and analyze the relative expression of the TGs. Relative expression was calculated using the

formula: $E^{(\Delta Cq \text{ Target})} / E^{(\Delta Cq \text{ RG})}$, where E represents the average efficiency for each gene, ΔCq is the difference between mean Cq-value of a control sample and the mean Cq-value of treated sample. The REST bases its performance on pairwise comparisons (between RGs and TGs, control and treatment samples) using randomization and bootstrapping techniques (Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test[®] [42]). Hypothesis testing ($P < 0.05$) was used to determine whether the difference in expression between the control and treatment conditions was significant.

3 RESULTS

3.1 REFERENCE GENES (RGs) AND TARGET GENES (TGs) qPCR AMPLIFICATION

Ten candidates RGs were selected across *C. procera* RNA-Seq data, evaluated by qPCR and used to study the transcriptional modulation of three TGs. Products of these genes were associated with known functions involved in basal or vital cellular processes (Table 2). The specificity of PCR products was confirmed by the presence of a single amplicon with the expected size, with no amplicon visualized in non-template controls, as confirmed by 2 % agarose gel electrophoresis (S2 Fig). The specificity of qPCR products was also confirmed by melting curves, each showing a single peak (S3 Fig.).

All RGs and TGs showed suitable amplification *E*-values, ranging from 93 % (*ND1* and *NAC78*) to 109% (*CYP23*) (Table 2). The C_q-values provided by qPCR assay allowed us an overview of the gene expression levels (i.e., lower C_q-values correspond to higher expression levels and *vice-versa*). As shown in Fig. 1, the mean C_q-values of ten RGs varied from 18.1 (*UBQ11* in Leaf₁₀₀ samples) to 25.8 (*FBOX*, in Root₅₀ samples) in all experiments. For Leaf₁₀₀, the mean C_q-values ranged from 18.1 - 24.6 (*UBQ11* < *UBP25* < *ACT104* < *PPR* < *ACT* < *TBB4* < *CYP23* < *MAPK2* < *r40S* < *FBOX*, lower to higher C_q) (Fig. 1A). The C_q-values of root samples was very similar in both experiments, with variation from ranging from 19.6 - 25.8 in Root₅₀ (*ACT104* < *TBB4* < *UBQ11* < *MAPK2* < *UBP25* < *PPR* < *CYP23* < *ACT* < *r40S* < *FBOX*) (Fig. 1B) and from 19.9 - 25.7 in Root₂₀₀ (*ACT104* < *UBQ11* < *MAPK2* < *TBB4* < *UBP25* < *PPR* < *CYP23* < *ACT* < *FBOX* < *r40S*) (Fig. 1C).

Fig. 1 Quantification cycle (C_q-value) of 10 candidate reference genes in leaf and root samples of *Calotropis procera* under different salt stress (A) Leaf₁₀₀ (100 mM NaCl), (B) Root₅₀ (50 mM NaCl) and (C) Root₂₀₀ (200 mM NaCl). The Boxplot indicates the interquartile range. The horizontal dashed line represents the mean and the solid line the median. The upper and lower dashes represent the maximum and minimum values. Dots indicate the lowest and highest C_q value.

3.2 GLOBAL ANALYSIS OF EXPRESSION STABILITY

Considering all collection times together (global analysis) (30 min, 2 h, 8 h and 45 days for Leaf₁₀₀; 30 min, 2 h, 8 h and 1 day for Root₅₀ and Root₂₀₀), the expression stability of each RG was analyzed to rank the most stable RGs for each experimental condition, using geNorm, NormFinder and BestKeeper algorithms (Table 3 and S2 Table).

Table 3. Ranking of the four most stable reference genes, according to geNorm, NormFinder and BestKeeper softwares, considering global in time combination of leaf and root samples of *Calotropis procera* under different salt stress: Leaf₁₀₀ (100mM NaCl), Root₅₀ (50mM NaCl) and Root₂₀₀ (200mM NaCl).

	Assay	RANK				V-value	
		1 st	2 nd	3 rd	4 th	2/3	3/4
geNorm	Leaf₁₀₀	<i>CYP23</i>	<i>ACT</i>	<i>PPR</i>	<i>r40S</i>	0.14	0.16
	Root₅₀	<i>CYP23</i>	<i>UBP25</i>	<i>ACT104</i>	<i>ACT</i>	0.23	0.14
	Root₂₀₀	<i>CYP23</i>	<i>UBP25</i>	<i>ACT104</i>	<i>ACT</i>	0.20	0.14
NormFinder	Leaf₁₀₀	<i>ACT</i>	<i>TBB4</i>	<i>PPR</i>	<i>r40S</i>		
	Root₅₀	<i>CYP23</i>	<i>UBP25</i>	<i>ACT104</i>	<i>UBQ11</i>		
	Root₂₀₀	<i>UBP25</i>	<i>CYP23</i>	<i>ACT104</i>	<i>r40S</i>		
BestKeeper	Leaf₁₀₀	<i>TBB4*</i>	<i>ACT104*</i>	<i>r40S*</i>	<i>ACT*</i>		
	Root₅₀	<i>ACT104*</i>	<i>CYP23*</i>	<i>UBP25*</i>	<i>ACT*</i>		
	Root₂₀₀	<i>ACT104*</i>	<i>ACT*</i>	<i>UBP25*</i>	<i>CYP23*</i>		

Leaf₁₀₀: leaf samples collected at 30 min, 2 h, 8 h and 45 days after 100 mM NaCl; Root₅₀ and Root₂₀₀: root samples collected at 30 min, 2 h, 8 h and 1 day after 50 and 200 mM NaCl, respectively. V-value, pairwise variation value. SD >1, genes excluded from the rank of BestKeeper; values followed by * variables do not depend linearly on each other are according to Pearson's correlation test ($p < 0.05$).

The geNorm algorithm showed M -value < 1.5 for all candidate RGs in all treatments (S2 Table). The four most stable RGs for NaCl-stressed leaves (Leaf₁₀₀) were *CYP23*, *ACT*, *PPR*, and *r40S*, while *CYP23*, *UBP25*, *ACT104*, and *ACT* were most stable for NaCl-stressed roots (both Root₅₀ and Root₂₀₀) (Table 3). On the other hand, the less stable RGs were *UBP25* and *UBQ11* for Leaf₁₀₀; *FBOX* and *TBB4* for Root₅₀; *FBOX* and *TBB4* for Root₂₀₀ were the less stable RGs (S2 Table).

According to the NormFinder algorithm, the four most stable RGs were *ACT*, *TBB4*, *PPR* and *r40S* in Leaf₁₀₀; *CYP23*, *UBP25*, *ACT104* and *UBQ11* in Root₅₀ and *UBP25*, *CYP23*, *ACT104* and *r40S* in Root₂₀₀ (Table 3). The less stable RGs in Leaf₁₀₀ were *UBQ11* and *UBP25*; for Root₅₀ were *FBOX* and *TBB4*, and for Root₂₀₀ were *FBOX* and *TBB4* (S2 Table).

For BestKeeper algorithm, the four most stable RGs were *TBB4*, *ACT104*, *r40S* and *ACT* in Leaf₁₀₀; *ACT104*, *CYP23*, *UBP25* and *ACT* in Root₅₀ and *ACT104*, *ACT*, *UBP25* and *CYP23* in Root₂₀₀ (Table 3). The less stable RGs were *FBOX* and *UBP25* for Leaf₁₀₀; *FBOX* and *r40S* for Root₅₀; *FBOX* and *TBB4* for Root₂₀₀ (S2 Table).

Although each software has its own statistical method to provide a stability rank, there is a certain degree of congruence among their results. In the current study, the congruence among geNorm, NormFinder, and BestKeeper is presented, concerning the four top-ranked RGs using all collect times together (global analysis) (Fig. 2). For Leaf₁₀₀ samples, we observed 75 %, 75 % and 50 % congruence between geNorm vs. NormFinder, NormFinder vs. BestKeeper and geNorm vs. BestKeeper, respectively (Fig. 2A). In turn, we had congruence for root samples (Root₅₀ and Root₂₀₀) between geNorm vs. NormFinder, NormFinder vs. BestKeeper and geNorm vs. BestKeeper, corresponding to 75 %, 75 %, and 100 %, respectively (Fig. 2B-C).

Fig. 2 Comparison among geNorm, NormFinder and BestKeeper concerning to four top-ranked shared reference genes using all sampling times together (global analysis) of leaf and root samples of *Calotropis procera* under different salt stress: A) Leaf₁₀₀ (100mM NaCl); B) Root₅₀ (50mM NaCl); and C) Root₂₀₀ (200mM NaCl).

The RGs choice to use in qPCR analysis was determined according to geNorm, which also provided high congruence between other softwares studied and presented the optimal number of RGs required for reliable normalization according to V -value ≤ 0.15 . In this context, for Leaf₁₀₀ (30min, 2 h, 8 h, and 45 d), geNorm determined two RGs (*CYP23* and *ACT*) as the best pair (Table 3). On the other hand, geNorm determined three RGs (*CYP23*, *UBP25*, and *ACT104*; see $V_{3/4} \leq 0.15$; Table 3) as most suitable RGs for Root₅₀ and Root₂₀₀ (30 min, 2 h, 8 h, and 1 d).

3.3 ANALYSIS OF THE EXPRESSION STABILITY CONSIDERING FACTORIAL TIME COMBINATION

We also evaluated expression stability of the RGs per factorial combination from all collection times for each experiment, totaling 15-time combinations (S2 Table). Comparing all 15-time combinations in each algorithm revealed that the four most stable RGs are not strictly preserved for Leaf₁₀₀, Root₅₀, and Root₂₀₀ (Fig. 3 and S2 Table). In this context, we averaged the congruence of all different collection times compared to global collection time (30 min, 2 h, 8 h and 45 days for Leaf₁₀₀; 30 min, 2 h, 8 h and 1 day for Root₅₀ and Root₂₀₀). For Leaf₁₀₀ samples, we observed on average 84 %, 70 % and 54 % of congruence concerning global time combinations for geNorm, NormFinder and BestKeeper, respectively (Fig. 3A-C and S2 Table). On the other hand, concerning to global time combinations for Root₅₀, average congruence for geNorm, NormFinder and BestKeeper was 71 %, 77 %, and 77 %, respectively (Fig. 3D-F and S2 Table). Moreover, we observed average congruence of 73 %, 73 %, and 79% for geNorm, NormFinder, and BestKeeper, respectively, concerning to global time combinations for Root₂₀₀ (Fig. 3G-I and S2 Table).

Fig. 3. Comparison among 14 time combinations (2-15 for leaf samples and 2'-15' for root samples) concerning the global time combination (1) of four top-ranked reference genes in geNorm (A, D, G), NormFinder (B, E, H) and BestKeeper (C, F, I) of leaf and root samples of *Calotropis procera* under different salt stress: Leaf₁₀₀ (100 mM NaCl), Root₅₀ (50 mM NaCl) and Root₂₀₀ (200 mM NaCl). Numbers represent time combinations: Leaf₁₀₀: 1 (30min-2h-8h-45d), 2 (30min-2h-8h), 3 (30min-2h-45d), 4 (30min-8h-45d), 5 (2h-8h-45d), 6 (30min-2h), 7 (30min-8h), 8 (30min-45d), 9 (2h-8h), 10 (2h-45d), 11 (8h-45d), 12 (30min), 13 (2h), 14 (8h), 15 (45d). Root₅₀ and Root₂₀₀: 1' (30min-2h-8h-1d), 2' (30min-2h-8h), 3' (30min-2h-1d), 4' (30min-8h-1d), 5' (2h-8h-1d), 6' (30min-2h), 7' (30min-8h), 8' (30min-1d), 9' (2h-8h), 10' (2h-1d), 11' (8h-1d), 12' (30min), 13' (2h), 14' (8h), 15' (1d).

Isolating the first hours (30 min, 2 h, 8 h) for each experiment and their factorial combinations (totaling seven time combinations), revealed the more frequent RGs among the rank top four out of seven time combinations (Fig. 4 and S2 Table). For Leaf₁₀₀, the more frequent RG was *PPR*, according to geNorm and NormFinder. *PPR*, *TBB4* and *MAPK2*, according to BestKeeper (Fig. 4A and S2 Table). For Root₅₀, the more frequent RGs was *CYP23*, according to geNorm; *UBP25*, according to NormFinder; *CYP23*, *UBP25* and *ACT104*, according to BestKeeper (Fig. 4B and S2 Table). For Root₂₀₀, the more frequent RGs were *CYP23*, *UBP25* and *PPR* according to geNorm; *ACT104* according to NormFinder; *ACT104* and *UBP25* according to BestKeeper (Fig. 4C and S2 Table).

Fig. 4. Frequency of the four top-ranked reference genes (RGs) among seven time combinations concerning the first hours (30 min, 2 h, 8 h) of salt stress in geNorm, NormFinder and BestKeeper. Tissues regard *Calotropis procera* leaf and root samples under different salt stress time points: A) Leaf₁₀₀ (100 mM NaCl), B) Root₅₀ (50 mM NaCl) and C) Root₂₀₀ (200 mM NaCl).

3.4 TARGET GENES EXPRESSION IN DIFFERENT EXPERIMENTAL CONDITIONS BY qPCR

The transcriptional patterns of three TGs (*ND1*, *CNBL4*, and *NAC78*) under Leaf₁₀₀ (2 h, 8 h, and 45 days) and Root₂₀₀ (2 h, 8 h and 1 day) were analyzed using the most suitable reference genes for Leaf₁₀₀ (*CYP23* and *ACT*) and Root₂₀₀ (*CYP23*, *UBP25* and *ACT104*) as recommended by geNorm (S2 Table).

In short-term salt stress (2 h), gene expression analysis via qPCR revealed that most target genes exhibited constitutive expression in both salt-stressed tissues (Leaf₁₀₀ and Root₂₀₀) (Fig. 5). The only exception was *NAC78*, which was up-regulated in Leaf₁₀₀ (Fig. 5C). Interestingly, the gene expression modulation occurred, preferentially, at 8 h of salt-stress, with up-regulation in Leaf₁₀₀ (Fig. 5A-C) and down-regulation in Root₂₀₀ (Fig. 5D-F) of all TGs tested. On the other hand, in the last treatment times after salt stress (i.e., 45 days and 1 day, in Leaf₁₀₀ and Root₂₀₀, respectively) we observed constitutive expression for three target genes. The exception occurred for *ND1* at 1 day (in Root₂₀₀), in which the expression was down-regulated (Fig. 5D).

Fig. 5. Relative expression of the target genes *ND1*, *CNBL4* and *NAC78* in *Calotropis procera* Leaf₂₀₀ (A, B, C) and Root₂₀₀ experiments (D, E, F). The references genes used were *CYP23* and *ACT* (in Leaf₁₀₀) *CYP23*, *UBP25* and *ACT104* (in Root₂₀₀). Leaf₁₀₀ and Root₂₀₀: salt stress by concentrations of NaCl 100 and 200 mM, respectively. Values followed by * means $P < 0.05$. Up-regulation of gene expression (up); down-regulation of gene expression (down); ns (not significant at $p < 0.05$, or constitutive expression); relative expression values below or above the red line, associated with ‘*’, indicate up- and down-regulation, respectively.

Additionally, we compared the qPCR/ Leaf₁₀₀ relative expression and Leaf₁₀₀ RNA-Seq data. Our results revealed that *CNBL4*, *NAC78* qPCR results in Leaf₁₀₀ 2 h, 8 h, and 45 d (Fig. 5B-C) were according to the respective RNA-Seq data (Table 1). For *ND1*, the qPCR (Fig. 5A) and RNA-Seq (Table 1) gene expression results converged in the 2 h and 45 days treatments.

4 DISCUSSION

The advent of high-throughput next-generation DNA sequencing (NGS) platforms has provided more comprehensive and maximized studies on diverse genomes, including non-model plant species [7,43,44]. At the same time, advances in RNA sequencing (RNA-Seq) methods have effectively aided in characterization and quantification of transcriptomes (even without a reference genome). They contributed to the understanding of genes expression regulation under different experimental conditions [6,45,46]. However, due to the existence of potential errors during the preparation, synthesis, sequencing and analysis of gene expression libraries (including RNA-Seq), a second method is required to validate the results indicated by the first. qPCR is currently the most appropriated method for such purpose [12,47], and quality control measures are necessary to mitigate potential errors in qPCR results. Thus, the selection of suitable reference genes is a fundamental requisite. The use of inappropriate RGs, for example, may overestimate or underestimate the relative expression of the target genes and lead to incorrect interpretations [18].

In this study, transcripts of *C. procera* (RNA-Seq), identified statistically as constitutively expressed (considering $\log_2FC$ and P-value), were used as a source for candidate reference genes screening. The expression levels and stability analysis of ten RGs were evaluated in leaf and root samples of *C. procera* under different salt concentrations (NaCl). Using geNorm, NormFinder and BestKeeper software allowed us to analyze the expression stability of RGs in salt concentrations individually and factorial of time combinations.

According to the Cq-value and stability expression analysis, discrepancies were observed among candidate RGs under all conditions studied (including different tissues, salt concentrations and collection time combinations), indicating the importance of studies on RGs stability under different experimental conditions. Although several works have reported the use of traditional RGs as suitable in qPCR assays [48–50], recent studies have shown expression stability for many of these genes may be affected in different plant species under experimental conditions [16,20]. These reports, consistent with our results, support the careful evaluation of candidate RGs under given experimental conditions [16,51].

The RGs stability rankings suggested by different programs were not often entirely identical for the same experimental conditions, as distinct statistical algorithms and analytical procedures are applied [52]. Despite the high degree of similarities, we found the less congruence between results of geNorm vs. BestKeeper, for Leaf₁₀₀ (30 min, 2 h, 8 h, and 45

days) (Fig. 2A). Such relative divergence between BestKeeper and other softwares was also reported by other authors. According to Zhang et al.[33], in an experiment conducted on *Halostachys caspica* under salt stress, a congruence of 25% between BestKeeper vs. geNorm was observed and 100% between geNorm vs. NormFinder. Similarly, de Andrade et al. [53] found a high correlation among geNorm vs. NormFinder. However, geNorm vs. BestKeeper showed the lowest correlation. In this context, the choice of RGs to use in the qPCR analysis was determined by geNorm and confirmed by the others softwares. geNorm is one of the most widely used for gene expression stability analysis because, additionally, it informs the optimal number of RGs necessary to validate the TGs [16,17].

In spite of RGs specificity for each time combination, we found *CYP23*, a *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* involved in key processes of protein folding [54], as the most frequent among the four most stable RGs, considering all experimental conditions studied. Similarly, Singh et al. [32] found *CYP* as the most stable RGs for wounding, heat, methyl jasmonate and biotic stress, for different tissues and combined stress samples. Based on this scenario, *CYP23* is a powerful RG candidate to be further tested on expression analysis of *C. procera* under different experimental conditions, especially under salinity.

Analyzing all time combinations on Leaf₁₀₀ experiment, we found *ACT*, a cytoskeletal protein associated with plant cell growth [55], as the most frequent RG among the four most stable RGs. Previously, actins were identified as stable RGs in salt, drought, cold and heat stress [31,52]. Furthermore, *UBP25* was most frequent RG among the four most stable for Root₅₀ and Root₂₀₀ experiments. On the other hand, *UBP25* was the less stable for Leaf₁₀₀ submitted to an extended period of salinity (45 days). Interestingly, all time combinations containing time 45 days for Leaf₁₀₀ showed *UBP25* as one of the less stable RGs, considering all softwares studied. However, *UBP25* was among four most stable RGs for most of the first hours combinations (excluding 45 days) on Leaf₁₀₀. *UBP25* participates in ubiquitin-proteasome system (UPS) for maintenance of homeostasis and modulation of the stability proteins under salinity and others abiotic stress [56,57], inducing the less stability under the high salt stress (45 days, Leaf₁₀₀) in relation to the other candidates RGs.

The following target genes, related to salt-stress response, had their expression analyzed by RNA-Seq and qPCR : *ND1* (*NADH dehydrogenase subunit 1*), which acts on the mitochondrial electron transport chain and is involved with rapid systemic signaling triggered by salinity and other abiotic stresses [34]; *CNBL4* (*Calcineurin B-like protein*) involved on SOS pathway as calcium sensors, working in combination with kinases and ion channels to exclude

cytosolic salt [35,36]; and *NAC78* (*NAC domain-containing protein 78-like*) that belongs to *NAC* transcription factor family (*NAC*-TFs) involved in regulating plant growth, development processes and abiotic stress responses, including drought and salinity [37,38]. The qPCR data of *ND1* (exception for 8 h treatment), *CNBL4*, and *NAC78* for Leaf₁₀₀ experiment are in agreement RNA-Seq expression results. The convergence of the results between these two approaches (that is, data validation) increases the robustness of our gene expression data, since the qPCR is considered a gold standard validation method for expression analysis. The up-regulation of the gene expression in response to stress salt as *CNBL4*, *NAC78* and *ND1* in leaf tissue, contribute to the establishment in *Calotropis procera* to high salinity adverse environments.

Regarding the root expression of the targets genes (qPCR / Root₂₀₀ experiment), it was observed that they were not up-regulated in any of the treatments (showing up down-regulation or constitutive expression). Compared to Leaf₁₀₀ experiment results, this suggests that: *CNBL4*, *NAC78* and *ND1* participate, more actively, in the leaf response to salt stress (that is, tissue-specific transcriptional modulation); and /or the transcriptional modulation of the referred targets is dependent on the NaCl concentration. To determine the cause associated with the mentioned results, further inquiries are required. However, this gene sample already suggests the complexity of the molecular physiology of *C. procera* under stress, highlighting the capacity of adaptation of its transcriptome to different conditions and/or to the demand of different organs.

Our study provides, for the first time, powerful background about ten candidate RGs, which can be used in *C. procera* studies under salt stress and can provide great potential to be tested in other experimental conditions. We indicate the most reliable RGs for 15-time combinations under three different experimental conditions, including two plant tissues and three NaCl concentrations. The *CYP23* is a powerful RG candidate for expression normalization of *C. procera* under different experimental conditions. In addition, *UBP25* should be avoided as RG for long-lasting salt stress in *C. procera*'s leaf. Finally, our findings emphasize the need for caution when evaluating the stability RGs in a set of samples under high amplitude of variant factors. The use of more than one software supported a reliable way to select the best RGs to validate TGs on qPCR.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant numbers CNPq-470247/2013-4 and 310871/2014-0]. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. M.R.V.C. thanks the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the scholarship granted. M.G.S. and A.M.B.I. acknowledges to CNPq for fellowships, financial support, and CAPES Program BioComputacional [grant number 88882.160046/2013-01] for financial support.

REFERENCES

1. Hassan LM, Galal TM, Farahat EA, El-Midany MM. The biology of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Trees. 2015;29: 311–320. doi:10.1007/s00468-015-1158-7
2. Froisi G, Oliveira MT, Almeida-Cortez J, Santos MG. Ecophysiological performance of *Calotropis procera*: an exotic and evergreen species in Caatinga, Brazilian semi-arid. Acta Physiol Plant. 2013;35: 335–344. doi:10.1007/s11738-012-1076-x
3. Rivas R, Froisi G, Ramos DG, Pereira S, Benko-Iseppon AM, Santos MG. Photosynthetic limitation and mechanisms of photoprotection under drought and recovery of *Calotropis procera*, an evergreen C₃ from arid regions. Plant Physiol Biochem. 2017;118: 589–599. doi:10.1016/j.plaphy.2017.07.026
4. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet. 2009;10: 57–63. doi:10.1038/nrg2484
5. Haas BJ, Zody MC. Advancing RNA-Seq analysis. Nature Biotechnol. 2010;28: 421–423. doi:10.1038/nbt0510-421
6. Jain M. Next-generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. Brief Funct Genomics. 2012;11: 63–70. doi:10.1093/bfpg/eln038
7. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nature Rev Genet. 2016;17: 333–351. doi:10.1038/nrg.2016.49
8. Pandey A, Swarnkar V, Pandey T, Srivastava P, Kanojiya S, Mishra DK, et al. Transcriptome and metabolite analysis reveal candidate genes of the cardiac glycoside biosynthetic pathway from *Calotropis procera*. Sci Rep. 2016;6: 34464. doi:10.1038/srep34464
9. Ramadan A, Sabir JSM, Alakilli SYM, Shokry AM, Gadalla NO, Edris S, et al. Metabolomic response of *Calotropis procera* growing in the desert to changes in water availability. PLoS One. 2014;9: e87895. doi:10.1371/journal.pone.0087895
10. Shokry AM, Al-Karim S, Ramadan A, Gadallah N, Al Attas SG, Sabir JSM, et al. Detection of a Usp-like gene in *Calotropis procera* plant from the de novo assembled genome contigs of the high-throughput sequencing dataset. C R Biol. 2014;337: 86–94. doi:10.1016/j.crv.2013.12.008
11. Mutwakil MZ, Hajrah NH, Atef A, Edris S, Sabir MJ, Al-Ghamdi AK, et al. Transcriptomic and metabolic responses of *Calotropis procera* to salt and drought stress. BMC Plant Biol. 2017;17: 231. doi:10.1186/s12870-017-1155-7
12. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques. 2005;39: 75–85.
13. Li X-S, Yang H-L, Zhang D-Y, Zhang Y-M, Wood AJ. Reference gene selection in the desert plant *Eremosparton songoricum*. Int J Mol Sci. 2012;13: 6944–6963. doi:10.3390/ijms13066944
14. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes Immun. 2005;6: 279–284. doi:10.1038/sj.gene.6364190
15. Udvardi MK, Czechowski T, Scheible W-R. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. Plant Cell. 2008;20: 1736–1737. doi:10.1105/tpc.108.061143
16. Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. J Exp Bot. 2009;60: 487–493. doi:10.1093/jxb/ern305
17. Imai T, Ubi BE, Saito T, Moriguchi T. Evaluation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in *Pyrus pyrifolia* using different tissue samples and seasonal conditions. PLoS One. 2014;9: e86492. doi:10.1371/journal.pone.0086492
18. Sinha P, Singh VK, Suryanarayana V, Krishnamurthy L, Saxena RK, Varshney RK. Evaluation and validation of housekeeping genes as reference for gene expression studies in pigeonpea (*Cajanus cajan*) under drought stress conditions. PLoS One. 2015;10: e0122847. doi:10.1371/journal.pone.0122847

19. Kanakachari M, Solanke AU, Prabhakaran N, Ahmad I, Dhandapani G, Jayabalan N, et al. Evaluation of suitable reference genes for normalization of qPCR gene expression studies in brinjal (*Solanum melongena* L.) during fruit developmental stages. *Appl Biochem Biotechnol*. 2016;178: 433–450. doi:10.1007/s12010-015-1884-8
20. Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet*. 2013;54: 391–406. doi:10.1007/s13353-013-0173-x
21. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3: research0034.1–0034.11. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
22. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004;64: 5245–5250. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496
23. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004;26: 509–515. PMID: 15127793
24. Kwon CW, Park K-M, Kang B-C, Kweon D-H, Kim M-D, Shin SW, et al. Cysteine Protease Profiles of the Medicinal Plant *Calotropis procera* R. Br. revealed by de novo transcriptome analysis. *PLoS One*. 2015;10: e0119328. doi:10.1371/journal.pone.0119328
25. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55: 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
26. Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat Biotechnol*. 2011;29: 644–652. doi:10.1038/nbt.1883
27. Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, et al. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc*. 2013;8: 1494–1512. doi:10.1038/nprot.2013.084
28. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011;12: 323. doi:10.1186/1471-2105-12-323
29. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010;26: 139–140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616
30. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods*. 2015;12: 115–121. doi:10.1038/nmeth.3252
31. Zhuang H, Fu Y, He W, Wang L, Wei Y. Selection of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR in *Oxytropis ochrocephala* Bunge using transcriptome datasets under abiotic stress treatments. *Front Plant Sci*. 2015;6: 475. doi:10.3389/fpls.2015.00475
32. Singh V, Kaul SC, Wadhwa R, Pati PK. Evaluation and selection of candidate reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *PLoS One*. 2015;10: e0118860. doi:10.1371/journal.pone.0118860
33. Zhang S, Zeng Y, Yi X, Zhang Y. Selection of suitable reference genes for quantitative RT-PCR normalization in the halophyte *Halostachys caspica* under salt and drought stress. *Sci Rep*. 2016;6: 30363. doi:10.1038/srep30363
34. Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, et al. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal*. 2009;2: ra45–ra45. doi:10.1126/scisignal.2000448
35. Shi J, Kim KN, Ritz O, Albrecht V, Gupta R, Harter K, et al. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 1999;11: 2393–2405. doi:10.1105/tpc.11.12.2393

36. Ji H, Pardo JM, Batelli G, Van Oosten MJ, Bressan RA, Li X. The salt overly sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Mol Plant*. 2013;6: 275–286. doi:10.1093/mp/sst017
37. Puranik S, Sahu PP, Mandal SN, B VS, Parida SK, Prasad M. Comprehensive genome-wide survey, genomic constitution and expression profiling of the NAC transcription factor family in foxtail millet (*Setaria italica* L.). *PLoS One*. 2013;8: e64594. doi:10.1371/journal.pone.0064594
38. Shao H, Wang H, Tang X. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. *Front Plant Sci*. 2015;6: 902. doi:10.3389/fpls.2015.00902
39. Rasmussen R. Quantification on the lightcycler. Rapid cycle real-time PCR. Springer, Berlin, Heidelberg; 2001. pp. 21–34. doi:10.1007/978-3-642-59524-0_3
40. Biassoni R, Raso A, editors. Quantitative Real-Time PCR: methods and protocols. 2014 edition. New York: Humana Press; 2014.
41. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 2007;8: R19. doi:10.1186/gb-2007-8-2-r19
42. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30: e36. doi:10.1093/nar/30.9.e36
43. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010;11: 31–46. doi:10.1038/nrg2626
44. Egan AN, Schlueter J, Spooner DM. Applications of next-generation sequencing in plant biology. *Am J Bot*. 2012;99: 175–185. doi:10.3732/ajb.1200020
45. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. 2009;10: 57–63. doi:10.1038/nrg2484
46. Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet*. 2011;12: 87–98. doi:10.1038/nrg2934
47. Adamski MG, Gumann P, Baird AE. A method for quantitative analysis of standard and high-throughput qPCR expression data based on input sample quantity. *PLoS One*. 2014;9: e103917. doi:10.1371/journal.pone.0103917
48. Chen H, Zhang B, Hicks LM, Xiong L. A Nucleotide Metabolite controls stress-responsive gene expression and plant development. *PLoS One*. 2011;6: e26661. doi:10.1371/journal.pone.0026661
49. Sun Y-G, Wang B, Jin S-H, Qu X-X, Li Y-J, Hou B-K. Ectopic expression of *Arabidopsis* glycosyltransferase ugt85a5 enhances salt stress tolerance in tobacco. *PLoS One*. 2013;8: e59924. doi:10.1371/journal.pone.0059924
50. Ai-hua X, Ke-hui C, Wen-cheng W, Zhen-mei W, Jian-liang H, Li-xiao N, et al. Differential responses of water uptake pathways and expression of two aquaporin genes to water-deficit in rice seedlings of two genotypes. *Rice Science*. 2017;24: 187–197. doi:10.1016/j.rsci.2017.03.001
51. Martins PK, Mafra V, de Souza WR, Ribeiro AP, Vinecky F, Basso MF, et al. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. *Sci Rep*. 2016;6: 28348. doi:10.1038/srep28348
52. Yang Z, Chen Y, Hu B, Tan Z, Huang B. Identification and validation of reference genes for quantification of target gene expression with quantitative real-time PCR for tall fescue under four abiotic stresses. *PLoS One*. 2015;10: e0119569. doi:10.1371/journal.pone.0119569
53. de Andrade LM, Brito MS, Peixoto-Junior RF, Marchiori PER, Nóbile PM, Martins APB, et al. Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. *Plant Methods*. 2017;13: 28. doi:10.1186/s13007-017-0178-2
54. Wang P, Heitman J. The cyclophilins. *Genome Biol*. 2005;6: 226. doi:10.1186/gb-2005-6-7-226

55. Hussey PJ, Ketelaar T, Deeks MJ. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu Rev Plant Biol.* 2006;57: 109–125. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105206
56. Lyzenga WJ, Stone SL. Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. *J Exp Bot.* 2012;63: 599–616. doi:10.1093/jxb/err310
57. Stone SL. The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling. *Front Plant Sci.* 2014;5: 135. doi:10.3389/fpls.2014.00135

SUPPORTING INFORMATION

S1 Table. Experimental conditions/ samples collected for *Calotropis procera* RNA-Seq libraries and qPCR assays.

S2 Table. Expression stability rank and pairwise variation of candidate reference genes in 15 time combinations in leaf and root samples of *Calotropis procera* under different salinity conditions [Leaf₁₀₀ (100 mM NaCl), Root₅₀ (50 mM NaCl), Root₂₀₀ (200 mM NaCl)] after geNorm, NormFinder and BestKeeper analysis. † SD above 1, genes excluded from the rank of BestKeeper. * Values followed by * variables do not depend linearly on each other are according to the Pearson's correlation test ($p < 0.05$).

S1 Fig. Experimental designs for stress application and RNA-Seq libraries sequencing performed in the present work. Legend: RB: biological replicate.

S2 Fig. Amplification products of 10 candidate reference genes and three target genes in agarose gel (2 %) from *Calotropis procera* by PCR. M: marker 100 bp; 1-2 *ND1*; 3-4 *CNBL4*; 5-6 *NAC78*; 7-8 *MAPK2*; 9-10 *CYP23*; 11-12 *ACT104*; 13-14 *TBB4*; 15-16 *UBQ11*; 17-18 *ACT*; 19-20 *r40S*; 21-22 *PPR*; 23-24 *UBP25*; 25-26 *FBOX*. Even numbers mean no template control.

S3 Fig. Melting temperature (°C) of 10 candidate reference genes and three target genes from *Calotropis procera* by qPCR. Each line represents the melting curve for each individual replicate.

FIGURES

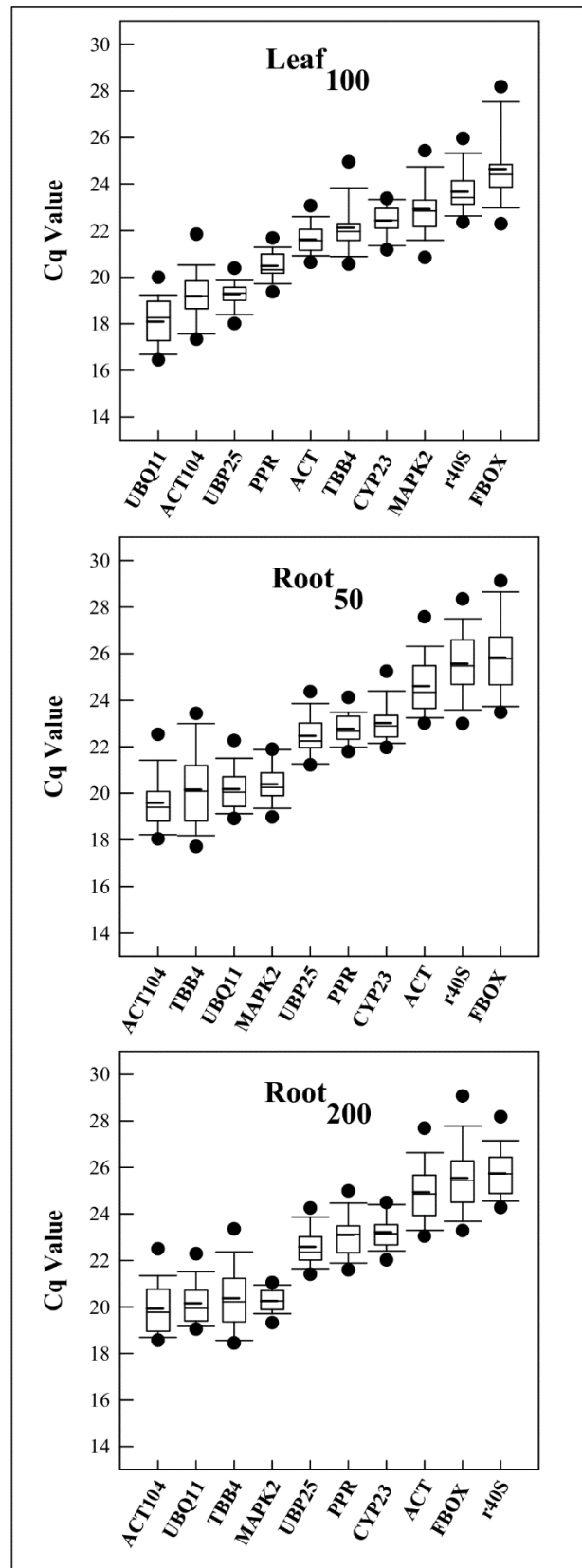
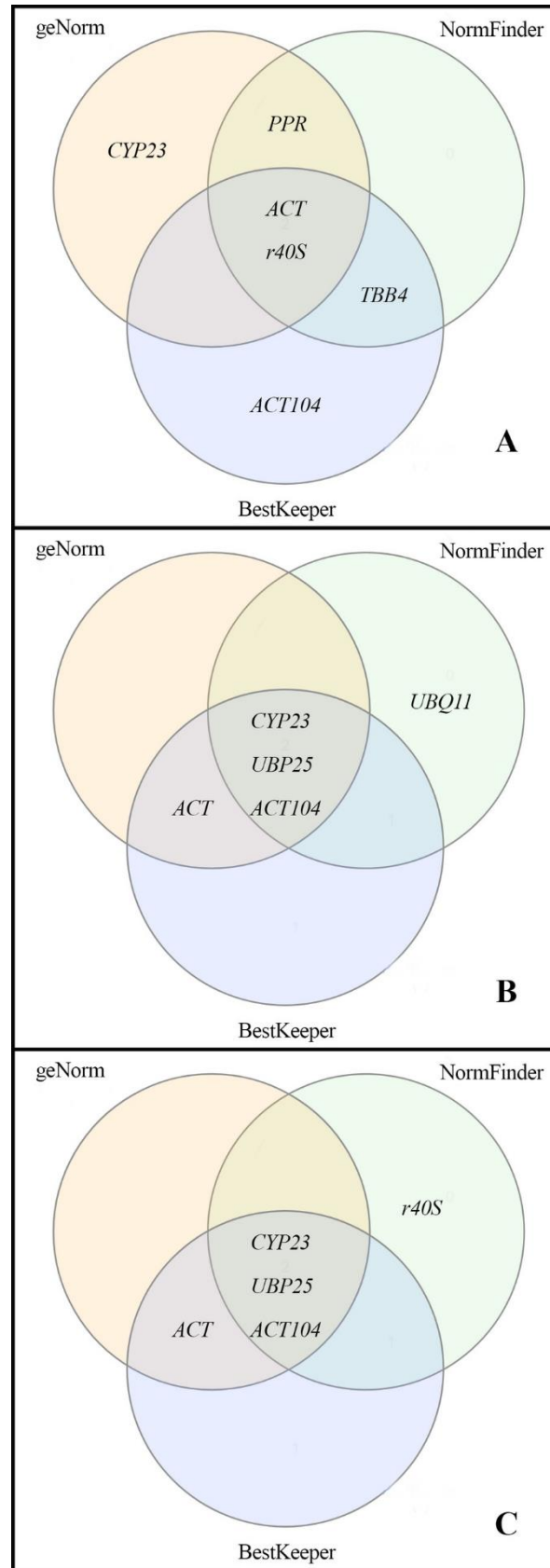


Fig. 1

**Fig. 2**

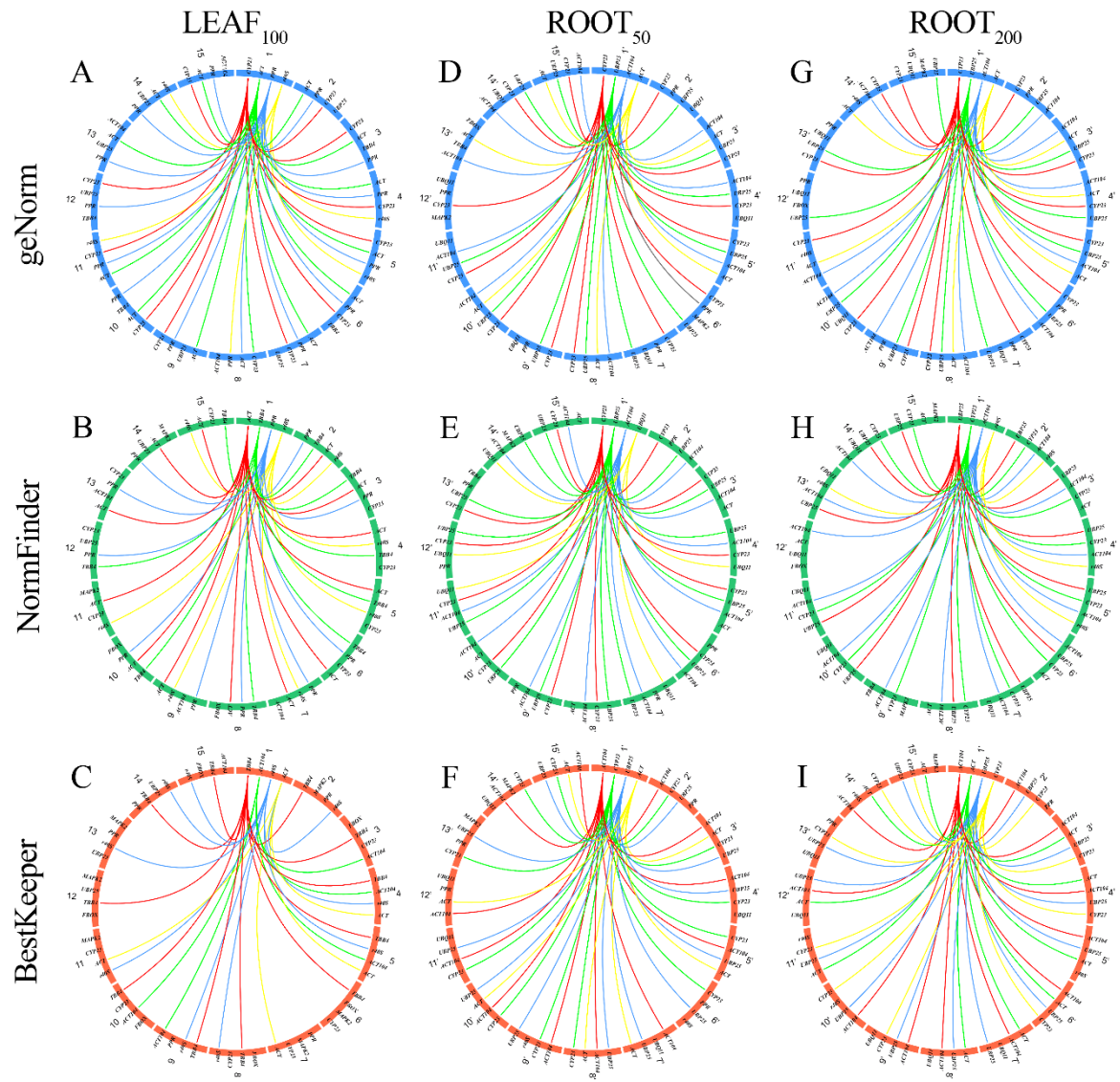


Fig. 3

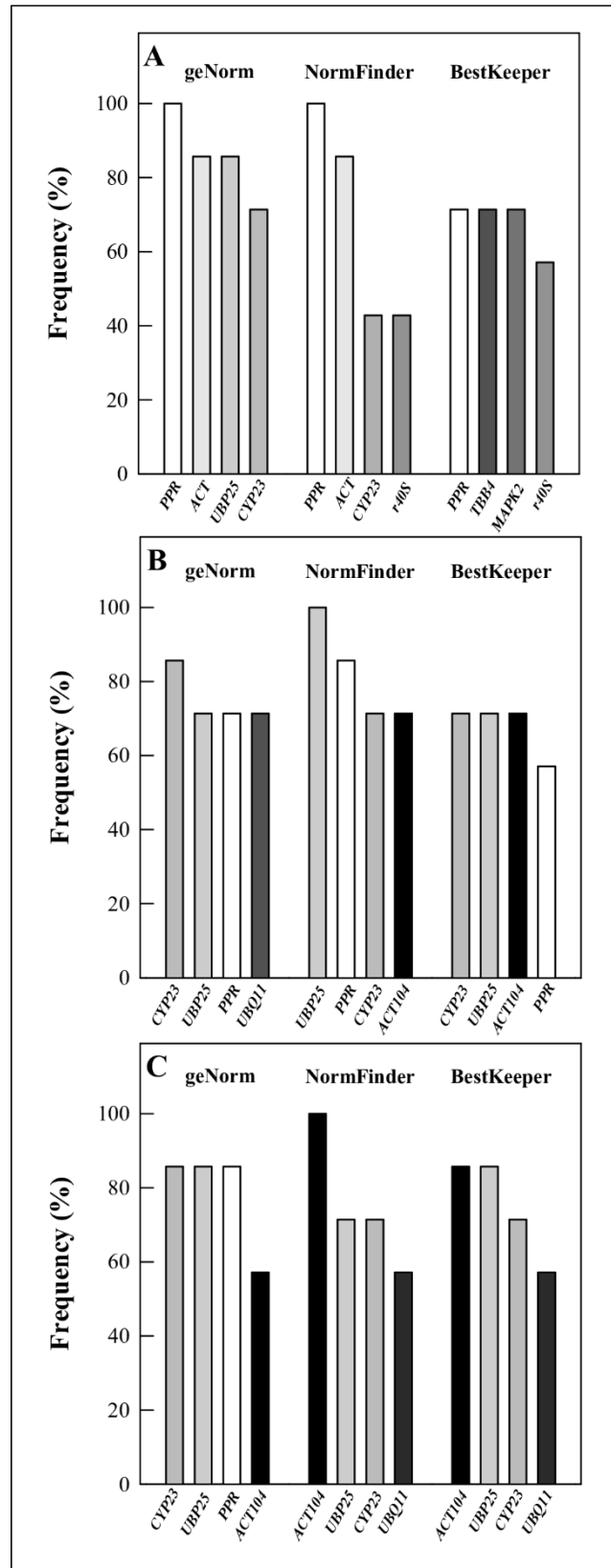


Fig. 4

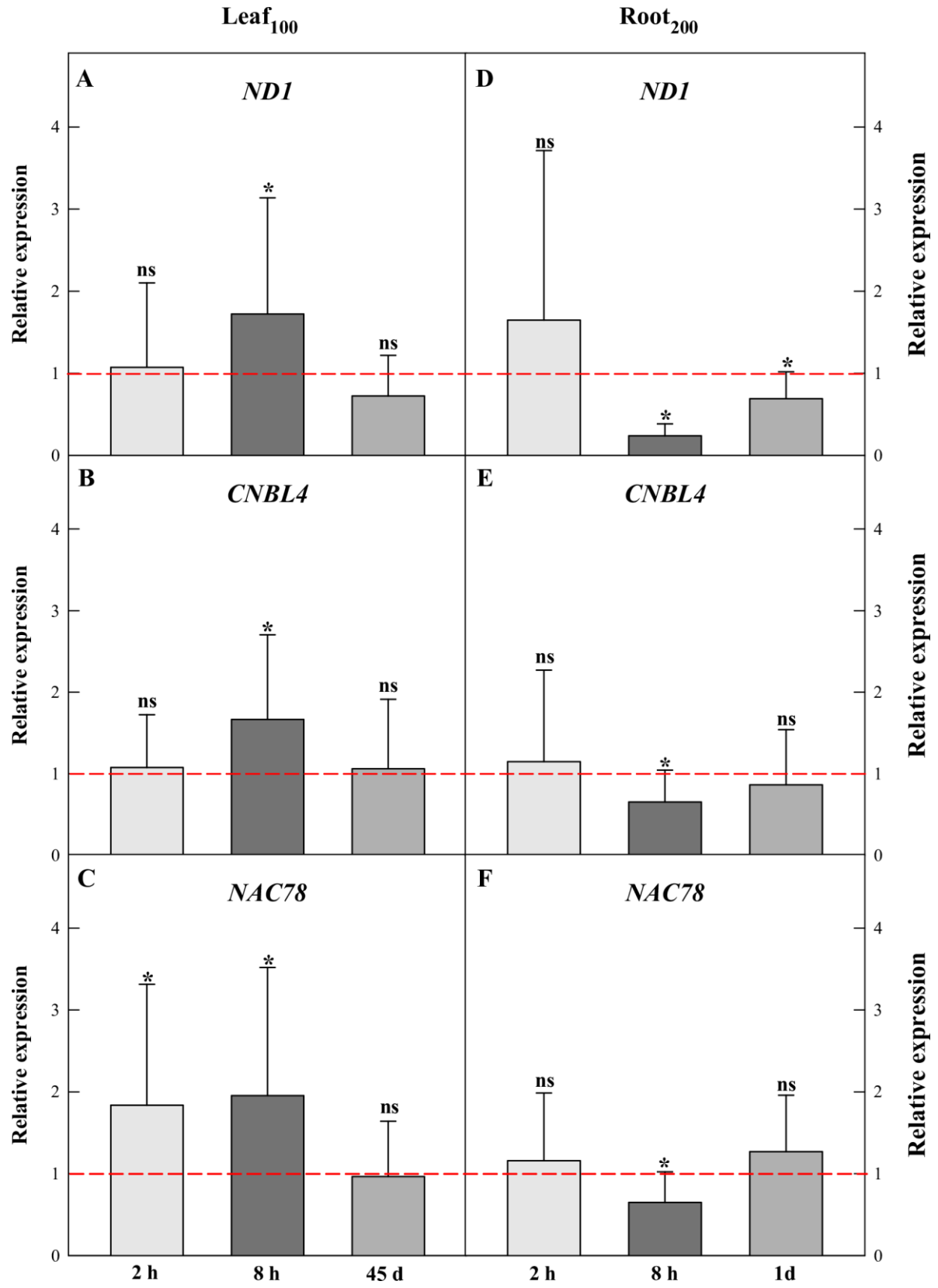
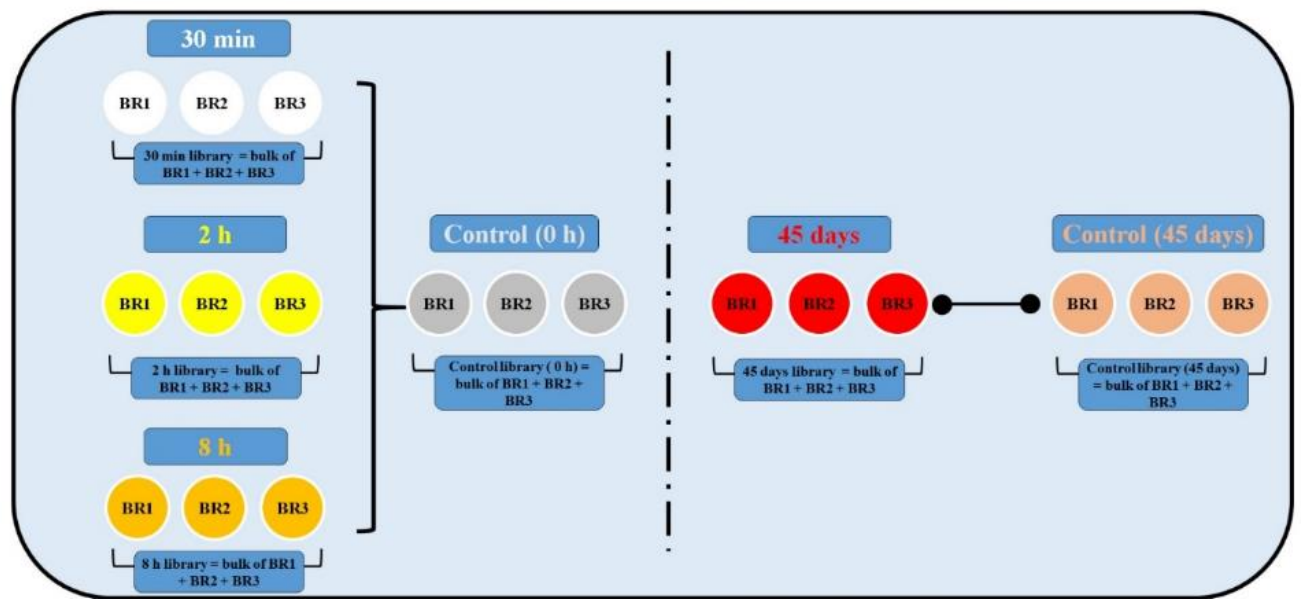
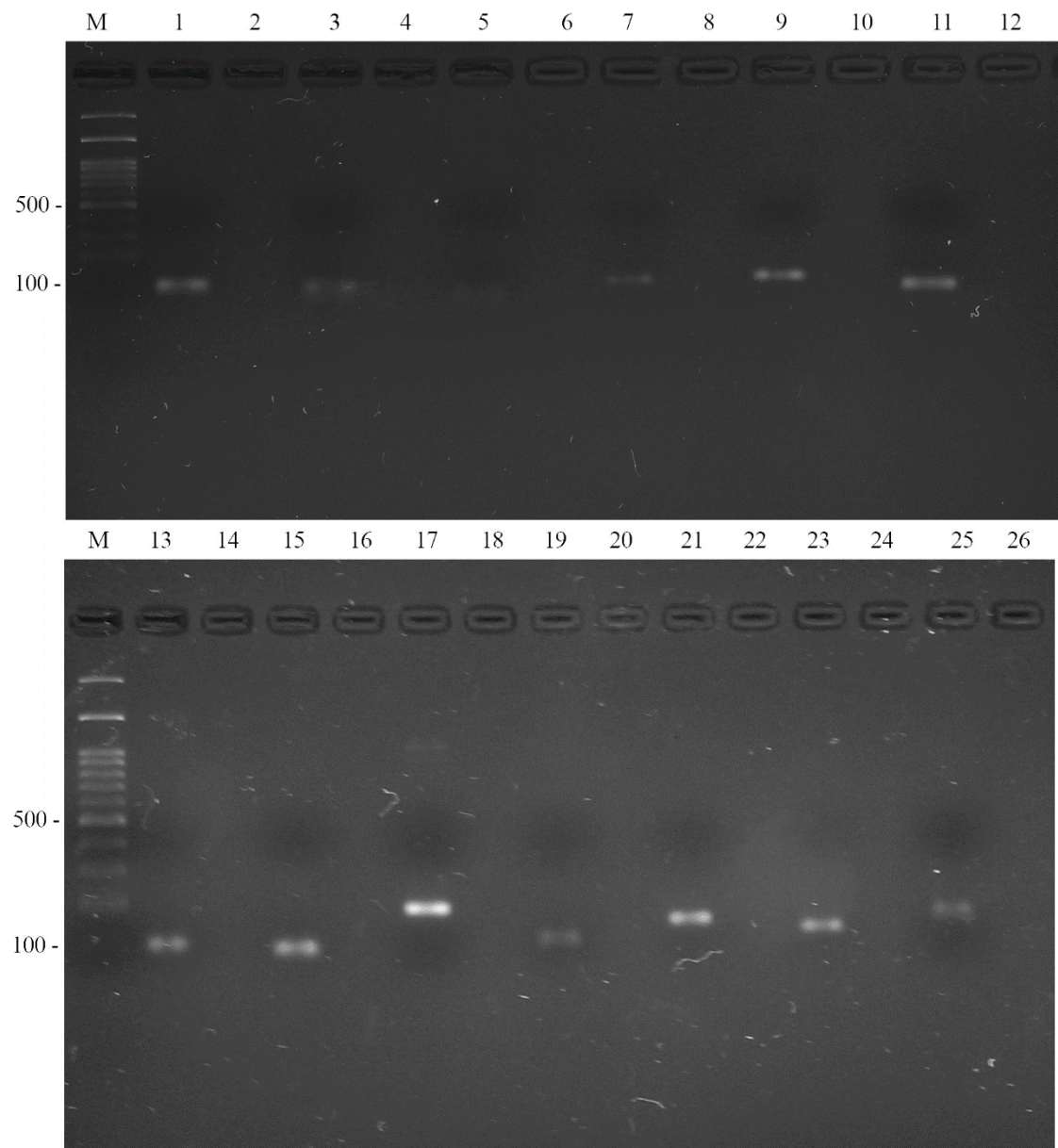


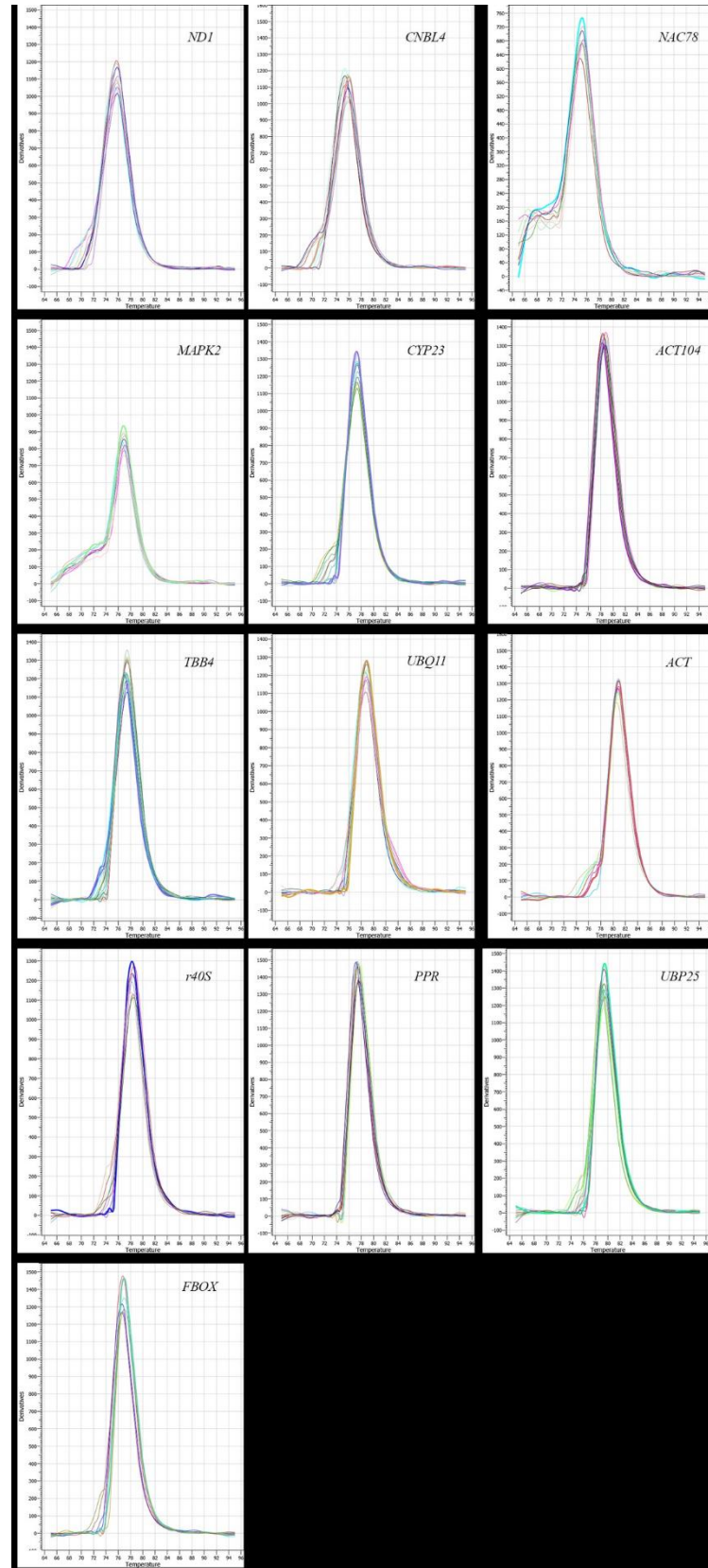
Fig. 5



S1 Fig.



S2 Fig.



S3 Fig.

TABLE**Table S1**

Experiment	Salt stress	Tissue	Time point collected	RNA-Seq	qPCR
Leaf₁₀₀	100 mM NaCl	leaf*	30 min, 2 h, 8 h and 45 days (treatments)	yes	yes
		leaf	30 min, 2 h, 8 h (controls)	no	yes
		leaf*	0 h (control)	yes	no
		leaf*	45 days (control)	yes	yes
Root₅₀	50 mM NaCl	root	30 min, 2 h, 8 h and 1 day (controls x treatments)	no	yes
Root₂₀₀	200 mM NaCl	root	30 min, 2 h, 8 h and 1 day (controls x treatments)	no	yes

Table S2

		geNorm										NormFinder										BestKeeper																					
		v																																									
Assay	Time combination	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10												
Leaf	30min-2h-8h-45d	CYP23	ACT	PPR	r405	TBB4	ACT104	MAPK2	FBOX	UBQ11	UBP25	0.14	0.16	0.368	0.368	0.418	0.547	0.601	0.644	0.687	0.769	0.871	1.012	0.303	0.304	0.314	0.343	0.355	0.428	0.449	0.540	0.592	0.623	0.942	0.867	0.863	0.822	0.812	0.804	0.790	0.465	0.434	0.922
	30min-2h-8h	ACT	PPR	CYP23	UBP25	r405	ACT104	TBB4	MAPK2	FBOX	UBQ11	0.11	0.09	0.286	0.286	0.337	0.371	0.495	0.560	0.591	0.629	0.717	0.792	0.244	0.306	0.310	0.312	0.343	0.373	0.401	0.422	0.612	0.615	0.973	0.944	0.944	0.940	0.922	0.876	0.869	0.761	0.448	0.928
	30min-2h-45d	CYP23	ACT	TBB4	PPR	r405	FBOX	ACT104	MAPK2	UBQ11	UBP25	0.14	0.11	0.284	0.284	0.337	0.371	0.495	0.560	0.591	0.629	0.717	0.792	0.198	0.248	0.260	0.291	0.291	0.341	0.416	0.428	0.520	0.578	0.850	0.779	0.713	0.709	0.625	0.536	0.492	0.474	0.457	0.390
	30min-8h-45d	ACT	PPR	CYP23	r405	TBB4	ACT104	MAPK2	FBOX	UBQ11	UBP25	0.13	0.17	0.396	0.396	0.431	0.567	0.642	0.677	0.725	0.823	0.928	1.099	0.319	0.357	0.358	0.366	0.374	0.419	0.491	0.639	0.653	0.721	0.942	0.892	0.887	0.841	0.832	0.831	0.802	0.532	0.426	0.938
	2h-8h-45d	CYP23	ACT	PPR	r405	TBB4	MAPK2	ACT104	FBOX	UBQ11	UBP25	0.15	0.16	0.336	0.336	0.432	0.551	0.613	0.655	0.697	0.814	0.906	1.070	0.311	0.333	0.337	0.349	0.350	0.403	0.439	0.592	0.600	0.648	0.931	0.864	0.856	0.832	0.790	0.773	0.737	0.488	0.450	0.907
	30min-2h	ACT	PPR	CYP23	TBB4	r405	FBOX	MAPK2	FBOX	ACT104	UBQ11	0.10	0.07	0.154	0.168	0.183	0.190	0.201	0.270	0.272	0.285	0.367	0.562	0.154	0.168	0.183	0.190	0.201	0.270	0.272	0.285	0.367	0.562	0.942	0.924	0.903	0.874	0.874	0.839	0.829	0.799	0.779	0.239
	30min-8h	ACT	PPR	CYP23	UBP25	r405	ACT104	TBB4	MAPK2	UBQ11	FBOX	0.13	0.11	0.291	0.291	0.361	0.417	0.558	0.636	0.668	0.712	0.788	0.870	0.294	0.328	0.344	0.362	0.379	0.399	0.492	0.510	0.626	0.748	0.963	0.955	0.907	0.904	0.792	0.548	0.978	0.952	0.951	0.949
	30min-45d	CYP23	ACT	PPR	ACT104	TBB4	r405	FBOX	MAPK2	UBQ11	UBP25	0.14	0.11	0.286	0.286	0.300	0.347	0.410	0.493	0.537	0.581	0.653	0.758	0.284	0.328	0.344	0.362	0.379	0.399	0.492	0.510	0.626	0.748	0.963	0.955	0.907	0.904	0.792	0.548	0.978	0.952	0.951	0.949
	2h-8h	ACT	UBP25	PPR	CYP23	ACT104	r405	TBB4	MAPK2	UBQ11	FBOX	0.09	0.09	0.203	0.259	0.287	0.292	0.316	0.356	0.360	0.464	0.549	0.691	0.203	0.259	0.287	0.292	0.316	0.356	0.360	0.464	0.549	0.691	0.842	0.673	0.557	0.534	0.508	0.446	0.438	0.400	0.330	0.750
	2h-45d	CYP23	ACT	TBB4	PPR	r405	FBOX	MAPK2	ACT104	UBQ11	UBP25	0.15	0.13	0.231	0.248	0.306	0.308	0.315	0.361	0.419	0.486	0.601	0.661	0.231	0.248	0.306	0.308	0.315	0.361	0.419	0.486	0.601	0.661	0.739	0.694	0.680	0.638	0.612	0.426	0.421	0.328	0.089	0.026
	8h-45d	ACT	PPR	CYP23	r405	MAPK2	TBB4	ACT104	UBQ11	FBOX	UBP25	0.14	0.14	0.283	0.293	0.308	0.391	0.402	0.449	0.471	0.605	0.673	1.180	0.283	0.293	0.308	0.391	0.402	0.449	0.471	0.605	0.673	0.752	0.919	0.876	0.849	0.829	0.750	0.560	0.462	0.936	0.927	0.892
	30min	TBB4	PPR	UBP25	CYP23	ACT	r405	MAPK2	FBOX	ACT104	UBQ11	0.09	0.07	0.110	0.183	0.188	0.204	0.237	0.240	0.251	0.270	0.282	0.491	0.110	0.183	0.188	0.204	0.237	0.240	0.251	0.270	0.282	0.491	0.979	0.942	0.916	0.907	0.896	0.860	0.790	0.712	0.711	0.702
	2h	PPR	UBP25	ACT	ACT104	CYP23	TBB4	r405	MAPK2	FBOX	UBQ11	0.08	0.05	0.092	0.133	0.148	0.156	0.164	0.181	0.250	0.280	0.300	0.571	0.092	0.133	0.148	0.156	0.164	0.181	0.250	0.280	0.300	0.571	0.894	0.879	0.867	0.830	0.712	0.586	0.549	0.531	0.531	-0.781
	8h	PPR	UBP25	ACT	r405	TBB4	ACT104	MAPK2	CYP23	UBQ11	FBOX	0.10	0.11	0.100	0.126	0.130	0.167	0.175	0.175	0.197	0.235	0.295	0.304	0.100	0.126	0.130	0.167	0.175	0.175	0.197	0.235	0.295	0.304	0.984	0.974	0.970	0.962	0.958	0.949	0.948	0.896	0.730	0.912
	45d	CYP23	ACT	PPR	ACT104	r405	TBB4	MAPK2	FBOX	UBQ11	UBP25	0.06	0.10	0.210	0.265	0.269	0.292	0.326	0.333	0.411	0.449	0.583	1.150	0.210	0.265	0.269	0.292	0.326	0.333	0.411	0.449	0.583	1.150	0.713	0.641	0.322	0.269	0.197	0.121	0.095	-0.020	0.885	0.304
Root	30min-2h-8h-1d	CYP23	UBP25	ACT104	ACT	PPR	UBQ11	MAPK2	r405	TBB4	FBOX	0.23	0.14	0.273	0.277	0.324	0.444	0.456	0.465	0.606	0.622	0.699	0.827	0.273	0.277	0.324	0.444	0.456	0.465	0.606	0.622	0.699	0.827	0.943	0.910	0.893	0.874	0.726	0.638	0.404	0.866	0.755	0.577
	30min-2h-8h	CYP23	PPR	UBP25	UBQ11	ACT104	ACT	TBB4	MAPK2	r405	FBOX	0.17	0.14	0.304	0.341	0.353	0.388	0.448	0.578	0.586	0.645	0.672	0.808	0.304	0.341	0.353	0.388	0.448	0.578	0.586	0.645	0.672	0.808	0.967	0.880	0.841	0.804	0.718	0.647	0.468	0.225	0.885	0.874
	30min-2h-1d	ACT104	ACT	UBP25	CYP23	MAPK2	UBQ11	PPR	r405	TBB4	FBOX	0.25	0.16	0.267	0.274	0.358	0.388	0.439	0.459	0.517	0.570	0.664	0.716	0.267	0.274	0.358	0.388	0.439	0.459	0.517	0.570	0.664	0.716	0.945	0.934	0.908	0.894	0.720	0.695	0.663	0.610	0.854	0.673
	30min-8h-1d	ACT104	UBP25	CYP23	UBQ11	ACT	PPR	MAPK2	r405	TBB4	FBOX	0.17	0.13	0.237	0.258	0.258	0.314	0.451	0.464	0.616	0.616	0.777	0.908	0.237	0.258	0.258	0.314	0.451	0.464	0.616	0.616	0.777	0.908	0.936	0.918	0.904	0.877	0.820	0.666	0.561	0.423	0.845	0.438
	2h-8h-1d	CYP23	UBP25	ACT104	ACT	UBQ11	PPR	TBB4	r405	MAPK2	FBOX	0.23	0.15	0.240	0.245	0.295	0.444	0.475	0.534	0.628	0.631	0.696	0.852	0.240	0.245	0.295	0.444	0.475	0.534	0.628	0.631	0.696	0.852	0.945	0.943	0.913	0.862	0.723	0.601	0.390	0.887	0.856	0.671
	30min-2h	CYP23	PPR	MAPK2	UBP25	UBQ11	ACT	ACT104	r405	FBOX	TBB4	0.18	0.16	0.301	0.313	0.389	0.477	0.497	0.522	0.573	0.645	0.665	0.674	0.301	0.313	0.389	0.477	0.497	0.522	0.573	0.645	0.665	0.674	0.900	0.889	0.835	0.681	0.637	0.543	0.520	0.982	0.961	0.888
	30min-8h	CYP23	PPR	UBQ11	UBP25	ACT104	ACT	r405	MAPK2	TBB4	FBOX	0.18	0.12	0.275	0.299	0.306	0.326	0.329	0.526	0.613	0.638	0.718	0.938	0.275	0.299	0.306	0.326	0.329	0.526	0.613	0.638	0.718	0.938	0.960	0.943	0.867	0.779	0.775	0.768	0.396	0.255	-0.128	0.876
	30min-1d	ACT104	ACT	UBP25	CYP23	MAPK2	UBQ11	PPR	r405	TBB4	FBOX	0.17	0.16	0.221	0.233	0.284	0.327	0.364	0.388	0.488	0.530	0.755	0.787	0.221	0.233	0.284	0.327	0.364	0.388	0.488	0.530	0.755	0.787	0.922	0.919	0.910	0.889	0.838	0.806	0.504	0.455	0.808	0.558
	2h-8h	CYP23	UBP25	PPR	UBQ11	ACT104	ACT	TBB4	r405	MAPK2	FBOX	0.16	0.15	0.269	0.343	0.377	0.450	0.510	0.556	0.570	0.608	0.760	0.845	0.269	0.343	0.377	0.450	0.510	0.556	0.570	0.608	0.760	0.845	0.964	0.935	0.871	0.847	0.843	0.769	0.554	0.211	0.914	0.626
	2h-1d	CYP23	UBP25	ACT	ACT104	TBB4	PPR																																				

	0.240	0.240	0.314	0.532	0.617	0.660	0.701	0.746	0.780	0.976		0.198	0.305	0.338	0.374	0.420	0.444	0.475	0.476	0.507	0.944	0.949	0.945	0.913	0.893	0.871	0.867	0.708	0.607	0.922	0.757
8h-1d	ACT104	ACT	r405	CYP23	UBP25	UBQ11	PPR	TBB4	MAPK2	FBOX	0.15 0.12	UBP25	CYP23	ACT104	UBQ11	r405	ACT	PPR	MAPK2	TBB4	FBOX	ACT*	UBP25*	CYP23*	r405*	ACT104*	UBQ11*	TBB4*	PPR	MAPK2	FBOX*
	0.367	0.367	0.452	0.506	0.522	0.582	0.632	0.693	0.752	0.927		0.179	0.220	0.292	0.347	0.376	0.392	0.453	0.505	0.600	0.878	0.920	0.890	0.882	0.876	0.870	0.661	0.651	0.470	0.091	0.432
30min	UBP25	FBOX	UBQ11	PPR	CYP23	ACT	ACT104	r405	MAPK2	TBB4	0.13 0.12	FBOX	UBQ11	ACT	ACT104	UBP25	MAPK2	CYP23	PPR	r405	TBB4	UBQ11*	ACT*	ACT104	UBP25	PPR	FBOX	CYP23	MAPK2	r405	TBB4*
	0.325	0.325	0.391	0.457	0.468	0.504	0.524	0.576	0.627	0.828		0.169	0.199	0.202	0.233	0.236	0.279	0.291	0.332	0.408	0.660	0.970	0.849	0.803	0.745	0.744	0.654	0.568	0.334	0.237	0.399
2h	CYP23	UBP25	UBQ11	PPR	ACT104	TBB4	r405	ACT	MAPK2	FBOX	0.09 0.09	UBP25	ACT104	r405	UBQ11	CYP23	TBB4	MAPK2	PPR	ACT	FBOX	UBQ11*	UBP25*	CYP23*	PPR	MAPK2	ACT104*	TBB4*	r405*	ACT*	FBOX*
	0.206	0.206	0.262	0.317	0.545	0.659	0.720	0.774	0.830	1.012		0.245	0.289	0.413	0.414	0.420	0.457	0.509	0.527	0.566	1.027	0.957	0.956	0.900	0.808	0.641	0.986	0.985	0.938	0.917	0.752
8h	ACT	r405	ACT104	CYP23	UBQ11	UBP25	PPR	TBB4	MAPK2	FBOX	0.12 0.10	ACT104	UBQ11	UBP25	CYP23	r405	ACT	PPR	TBB4	MAPK2	FBOX	ACT104*	r405*	ACT*	CYP23*	UBQ11*	UBP25*	PPR*	FBOX*	MAPK2*	TBB4*
	0.262	0.262	0.338	0.384	0.433	0.460	0.505	0.591	0.727	0.850		0.163	0.193	0.207	0.227	0.310	0.396	0.485	0.661	0.707	0.880	0.968	0.957	0.950	0.840	0.757	0.734	0.631	-0.210	-0.620	0.858
1d	CYP23	UBQ11	MAPK2	UBP25	PPR	ACT104	TBB4	ACT	r405	FBOX	0.11 0.10	UBP25	CYP23	ACT	MAPK2	UBQ11	ACT104	r405	PPR	TBB4	FBOX	UBP25*	CYP23*	ACT*	MAPK2*	r405*	ACT104*	UBQ11*	TBB4*	PPR*	FBOX*
	0.215	0.215	0.298	0.365	0.469	0.529	0.554	0.594	0.633	0.861		0.149	0.193	0.285	0.313	0.356	0.356	0.433	0.447	0.465	0.839	0.934	0.924	0.911	0.868	0.832	0.822	0.778	0.597	0.583	0.753

4 CHOQUE SALINO EM *CALOTROPIS PROCERA* LEVA AO ACÚMULO DE AÇÚCARES, AMINOÁCIDOS E MODULAÇÃO TRANSCRICIONAL DE AQUAPORINAS EM RAÍZES ALIVIANDO O STATUS HÍDRICO FOLIAR

A ser submetido ao periódico Journal Plant Physiology.

Normas do periódico estão disponíveis no website: <https://ees.elsevier.com/jplph/>

ANEXO B

Choque salino em *Calotropis procera* leva ao acúmulo de açúcares, aminoácidos e modulação transcricional de aquaporinas em raízes aliviando o status hídrico foliar

Maria R. V. Coêlho¹, Rebeca Rivas¹, José Ribamar C. Ferreira-Neto², Valesca Pandolfi², Ana Maria Benko-Iseppon², Mauro G. Santos^{1*}

¹*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Botânica, Laboratório de Fisiologia Vegetal, 50670-901, Recife-PE, Brasil.*

²*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório Genética e Biotecnologia Vegetal, 50670-901, Recife-PE, Brasil.*

*Autor para correspondência. Tel.: +55 81 2126 8844. Fax: +55 81 2126 7803;
Email: mauro.gsantos@ufpe.br (M.G. Santos).

RESUMO

A salinização do solo é um problema global, sendo fundamental a compreensão de respostas dos vegetais através de estudos de fisiologia, bioquímica e biologia molecular em espécies C_3 tolerante à seca e à salinidade como é o caso de *Calotropis procera*. Neste estudo, plantas jovens de *C. procera* mantidas em casa de vegetação foram submetidas a dois tratamentos, controle e choque salino (200 mM de NaCl) por um período de três dias. Cada tratamento foi composto por 53 réplicas biológicas. As plantas sob salinidade mostraram redução da condutância estomática (g_s), assimilação de CO_2 (A), e baixo decréscimo no conteúdo hídrico relativo foliar (CHR) (14%) em relação ao controle. Em geral, após horas (2 h, 8 h) e dias (24 h, 30 h, 48 h, 54 h) de imposição da salinidade foi observada regulação positiva dos metabólitos em raízes, com maior acúmulo de frutose (251%) após 2 h, prolina após 8 h (259%), carboidratos solúveis (294%) e sacarose (373%) após 48 h e aminoácidos (1193%) após 54 h. Doze aquaporinas associadas ao transporte de água apresentaram expressão diferencial em raízes de *C. procera* sob salinidade. Indução transcricional foi observada somente após 2 h, com maior indução de *TIP1.4* (4 vezes), a repressão transcricional, por sua vez, ocorreu principalmente após 8 h, com maior repressão associada a aquaporina *PIP1.2*. A alta salinidade provocou resposta rápida nos parâmetros fisiológicos de plantas de *C. procera*. A imposição a grandes concentrações de NaCl afeta a fotossíntese da espécie em curto espaço de tempo, mas pouco afeta seu nível de hidratação. *C. procera* utiliza metabólitos envolvidos nos processos de osmorregulação e osmoproteção para aclimação ao estresse osmótico com rápida regulação da dinâmica destes metabólitos. Além disso, exibe modulação da expressão de aquaporinas de raízes para o controle do fluxo de água sob choque salino. Neste sentido, o acúmulo de aminoácidos e carboidratos e a regulação da expressão de aquaporinas na raiz contribuem no conjunto para a alta performance do sistema radicular e alívio do status hídrico foliar de *C. procera* sob choque salino.

Palavras chave: Trocas gasosas. Solutos osmóticos. Proteínas intrínsecas de membrana plasmática. Proteínas intrínsecas de tonoplasto. Raízes. Regulação temporal.

Abreviações: CHR, conteúdo hídrico relativo; A , assimilação líquida de CO_2 ; g_s , condutância estomática; E , transpiração, EUA, eficiência do uso da água; CHL a , clorofila a ; CHL b , clorofila b ; CST, carboidratos solúveis totais; ALT, aminoácidos livres totais; PST, proteínas

solúveis totais; *PIP*, proteínas intrínsecas de membrana plasmática, *TIP*, proteínas intrínsecas de tonoplasto, *ACT104*, Actin 104; *CYP23*, Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 23; *UBP25*, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25. AQPs, aquaporinas.

1 INTRODUÇÃO

O excesso de sal no solo afeta a sobrevivência das plantas sendo um dos principais fatores responsáveis pelo processo de desertificação no mundo (D’Odorico et al., 2013), levando a perdas consideráveis para a agricultura (27,3 bilhões de dólares ano) (Qadir et al., 2014). As perdas na produtividade ocorrem devido ao excesso de sal no solo submeter as plantas ao estresse salino, o qual interfere na sua homeostase afetando o crescimento e sobrevivência (Munns e Tester, 2008; Negrão et al., 2017; Trivellini et al., 2016). O grau de estresse acarretado pela salinidade, além de estar relacionado ao tempo de exposição ao sal e tolerância das espécies, é fortemente influenciado pela concentração de NaCl. Dessa forma, quando as plantas são expostas a concentrações de sal muito elevadas (≥ 200 mM de NaCl), ou seja ao choque salino, experimentam os efeitos do estresse osmótico e iônico de forma mais rápida e intensa, além de maior susceptibilidade de plasmólise das células vegetais (Shavrukov, 2012).

As relações hídricas da planta são dependentes do sistema radicular, portanto, respostas de aclimação das raízes à salinidade são essenciais para garantir a condutividade de água e nutrientes (Javot e Maurel, 2002; Koevoets et al., 2016; Rodríguez-Gamir et al., 2019) e ao mesmo tempo evitar acúmulo de Na^+ nos órgãos fotossintetizantes (Munns e Tester, 2008; Willadino e Camara, 2010). Entre os mecanismos desencadeados pelas raízes, a osmorregulação e osmoproteção por meio do acúmulo de metabolitos primários e regulação da atividade de aquaporinas merecem destaque, pois são acionados por diversas espécies para tolerância à salinidade (Akbari et al., 2018; Blum, 2017; Feng et al., 2018; Kapilan et al., 2018; Liu et al., 2012; Sami et al., 2016; Slama et al., 2015).

O acúmulo de metabólitos orgânicos é uma estratégia de tolerância ao sal, que além de possibilitar redução da pressão osmótica e reestabelecimento do fluxo de água em relação ao solo salinizado (Blum et al 2017), estar associado com a eliminação de radicais livres, proteção das estruturas celulares e manutenção da atividade enzimática (Mansour e Ali, 2017; Sami et al., 2016; Slama et al., 2015; Szabados e Saviouré, 2010).

Aquaporinas são proteínas intrínsecas de membrana que atuam no transporte de água celular, mas também de pequenos solutos (H_2O_2 , amônia, uréia, glicerol, arsenito, ácido bórico) gases (CO_2 , O_2) e íons (Fox et al., 2017; Kapilan et al., 2018; Li et al., 2014). A atividade das aquaporinas desempenha um papel importante nas relações hídricas da planta inteira sendo amplamente regulada sob salinidade e seca (Feng et al., 2018; Kapilan et al., 2018; Li et al., 2014; Liu et al., 2012; Rodríguez-Gamir et al., 2019). Essas proteínas influenciam a fisiologia

vegetal exercendo fortes efeitos na condutividade hidráulica, condutância estomática, transpiração, condutância do mesófilo, transporte de nutrientes, fotossíntese, crescimento e desenvolvimento (Li et al., 2014; Liu et al., 2015; Moshelion et al., 2015; Rodríguez-Gamir et al., 2019). Além de influenciar a homeostase iônica e de espécies reativas de oxigênio (An et al., 2018; Li et al., 2016).

Calotropis procera é uma espécie invasora, que é encontrada habitando regiões tropicais e subtropicais do globo que sujeitam as plantas ao estresse abiótico (Frosi et al., 2013; Hassan et al., 2015; Rivas et al., 2017; Tezara et al., 2011). Entre as características peculiares destacam-se manutenção de folhas sempre-verdes na presença do metabolismo C₃, elevada performance fotossintética sob alto controle estomático e alta eficiência do uso da água (Frosi et al., 2013; Rivas et al., 2017; Tezara et al., 2011). Mostrando-se relevante modelo de estudo ecofisiológico e importante candidata para fornecer genes envolvidos no processo de tolerância à salinidade; principalmente para aqueles envolvidos em mecanismos de manutenção do status hídrico.

Este estudo teve como objetivo caracterizar respostas fisiológicas e moleculares de *C. procera* à salinidade baseado em duas hipóteses: 1) O sistema radicular de *C. procera* apresenta respostas bioquímicas que lhe permite promover a osmorregulação por meio do acúmulo de solutos orgânicos; 2) Em condições de alta salinidade, a indução da expressão de aquaporinas de membrana plasmática (*PIPs*) e do tonoplasto (*TIPs*) ocorre para promover o ajuste do fluxo de água celular (vacúolo-citosol-apoplasto) e aumento da absorção de água do sistema radicular da espécie *C. procera*.

2 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E MATERIAL VEGETAL

Sementes de *Calotropis procera* foram coletadas no litoral de Pernambuco, Brasil (7 ° 50'32.9 "S, 34 ° 50'21.2" W), e a desinfecção da superfície foi realizada por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (v / v) durante 5 min e posteriormente foram lavadas com água deionizada. As sementes foram germinadas em placas de Petri com papel filtro umedecido com água deionizada e mantidas em câmara de crescimento (à 25 ° C, fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de 70%). Após a emergência da radícula, as plântulas foram transferidas para vasos contendo 7 kg de areia lavada e mantidas em casa de vegetação por três meses. Posteriormente, plantas foram submetidas ao choque salino de curto prazo por três dias. Neste período as plantas foram submetidas a dois tratamentos: 1) Controle: plantas jovens regadas todos os dias com água deionizada. 2) Choque salino: plantas jovens regadas todos os dias com solução de 200 mM de NaCl. A primeira rega foi realizada às 8:00 da manhã e as regas posteriores ocorreram ao final da análise de trocas gasosas no período da manhã. Cada tratamento foi composto por 53 plantas. Para determinação dos tempos de coleta do material vegetal e das medidas fisiológicas foi utilizado como referência o tempo inicial de aplicação da salinidade (8:00 h). O 1º dia de experimento englobou os tempos 30 min, 2 h e 8 h de exposição à salinidade. O 2º dia englobou os tempos 21 h, 24 h e 30 h e o 3º dia 45 h, 48 h e 54 h de exposição à salinidade.

2.2 CONTEÚDO HÍDRICO RELATIVO FOLIAR

O conteúdo hídrico relativo foliar (CHR) foi mensurado por meio da coleta de discos foliares no período de antemanhã (5:00 h) de acordo com a metodologia de Barrs e Weatherley (1962), 21 h e 45 h após o início da imposição da salinidade. O CHR foi calculado de acordo com a fórmula: $CHR (\%) = (MF - MS / MT - MS) \times 100$, onde MS é igual ao peso da matéria seca, MF é igual ao peso da matéria fresca, MT é igual ao peso da matéria túrgida.

2.3 TROCAS GASOSAS

A condutância estomática (g_s), assimilação líquida de CO_2 (A) e transpiração (E) foram mensuradas em folhas completamente expandidas e sadias com o auxílio de um analisador portátil de trocas gasosas por infravermelho (IRGA, ADC, modelo *LCi-Pro*, Hoddesdon, UK). A densidade de fluxo de fótons fotossintético (DFFF) foi determinada pela mensuração da radiação incidente do ambiente. A eficiência do uso da água (EUA) foi calculada a partir da razão assimilação líquida de CO_2 e transpiração (A/E).

As avaliações foram realizadas no período da manhã (08:00 - 09:00 h) 24 h e 48 h após o início da imposição da salinidade e no período da tarde (12:00 - 13:00 h) após 28 h e 52 h após o início da imposição da salinidade. Em conjunto foi determinado o déficit de pressão de vapor (DPV) de acordo com Campbell e Norman (1998). No período da manhã foram determinados DPV de 1,87 kPa para o 2º dia (às 24 h), e 3,25 kPa (às 48 h) para o 3º dia de experimento. No período da tarde o DPV foi de 5,1 kPa e 4,35 kPa para o 2º (às 28 h) e 3º dia (às 52 h), respectivamente. Como medida de simplificação o déficit de pressão de vapor matutino foi denominado baixo DPV e o vespertino denominado alto DPV.

2.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para análise dos solutos orgânicos foram utilizadas raízes coletadas em diferentes tempos após o início da imposição da salinidade (30 min, 2 h, 8 h, 24 h, 30 h, 48 h e 54 h). Somente para traçar o estado fisiológico foliar no 2º e 3º dia de experimento, também foram coletadas folhas às 24 h e 48 h. Todas as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C . Os tecidos vegetais coletados foram utilizados para quantificação de carboidratos solúveis totais (CST), sacarose, frutose, aminoácidos livres totais (ALT), prolina (PRL), proteínas solúveis totais (PST), clorofila *a* (CHL *a*), clorofila *b* (CHL *b*) seguindo as metodologias propostas por Dubois et al., (1956), Van Handel (1968), Foreman et al. (1973), Moore e Stein, (1948), Bates et al., (1973), Bradford (1976), Lichtenthaler e Buschmann, (2001), respectivamente. As análises foram determinadas em espectrofotômetro com duplo feixe ajustado ao comprimento de onda específico para cada composto orgânico.

2.5 ANÁLISE MOLECULAR

2.5.1 Coleta do material radicular

Para análise da expressão gênica de aquaporinas foram realizadas coletas do tecido radicular nos tempos 2 h, 8 h e 24 h após o início da imposição da salinidade. Todas as amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o isolamento do RNA.

2.5.2 Isolamento de RNA total e síntese de cDNA

Para a realização do isolamento do RNA total das amostras de raízes foi utilizado o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Fitchburg WI, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Eletroforese em gel de agarose à 1,5% (p/v), corado com *blue-green loading dye I* (LGC Biotechnology, SP, Brasil) foi utilizado para a determinação da integridade do RNA. A quantificação das amostras de RNA foi realizada por fluorometria (Qubit, Oregon, EUA). A conversão de RNA em cDNA (transcrição reversa) foi realizada com 1 µg de RNA total, utilizando GoScript™ Reverse Transcription System Oligo dT (Promega, Fitchburg WI, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante (Promega). Posteriormente, o cDNA foi armazenado à -20°C.

2.5.3 Seleção de aquaporinas e desenho de primers

Para seleção de alvos de aquaporinas (AQPs) e desenho de primers foi utilizado o transcriptoma foliar de *C. procera* exposta à salinidade depositado no banco de dados do NCBI (número de acesso: PRJNA508417). Para tanto, foram utilizadas sequências sondas reconhecidas como codificadoras de AQPs obtidas no banco de dados do UNIPROT (*Universal Protein*) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Posteriormente foi realizado BLAST local (tBLASTn) contra o transcriptoma de *C. procera* (programa *BioEdit*). As sequências recuperadas foram traduzidas pela ferramenta *ORFinder* e submetidas à ferramenta de reconhecimento de domínios *CD-Search* para a seleção de sequências com domínio MIP completo. Para determinação da nomenclatura das AQPs foi realizado um alinhamento (programa MEGA 7) com sequências de aquaporinas de *C. procera* e *Arabidopsis thaliana* para construção de uma árvore fenética (método *Neighbor Joining*, *Bootstrap* 1000 replicações) (Tamura et al., 2007). A nomenclatura foi baseada na homologia de sequências (Johanson et al., 2001) (Fig. S2). O alinhamento também foi utilizado para a confirmação da presença e integridade do motivo funcional NPA e do filtro seletivo ar/R, ambos relacionados ao transporte

de água (Wallace e Roberts, 2004) (Fig S3). Os transcritos selecionados foram *proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIPs)* e *proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs)*, totalizando duas *PIP1*, quatro *PIP2*, quatro *TIP1*, duas *TIP2* e uma *TIP4*.

Os primers foram desenhados usando a ferramenta da internet Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) com os seguintes parâmetros: comprimento 18 - 22 pb, conteúdo de GC de 45% - 55% (ideal de 50%), temperatura de *melting* (*T_m*) de 58 °C - 62 °C (ideal de 60 °C) e produtos amplificados de 100-200 pb (Tabela S1).

2.5.4 Condições qPCR

As reações qPCR foram realizadas em PCR LineGene 9600 (Bioer, Hangzhou, China) utilizando GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Fitchburg WI, EUA). O mix de reação de 10 µL consistiu de 5 µL de *SYBR Green Super Mix* (Applied Biosystems, Foster City CA, EUA), 2 µL de cDNA diluído (1/10), 0,3 µL para cada primer (5 µM) e 2,4 µL ddH₂O. Controles *Non-template* também foram incluídos para cada par de *primers*. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 95 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 15 s e 62 °C por 1 min. A curva de *melting* foi gerada variando a temperatura de amplificação de 65 - 95 °C. Todas as reações foram realizadas em triplicatas (réplicas biológicas e técnicas) (Bustin et al., 2009). A eficiência de amplificação (*E*) foi determinada a partir de uma curva padrão gerada por diluições seriadas de cDNA (1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000) para cada primer, em triplicata, e calculada usando a equação: $E = 10^{(-1/\text{slope of the standard curve})}$ (Rasmussen, 2001).

Por meio do pacote de software Rest2009 (modo REST Standard) a expressão relativa dos genes de aquaporinas foi calculada utilizando dados de *C_q* (Ciclo de quantificação) por meio da fórmula: $E^{(\Delta C_q \text{ alvo})} / E^{(\Delta C_q \text{ normalizador})}$ onde: *E* representa a eficiência média para cada gene, ΔC_q a diferença entre o *C_q* da amostra controle e da amostra tratada. Os dados da expressão foram normalizados pela média geométrica do nível de expressão de três genes de referência *CYP23* (*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 23*), *ACT104* (*Actin-104*) e *UBP25* (*Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25*) (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002).

2.6 CONTEÚDO DE SÓDIO E POTÁSSIO, RELAÇÃO Na⁺/K⁺

Para quantificação do conteúdo de sódio e potássio foram coletados folhas, caule e raízes após 54 h de imposição da salinidade. Após secagem em estufa (60°C), 500 mg de material

vegetal foi digerido em solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) em bloco digestor à 350 °C para obtenção do extrato das amostras (Thomas et al., 1967). O conteúdo de sódio e potássio foi determinado por fotometria de emissão de chamas (DM-62, Digimed, São Paulo, BR). A relação Na^+/K^+ foi calculada usando os dados do conteúdo de sódio e potássio.

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Por meio do programa Statistica, os dados das variáveis, conteúdo hídrico relativo, trocas gasosas, bioquímica, conteúdo de sódio, conteúdo de potássio, relação Na^+/K^+ foram submetidos ao teste T para comparação das médias (controle x choque salino) com nível de significância de 5 %. Os dados que não apresentaram distribuição normal e homogeneidade foram submetidos ao teste Mann-Whitney com nível de significância de 5 %. Os dados de expressão relativa dos genes de aquaporinas foram submetidos a comparações pareadas usando técnicas de randomização e *bootstrapping* (Teste de Randomização de Realocação Pareada Fixa) com nível de significância de 5 % utilizando o pacote de software Rest2009 (modo REST Standard) (Pfaffl et al., 2002).

3 RESULTADOS

3.1 CONTEÚDO HÍDRICO RELATIVO

O conteúdo hídrico relativo foliar (CHR) de plantas expostas à salinidade exibiu redução de 14 % em relação ao controle somente após 45 h da imposição do choque salino. As plantas dos tratamentos controle e choque salino apresentaram valores médios de CHR na faixa de 84 e 72 %, respectivamente (Fig. 1).

3.2 TROCAS GASOSAS

O choque salino promoveu redução da condutância estomática (g_s) em relação ao controle principalmente sob baixo DPV após 48 h de imposição da salinidade (42 %) (Fig. 2 A). Apesar da imposição do sal, 24 h e 28 h não foram suficientes para reduzir a assimilação de CO_2 (A) em plantas sob choque salino, tendo aumento de 23 % e 8 %, respectivamente. Contudo, redução foi observada após 48 h e 52 h de imposição do sal principalmente sob alto DPV (62 %) (Fig. 2 B). Em adição, a eficiência do uso da água (EUA) aumentou 74 % em plantas expostas a salinidade em comparação as plantas controle após 24 h e 28 h da adição do sal (baixo e alto DPV). Entretanto, após 48 h e 52 h de imposição à salinidade não houve diferença significativa entre os tratamentos (Fig. 2 C).

3.3 SOLUTOS ORGÂNICOS DE FOLHAS E RAÍZES

A salinidade promoveu alterações significativas dos metabólitos primários de folhas da espécie *C. procera* (Tabela 1 e Fig. 3-4). Plantas expostas a salinidade exibiram redução dos pigmentos cloroplastídicos clorofila *a* (*CHL a*) (17 %) e clorofila *b* (*CHL b*) (15 %) após a 48 h de imposição da salinidade (Tabela 1).

Os solutos envolvidos no metabolismo do carbono, carboidratos solúveis totais (CST) e sacarose em folhas de plantas expostas a salinidade mostraram-se superiores em relação às plantas controle após 24 h de imposição da salinidade, com aumento de 24 e 39 %, respectivamente. Porém, houve redução de frutose às 24 h (17 %) e de CST 48 h (18 %) (Fig. 3 A-C). Os aminoácidos livres totais (ALT) não exibiram alterações significativas em folhas de *C. procera*. Foi observado tanto decréscimo de prolina (27 %) quanto de proteínas solúveis

totais (PST) (20 %) às 24 h em plantas sob NaCl em comparação as plantas controle. Porém, aumento de prolina (60 %) e PST (17 %) ocorreu após 48 h de exposição à salinidade (Fig. 3 D-F).

A salinidade promoveu alterações rápidas na dinâmica do metabolismo primário do sistema radicular da espécie *C. procera* (Fig. 4). Plantas submetidas ao tratamento de choque salino exibiram decréscimos de CST (63 %), sacarose (98 %) e frutose (64 %) após 30 min de imposição à salinidade em relação ao controle (Fig. 4 A-C). E após 2 h de imposição do estresse, houve aumento de CST (161 %) e frutose (251 %). Entretanto, para os tempos de 8 h e 24 h não houve diferenças significativas entre os tratamentos para todos os carboidratos (Fig. 4 A-C). Já após 30 h, plantas sob choque salino exibiram aumento de sacarose (305 %), CST (43 %), frutose (49 %) em comparação ao controle. Plantas do tratamento salino também apresentaram aumento de CST (294 %) e sacarose (373 %) perante 48 h de exposição ao sal. Tanto CST (148 %) quanto sacarose (357 %) e frutose (149 %) foram acumulados após 54 h em plantas submetidas ao choque salino (Fig. 4 A-C).

Assim como os carboidratos em raízes, os solutos envolvidos no metabolismo do nitrogênio exibiram decréscimos no sistema radicular de plantas expostas a salinidade após 30 min de imposição à salinidade. Houve redução de 60 % de ALT, 77 % de prolina e 64 % de PST em relação ao controle (Fig. 4 D-F). Decréscimo de prolina (34 %) também foi observado após 2 h sob sal. Sobretudo, PST exibiu aumento de 63 e 85 % em plantas do tratamento salino em relação ao controle (às 2 h e 8 h), respectivamente e também aumento de 260 % de prolina após 8 h de imposição de NaCl (Fig. 4 EF). Em comparação ao controle, plantas sob tratamento salino aumentaram o conteúdo de ALT (109 %) às 24 h, como também acréscimo de prolina (128-45 %) e redução de PST (21-27 %) às 24 h e 30 h de exposição à salinidade, respectivamente (Fig. 4 D-F). Em relação ao controle, plantas sob NaCl apresentaram acréscimos de ALT (215, 1.194 %) e PST (190, 181%) perante 48 h e 54 h de imposição a salinidade. Também às 54 h a prolina (58 %) foi acumulada (Fig. 4 D-F).

3.4 EXPRESSÃO GÊNICA DE AQUAPORINAS NO SISTEMA RADICULAR

A salinidade promoveu alterações rápidas na dinâmica da expressão de proteínas intrínsecas de membrana plasmática e de tonoplasto de raízes da espécie *C. procera*. *TIP1.4* foi a isoforma mais fortemente induzida e *PIP1.2* a mais reprimida. Plantas submetidas ao tratamento de choque salino exibiram indução da expressão de *PIP1.2*, *PIP2.4* (Fig. 5 BF),

TIP1.1, *TIP1.2*, *TIP1.3*, *TIP1.4*, e *TIP2.1* (Fig. 5 G-K) e repressão da expressão de *PIP2.1*, *PIP2.2*, *PIP2.3* (Fig. 5 C-E) e *TIP4.1* (Fig. 5 M) após 2 h de exposição ao NaCl. A salinidade promoveu regulação negativa das isoformas *PIP1.2*, *PIP2.3*, *PIP2.4* (Fig. 5 BEF), *TIP1.3*, *TIP1.4*, *TIP2.1*, *TIP2.2* (Fig. 5 I-L) e *TIP4.1* (Fig. 5 M) às 8 h. E quando as plantas foram expostas por 24 h ao NaCl as isoformas *PIP1.2* (Fig. 5 B), *TIP1.3*, *TIP1.4* e *TIP2.2* (Fig. 5 IJL) foram reprimidas.

3.5 CONTEÚDO DE SÓDIO, POTÁSSIO E RELAÇÃO Na^+/K^+

O choque salino promoveu acúmulo de sódio nos tecidos de *C. procera*. O sistema radicular exibiu maiores acúmulos de Na^+ (217 %) em relação ao controle seguido do caule (127 %). Por outro lado, a folha, apesar de apresentar maior concentração de Na^+ em relação ao caule ou a raiz mostrou menor acúmulo (61 %) de Na^+ quando comparada ao controle (Fig. 6 A). Não houve diferenças significativas para o conteúdo de K^+ em ambos os tecidos (Fig. 6 B). Quanto a relação Na^+/K^+ , plantas tratadas apresentaram aumento de 70% na raiz, 62% no caule e 27% nas folhas (Fig 6 C).

4 DISCUSSÃO

Embora evitar e tolerar danos consequentes do estresse osmótico e iônico seja uma tarefa bastante difícil, dispor de diversos mecanismos de resposta adequados, atuando simultaneamente, é fundamental para a manutenção da integridade fisiológica durante o estresse salino. Em nosso estudo plantas jovens de *Calotropis procera* submetidas ao choque salino de curto prazo exibiram modulação de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e moleculares como resposta de aclimação ao estresse causado. Sob tais condições, não é surpreendente que um dos principais desafios para a aclimação ao estresse salino é o acúmulo de Na^+ nos tecidos vegetais, especialmente para folhas que são o principal local de toxicidade do Na^+ . Estratégias que evitem que o sódio seja transportado e acumulado nos órgãos fotossintetizantes são cruciais para a tolerância a salinidade (Munns, 2002; Munns e Tester, 2008; Willadino e Camara, 2010). Nesse propósito diversos mecanismos de tolerância são desencadeados por meio da seletividade na captação de Na^+ pela raiz, carregamento do xilema preferencial ao K^+ ao invés do Na^+ e também pela remoção de sódio do xilema realizado pelas raízes, caule, pecíolo e bainhas foliares (Munns, 2002; Munns e Tester, 2008; Willadino e Camara, 2010). Notavelmente, *C. procera* exibiu menor acúmulo de Na^+ nas folhas em relação ao caule e a raiz. E além disso, conseguiu manter as concentrações de K^+ significativamente inalteradas em todos os tecidos avaliados, contribuindo para a proteção do metabolismo de *C. procera*, principalmente nos tecidos foliares onde foi mantida menor relação intracelular de Na^+/K^+ . A manutenção do equilíbrio das concentrações de potássio em relação ao sódio atua no combate a toxicidade iônica, uma vez que o K^+ é essencial para evitar a entrada de Na^+ , promover a ativação de inúmeras enzimas, estabilização de síntese de proteínas e manutenção de homeostase do pH citosólico (Dreyer e Uozum, 2011; Munns e Tester, 2008).

Durante a exposição ao choque salino é comum que ocorra mudanças no status hídrico gerando o estresse osmótico em plantas (Munns e Tester, 2008) sendo observado pequenas mudanças no CHR foliar de *C. procera* ao ser exposta a elevadas concentrações de NaCl. Tênu interferência na manutenção do status hídrico como a encontrada nesse trabalho está associada a capacidade de tolerância ao sal resultante da utilização de mecanismos de eficiência do uso da água, tais como, controle estomático, ajuste osmótico e reprogramação transcricional de aquaporinas (Munns e Tester, 2008; Nounjan et al., 2018; Rodríguez-Gamir et al., 2019; Slama et al., 2015; Zhou et al., 2014). Por outro lado, rápidas e acentuadas reduções de CHR estão associadas a sensibilidade ao estresse osmótico (Hossain et al., 2015; Mekawy et al., 2015).

É importante ressaltar que a capacidade de evitar o acúmulo de sal nos órgãos fotossintetizantes, a manutenção do status hídrico como também a baixa relação Na^+/K^+ são cruciais para manter a atividade fotossintéticas sob salinidade (Munns e Tester, 2008; Wungrampha et al., 2018). Em nosso trabalho *C. procera* exibiu alta performance fotossintética diante de maior resistência estomática, EUA e alto DPV quando exposta a 24 h de choque salino. Resposta oposta entre A e g_s aqui observada pressupõe a influência de fatores não-estomáticos nas taxas fotossintéticas da espécie. Esses resultados são corroborados por trabalhos anteriores que investigaram a espécie sob déficit hídrico (Frosi et al., 2013; Rivas et al., 2017). A investigação de Rivas e colaboradores (2017) por exemplo discutiram que a alta taxa de fotossíntese da espécie *C. procera* era acompanhada de aumento da condutância do mesófilo e transporte de elétrons sob déficit hídrico. Além disso, esses autores também relataram a capacidade dessa espécie exibir A máxima sob alto DPV, DFFF e déficit hídrico (Rivas et al., 2017). Portanto em concordância com os trabalhos anteriores, propomos que a alta assimilação de CO_2 em *C. procera* sob choque de NaCl poderia ser explicada por aumento da condutância do mesófilo e carboxilação da Rubisco (Flexas et al., 2004; Rivas, 2016; Rivas et al., 2017). Por outro lado com o avanço do tempo de exposição à salinidade (após 48 h) a espécie mostrou declínio do desempenho fotossintético consistente com a limitação estomática. Nessas condições a redução de g_s afeta a fotossíntese por reduzir a disponibilidade de CO_2 para o sítio de fixação da Rubisco. Entretanto por outra perspectiva, o controle estomático mostra-se como resposta de aclimação da planta ao choque salino, favorecendo a economia de água e EUA em *C. procera* (Chaves et al., 2009; Frosi et al., 2013; Rivas et al., 2017). Além disso, a salinidade também promoveu declínio de pigmentos cloroplastídicos, corroborando a influência de limitações não-estomáticas na redução das taxas fotossintéticas em *C. procera*.

O acúmulo de solutos orgânicos está relacionado aos processos de osmorregulação e osmoproteção em plantas conferindo tolerância à salinidade (Blum, 2017; Mansour e Ali, 2017; Sami et al., 2016; Slama et al., 2015). Diante do choque salino, *C. procera* exibiu alterações rápidas e acentuadas na dinâmica do metabolismo primário do sistema radicular. A dinâmica metabólica através de flutuações rápidas tem significância adaptativa, uma vez que tanto metabólitos intermediários quanto os produtos finais das vias metabólicas (biossíntese/catabolismo) podem exercer funções importantes para a resposta de aclimação à salinidade (Slama et al., 2015, Richter et al. 2015). Nas raízes, após horas (2 h, 8 h) e dias (24 h, 30 h, 48 h, 54 h) de imposição ao NaCl foi observada regulação positiva dos metabólitos primários, sugerindo o possível uso dessas moléculas como osmoprotetores, osmorreguladores,

e como resposta primária de aclimação à salinidade em *C. procera*. Isso ocorreu principalmente 54 h da imposição da salinidade quando foi observada participação expressiva dos metabólitos primários nas raízes. Em contrapartida, a redução de todos os metabólitos nos minutos iniciais de exposição ao NaCl (30 min) mostrou evidências do período de ajuste de *C. procera* ao choque salino. Assim a espécie *C. procera* inicialmente sofre o impacto do choque salino, porém aclimata seu metabolismo rapidamente estimulando rotas metabólicas de resposta ao estresse.

De fato, choque salino não é comum em meio natural, onde a salinidade ocorre progressivamente. Entretanto, estudos como o nosso podem demonstrar a capacidade de uma espécie usar mecanismos eficientes de forma muito rápida. Os aminoácidos exibiram forte regulação sob salinidade, exibindo aumento superior a 10 vezes após 54 h de exposição ao choque salino. Sua acumulação foi atribuída principalmente por “síntese de novo” uma vez que para maioria das observações o acúmulo de ALT foi acompanhado do aumento de proteínas. O estudo recente das respostas transcriptômicas e metabólicas de *C. procera* à salinidade mostrou evidente participação dos aminoácidos como resposta de aclimação ao choque salino de 500 mM de NaCl ao longo do tempo. Os aminoácidos acumulados foram prolina, valina, leucina, glutamina, arginina, asparagina, serina e glutamato (Mutwakil et al., 2017). Em nosso trabalho avaliamos a resposta da prolina um dos aminoácidos mais acumulados em plantas sob condições de estresse, que geralmente exibe maior acúmulo em espécies tolerantes em relação às sensíveis (Evelin et al., 2009; Mansour e Ali, 2017; Verbruggen e Hermans, 2008). Além disso, a prolina desempenha inúmeras funções envolvendo a estabilização de estruturas subcelulares e proteases, eliminação de espécies reativas de oxigênio, aumento da atividade de enzimas de desintoxicação, redução do acúmulo de Na^+ e Cl^- , aumento da homeostase citosólica de K^+ , assim como na manutenção do fluxo de elétrons (Mansour e Ali, 2017; Szabados e Saviouré, 2010).

Outra importante classe de metabólitos compatíveis reconhecidos por apresentar inúmeras funções, mediando processos fisiológicos vitais das plantas são os carboidratos (Martínez-Noël e Tognetti, 2018; Sami et al., 2016). Os solutos envolvidos no metabolismo do carbono exibiram importante participação na resposta inicial a exposição à salinidade, com aumentos expressivos de CST, sacarose e frutose no sistema radicular. Por outro lado, o conteúdo de carboidratos nas folhas coincidiu com as taxas fotossintéticas. Os carboidratos são acumulados para aliviar os efeitos negativos da salinidade atuando na homeostase osmótica, eliminação de radicais livres e estabilização de membranas. Além disso, os açúcares estão

relacionados com a sinalização do estresse por meio da modulação da expressão de genes, redução do Na^+ e aumento da captação de K^+ sob salinidade (Martínez-Noël e Tognetti, 2018; Sami et al., 2016).

Uma vez acumulado solutos e criado um gradiente de potencial hídrico favorável para a condução hidráulica ao longo da planta, se faz necessário a facilitação do fluxo de água ao longo dos tecidos. Mecanismos de controle do fluxo de água por meio da atividade de aquaporinas (AQPs) são imprescindíveis para habitação em ambientes salinos, uma vez que AQPs exercem importante papel fisiológico no status hídrico, controle da condutividade hidráulica ao longo da planta, absorção de água na raiz a partir da solução do solo e condutância estomática (Li et al., 2014; Moshelion et al., 2015). As aquaporinas das raízes de *C. procera* mostraram resposta diferencial ao choque salino. Dessa forma, cinco isoformas *TIP* foram induzidas e cinco foram reprimidas. Os membros *TIP*, estão localizados principalmente na membrana do vacúolo (tonoplasto) e possuem atividade no transporte de água superior a encontrada para os membros *PIP* (Maurel, 1997; Maurel et al., 2008). Além de água, *TIPs* são capazes de transportar glicerol, uréia, amônia e CO_2 (Fox et al., 2017; Maeshima e Ishikawa, 2008; Maurel et al., 2009). É relatada que a superexpressão de *TIPs* confere tolerância à salinidade em diversas espécies. O gene *PgTIP1* por exemplo, conferiu maior tolerância à salinidade e a seca em soja ao manter a homeostase da água, Na^+ e de espécies reativas de oxigênio (An et al., 2018). A superexpressão de *PgTIP1* em soja promove a indução da expressão de *NHX*, *SOS1*, *CAT1* e *APX1* contribuindo para a compartimentalização de íons no vacúolo e defesa antioxidante sob salinidade (An et al., 2017). Peng et al., (2007) mostraram que a superexpressão de *PgTIP1* confere maior crescimento e tolerância ao sal em *Arabidopsis thaliana*. Em *Arabidopsis* transformadas com *SlTIP2.2* foi relatado aumento da atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, POD), razão K^+/Na^+ e tolerância à salinidade (Xin et al., 2014). Já Martins et al., 2017 relataram a melhora da capacidade antioxidante e crescimento de tabaco sob NaCl que superexpressaram *CsTIP2*.

Isoformas *PIP* também foram induzidas em raízes de *C. procera*, no entanto, em menor proporção em relação as isoformas *TIP1*. Além disso, esta subfamília atua no transporte de água com alta eficiência, controlando quase que a totalidade do potencial de permeabilidade de água da membrana plasmática por meio dos membros *PIP1* e *PIP2* (Bellati et al., 2010; Maeshima e Ishikawa, 2008). Já para a inibição da expressão de *PIPs* foi descrito redução no transporte de água nas raízes, condutividade hidráulica, potencial hídrico foliar e retardamento na recuperação de plantas após o déficit hídrico (Siefritz et al., 2002). Por outro lado, a

superexpressão de *GmPIP1.6* em raízes confere tolerância a salinidade em soja por promover manutenção da condutividade hidráulica, aumento da assimilação de CO₂ e crescimento (Zhou et al., 2014). Por fim, a superexpressão de *PIP2.7* induz aumento de seis vezes na condutividade hidráulica da raiz em *Arabidopsis thaliana* condicionada à salinidade (Pou et al., 2016).

As isoformas de AQPs em *C. procera* exibiram regulação transitória da expressão ao longo do tempo de exposição ao NaCl. Variação temporal da expressão de AQPs sob salinidade foi mostrada em raízes de arroz (Li et al., 2008), em folhas de espécies de *Malus* (Liu et al., 2012) e em *Arabidopsis* sob NaCl e desidratação (Feng et al., 2018). A regulação transcricional e pós-transcricional de isoformas de AQPs é complexa e por vezes opostas (Fox et al., 2017; Kapilan et al., 2018), entretanto, entre as aquaporinas aqui estudadas foi possível traçar um padrão de expressão temporal, havendo indução (*up-regulation*, *UP*) às 2 h e repressão (*down-regulation*, *DOWN*) após 8 h e 24 h de exposição ao choque salino.

Os trabalhos supracitados evidenciam a importância da indução de aquaporinas para manutenção do status hídrico das espécies vegetais (An et al., 2018; Pou et al., 2016; Zhou et al., 2014), sendo a expressão coordenada de *PIPs* e *TIPs* um ponto chave para a melhora do fluxo de água celular e captação de água na raiz (Johansson et al., 2000; Maurel et al., 2015, 2002; Zhao et al., 2008). Além disso, a repressão de AQPs influenciam negativamente a condutividade hidráulica e condutância estomática amortecendo as taxas transpiratórias, que por sua vez, favorece a conservação de água na parte aérea (Hachez et al., 2006; Moshelion et al., 2015; Siefritz et al., 2002; Skorupa-Kłaput et al., 2015). Adicionalmente pesquisas relatam o papel funcional de aquaporinas presentes em células do parênquima do xilema no controle hidráulico, destacando a participação destas AQPs na manutenção da capacidade de transporte do xilema e na restauração da funcionalidade dos vasos após a embolia (Secchi et al. 2017).

Neste contexto evidenciamos que sob condições de alta salinidade, a indução da expressão de *PIPs* e *TIPs*, com destaque *PIP2.4*, *TIP1.4* e *TIP1.3* possivelmente ocorre para promover o ajuste do fluxo de água celular (vacúolo-citosol-apoplasto) e aumento da absorção de água do sistema radicular da espécie *C. procera* (Johansson et al., 2000; Maurel et al., 2015, 2002; Zhao et al., 2008). Por outro lado, propomos que a repressão da expressão de AQPs em especial de *PIP1.2*, *TIP4.1* e *TIP1.4* às 8 h, e *PIP1.2*, *TIP2.2* e *TIP1.3* após 24 h de exposição ao NaCl pode ser uma estratégia utilizada por *C. procera* para evitar a perda de água pelo sistema radicular na presença de alto potencial osmótico do solo salinizado (Hachez et al., 2006; Skorupa-Kłaput et al., 2015).

A plasticidade em modular de forma transitória o metabolismo primário e expressão gênica de AQP_s evidencia a robustez da resposta de aclimação do sistema radicular de *C. procera* aos efeitos rápidos do estresse osmótico e iônico gerado pelo choque salino (Munns e Tester, 2008; Shavrukov, 2013). Estes mecanismos de aclimação podem atuar localmente na proteção dos processos celulares e na manutenção da atividade do sistema radicular por meio da osmorregulação, desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e compartimentalização do sódio citosólico (An et al., 2018, 2017; Mansour e Ali, 2017; Sami et al., 2016; Slama et al., 2015). E de fato pode regular a homeostase da água da planta inteira (An et al., 2018; Chaumont and Tyerman, 2017; Javot e Maurel, 2002; Maurel et al., 2015; Moshelion et al., 2015; Pou et al., 2016; Rodríguez-Gamir et al., 2019; Zhou et al., 2014).

O estudo das respostas fisiológicas de *C. procera* sob choque salino mostrou que a alta salinidade provoca rápida resposta detectável pelos parâmetros fisiológicos de plantas jovens sob condições de casa de vegetação. A imposição a grandes concentrações de NaCl (200 mM) afeta a fotossíntese da espécie em curto espaço de tempo, mas pouco afeta seu nível de hidratação. *C. procera* utiliza metabólitos envolvidos nos processos de osmorregulação e osmoproteção para aclimação ao estresse osmótico, exibindo rápida regulação da dinâmica destes metabólitos no sistema radicular. Contudo, sob condições de salinidade de curto prazo, respostas menos acentuadas ocorrem na regulação de metabólitos em folhas. Além disto, a modulação temporal da expressão de *PIPs* e *TIPs* evidencia a plasticidade da permeabilidade de água do sistema radicular, para responder a redução na entrada de água e desidratação celular geradas pelo solo salinizado. Neste sentido, o acúmulo de aminoácidos e carboidratos e a regulação da expressão de aquaporinas na raiz contribuem no conjunto para a alta performance do sistema radicular e alívio do status hídrico foliar de *C. procera* sob choque salino.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [CNPq-470247 / 2013-4 e 310871 / 2014-0]. M.R.V.C. agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. M.G.S. e A.M.B.I. reconhece ao CNPq as bolsas e apoio financeiro, e ao Programa CAPES BioComputacional [88882.160046 / 2013-01] pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Akbari, M., Mahna, N., Ramesh, K., Bandehagh, A., Mazzuca, S., 2018. Ion homeostasis, osmoregulation, and physiological changes in the roots and leaves of pistachio rootstocks in response to salinity. *Protoplasma* 255, 1349–1362. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1235-z>
- An, J., Cheng, C., Hu, Z., Chen, H., Cai, W., Yu, B., 2018. The *Panax ginseng* *PgTIP1* gene confers enhanced salt and drought tolerance to transgenic soybean plants by maintaining homeostasis of water, salt ions and ROS. *Environmental and Experimental Botany* 155, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.06.025>
- An, J., Hu, Z., Che, B., Chen, H., Yu, B., Cai, W., 2017. Heterologous expression of *Panax ginseng* *PgTIP1* Confers enhanced salt tolerance of soybean cotyledon hairy roots, composite, and whole plants. *Frontier in Plant Science*. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01232>
- Barrs, H.D., Weatherley, P.E., 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal Biology. Sciences*. 15, 413–428. <https://doi.org/10.1071/bi9620413>
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bellati, J., Alleva, K., Soto, G., Vitali, V., Jozefkowicz, C., Amodeo, G., 2010. Intracellular pH sensing is altered by *plasma membrane PIP* aquaporin co-expression. *Plant Molecular Biology*. 74, 105–118. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9658-8>
- Blum, A., 2017. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. *Plant, Cell & Environment* 40, 4–10. <https://doi.org/10.1111/pce.12800>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Campbell, G.S., Norman, J.M., 1998. An introduction to environmental biophysics. Springer-Verlag, New York.
- Chaumont, F., Tyerman, S.D. (Eds.), 2017. *Plant Aquaporins: From Transport to Signaling, Signaling and Communication in Plants*. Springer International Publishing.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103, 551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- D’Odorico, P., Bhattachan, A., Davis, K.F., Ravi, S., Runyan, C.W., 2013. Global desertification: Drivers and feedbacks. *Advances in Water Resources*, 35th Year Anniversary Issue 51, 326–344. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2012.01.013>
- Dreyer I., Uozumi N .2011.Potassium channels in plant cells.FEBS Journal 278, 4293–4303 <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08371.x>.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350–356.
- Evelin, H., Kapoor, R., Giri, B., 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany* 104, 1263–1280. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp251>
- Feng, Z.-J., Xu, S.-C., Liu, N., Zhang, G.-W., Hu, Q.-Z., Xu, Z.-S., Gong, Y.-M., 2018. Identification of the AQP members involved in abiotic stress responses from *Arabidopsis*. *Gene* 646, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.12.048>

- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, T.D., 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C_3 plants. *Plant Biology*. 6, 269–279. <https://doi.org/10.1055/s-2004-820867>
- Flexas, J., Díaz-Espejo, A., Conesa, M.A., Coopman, R.E., Douthe, C., Gago, J., Gallé, A., Galmés, J., Medrano, H., Ribas-Carbo, M., Tomás, M., Niinemets, Ü., 2016. Mesophyll conductance to CO_2 and Rubisco as targets for improving intrinsic water use efficiency in C_3 plants. *Plant Cell Environmental*. 39, 965–982. <https://doi.org/10.1111/pce.12622>
- Foreman, D., Gaylor, L., Evans, E., Trella, C., 1973. A modification of the Roe procedure for determination of fructose in tissues with increased specificity. *Analytical Biochemistry* 56, 584–590. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90225-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90225-X)
- Fox, A.R., Maistriaux, L.C., Chaumont, F., 2017. Toward understanding of the high number of plant aquaporin isoforms and multiple regulation mechanisms. *Plant Science* 264, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.07.021>
- Frosi, G., Oliveira, M.T., Almeida-Cortez, J., Santos, M.G., 2013. Ecophysiological performance of *Calotropis procera*: an exotic and evergreen species in Caatinga, Brazilian semi-arid. *Acta Physiologiae Plantarum* 35, 335–344. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1076-x>
- Hachez, C., Zelazny, E., Chaumont, F., 2006. Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions? *Biochimica et Biophysica Acta* 1758, 1142–1156. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2006.02.017>
- Hassan, L.M., Galal, T.M., Farahat, E.A., El-Midany, M.M., 2015. The biology of *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Trees 29, 311–320. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1158-7>
- Hossain, M.M., Lam, H.-M., Zhang, J., 2015. Responses in gas exchange and water status between drought-tolerant and -susceptible soybean genotypes with ABA application. *The Crop Journal* 3, 500–506. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2015.09.001>
- Javot, H., Maurel, C., 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Annals of Botany*. 90, 301–313. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf199>
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Frayse, L., Weig, A.R., Kjellbom, P., 2001. The Complete set of genes encoding major *intrinsic proteins* in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology* 126, 1358–1369. <https://doi.org/10.1104/pp.126.4.1358>
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C., Kjellbom, P., 2000. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465, 324–342. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00147-4)
- Kapilan, R., Vaziri, M., Zwiazek, J.J., 2018. Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological Research*. 51, 4. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0152-0>
- Koevoets, I.T., Venema, J.H., Elzenga, J.T.M., Testerink, C., 2016. Roots Withstanding their environment: exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. *Frontier in Plant Science* 7, 1335. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01335>
- Li, G., Santoni, V., Maurel, C., 2014. Plant aquaporins: Roles in plant physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, Aquaporins* 1840, 1574–1582. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.004>
- Li, R., Wang, J., Li, S., Zhang, L., Qi, C., Weeda, S., Zhao, B., Ren, S., Guo, Y.-D., 2016. Plasma Membrane Intrinsic Proteins *SlPIP2;1*, *SlPIP2;7* and *SlPIP2;5* conferring enhanced drought stress tolerance in tomato. *Science Report* 6. <https://doi.org/10.1038/srep31814>
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy, in: *current protocols in food analytical chemistry*. F4.3.1-F4, 1–8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- Liu, C., Li, C., Liang, D., Wei, Z., Zhou, S., Wang, R., Ma, F., 2012. Differential expression of ion transporters and aquaporins in leaves may contribute to different salt tolerance in *Malus* species. *Plant Physiology and Biochemical*. 58, 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.06.019>

- Liu, P., Yin, L., Wang, S., Zhang, M., Deng, X., Zhang, S., Tanaka, K., 2015. Enhanced root hydraulic conductance by aquaporin regulation accounts for silicon alleviated salt-induced osmotic stress in *Sorghum bicolor* L. *Environmental and Experimental Botany*. 111, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.10.006>
- Maeshima, M., Ishikawa, F., 2008. ER membrane aquaporins in plants. *Pflügers Archiv*. 456, 709–716. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0363-7>
- Mansour, M.M.F., Ali, E.F., 2017. Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry* 140, 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.016>
- Martínez-Noël, G.M.A., Tognetti, J.A., 2018. Chapter 22 - Sugar Signaling Under Abiotic Stress in Plants, in: Ahmad, P., Ahanger, M.A., Singh, V.P., Tripathi, D.K., Alam, P., Alyemeni, M.N. (Eds.), *Plant metabolites and regulation under environmental stress*. Academic Press, pp. 397–406. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00022-4>
- Martins, C.P.S., Neves, D.M., Cidade, L.C., Mendes, A.F.S., Silva, D.C., Almeida, A.-A.F., Coelho-Filho, M.A., Gesteira, A.S., Soares-Filho, W.S., Costa, M.G.C., 2017. Expression of the citrus *CsTIP2;1* gene improves tobacco plant growth, antioxidant capacity and physiological adaptation under stress conditions. *Planta* 245, 951–963. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2653-4>
- Maurel, C., 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biol.* 48, 399–429. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.399>
- Maurel, C., Boursiac, Y., Luu, D.-T., Santoni, V., Shahzad, Z., Verdoucq, L., 2015. Aquaporins in Plants. *Physiological Reviews* 95, 1321–1358. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2015>
- Maurel, C., Javot, H., Lauvergeat, V., Gerbeau, P., Tournaire, C., Santoni, V., Heyes, J., 2002. *International Review of Cytology*, 215, 105–148. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)15007-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)15007-8)
- Maurel, C., Santoni, V., Luu, D.-T., Wudick, M.M., Verdoucq, L., 2009. The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 690–698. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.09.002>
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.-T., Santoni, V., 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual of Review Plant Biology*. 59, 595–624. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092734>
- Mekawy, A.M.M., Assaha, D.V.M., Yahagi, H., Tada, Y., Ueda, A., Saneoka, H., 2015. Growth, physiological adaptation, and gene expression analysis of two Egyptian rice cultivars under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 87, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.12.007>
- Moore, S., Stein, W.H., 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *Journal of Biological Chemistry*. 176, 367–388.
- Moshelion, M., Halperin, O., Wallach, R., Oren, R., Way, D.A., 2015. Role of aquaporins in determining transpiration and photosynthesis in water-stressed plants: crop water-use efficiency, growth and yield. *Plant Cell Environmental*. 38, 1785–1793. <https://doi.org/10.1111/pce.12410>
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment* 25, 239–250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Munns, R., James, R.A., Gilliam, M., Flowers, T.J., Colmer, T.D., 2016. Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Functional Plant Biol.* 43, 1103–1113. <https://doi.org/10.1071/FP16187>
- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Mutwakil, M.Z., Hajrah, N.H., Atef, A., Edris, S., Sabir, M.J., Al-Ghamdi, A.K., Sabir, M.J.S.M., Nelson, C., Makki, R.M., Ali, H.M., El-Domyati, F.M., Al-Hajar, A.S.M., Gloaguen, Y., Al-Zahrani, H.S., Sabir, J.S.M., Jansen, R.K., Bahieldin, A., Hall, N., 2017. Transcriptomic and metabolic responses of *Calotropis procera* to salt and drought stress. *BMC Plant Biology* 17, 231. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1155-7>
- Negrão, S., Schmöckel, S.M., Tester, M., 2017. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Ann Bot* 119, 1–11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw191>

- Nounjan, N., Chansongkrow, P., Charoensawan, V., Siangliw, J.L., Toojinda, T., Chadchawan, S., Theerakulpisut, P., 2018. High performance of photosynthesis and osmotic adjustment are associated with salt tolerance ability in rice carrying drought tolerance QTL: physiological and co-expression network analysis. *Front Plant Sci* 9, 1135. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01135>
- Peng, Y., Lin, W., Cai, W., Arora, R., 2007. Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* 226, 729–740. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0520-4>
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Pou, A., Jeanguenin, L., Milhiet, T., Batoko, H., Chaumont, F., Hachez, C., 2016. Salinity-mediated transcriptional and post-translational regulation of the *Arabidopsis* aquaporin PIP2;7. *Plant Mol. Biol.* 92, 731–744. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0542-z>
- Qadir, M., Quill rou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., Thomas, R.J., Drechsel, P., Noble, A.D., 2014. Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Natural Resources Forum* 38, 282–295. <https://doi.org/10.1111/1477-8947.12054>
- Rabhi, M., Castagna, A., Remorini, D., Scattino, C., Smaoui, A., Ranieri, A., Abdelly, C., 2012. Photosynthetic responses to salinity in two obligate halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Tecticornia indica*. *South African Journal of Botany* 79, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.11.007>
- Rasmussen, R., 2001. Quantification on the LightCycler, in: Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K.-I. (Eds.), *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 21–34. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3
- Redondo-G mez, S., Mateos-Naranjo, E., Figueroa, M.E., Davy, A.J., 2010. Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. *Plant Biology* 12, 79–87. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00207.x>
- Rivas, R., Frosi, G., Ramos, D.G., Pereira, S., Benko-Iseppon, A.M., Santos, M.G., 2017. Photosynthetic limitation and mechanisms of photoprotection under drought and recovery of *Calotropis procera*, an evergreen C₃ from arid regions. *Plant Physiol. Biochem.* 118, 589–599. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.026>
- Rodríguez-Gamir, J., Xue, J., Clearwater, M.J., Meason, D.F., Clinton, P.W., Domec, J.-C., 2019. Aquaporin regulation in roots controls plant hydraulic conductance, stomatal conductance, and leaf water potential in *Pinus radiata* under water stress. *Plant Cell Environment.* 42, 717–729. <https://doi.org/10.1111/pce.13460>
- Rozema, J., Schat, H., 2013. Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany, Sustainable cultivation and exploitation of halophyte crops in a salinizing world* 92, 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.08.004>
- Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., Hayat, S., 2016. Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 109, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.005>
- Shavrukov, Y., 2013. Salt stress or salt shock: which genes are we studying? *Journal of Experimental Botany* 64, 119–127. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers316>
- Siefritz, F., Tyree, M.T., Lovisolo, C., Schubert, A., Kaldenhoff, R., 2002. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *The Plant Cell* 14, 869–876. <https://doi.org/10.1105/tpc.000901>
- Silveira, J.A.G., Araújo, S.A.M., Lima, J.P.M.S., Vi gas, R.A., 2009. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. *Environmental and Experimental Botany* 66, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.015>
- Skorupa-Klaput, M., Szczepanek, J., Kurnik, K., Tretyn, A., Tyburski, J., 2015. The expression patterns of plasma membrane aquaporins in leaves of sugar beet and its halophyte relative, *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, in response to salt stress. *Biologia* 70, 467–477. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0056>

- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., Saviouré, A., 2015. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany* 115, 433–447. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu239>
- Secchi, F., Pagliarani, C., Zwieniecki, M. A. 2017. The functional role of xylem parenchyma cells and aquaporins during recovery from severe water stress. *Plant, Cell & Environment* 40: 858– 871. <https://doi.org/10.1111/pce.12831>
- Stepien, P., Johnson, G.N., 2009. Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *Thellungiella*: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. *Plant Physiology* 149, 1154–1165. <https://doi.org/10.1104/pp.108.132407>
- Szabados, L., Saviouré, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Tezara, W., Colombo, R., Coronel, I., Marín, O., 2011. Water relations and photosynthetic capacity of two species of *Calotropis* in a tropical semi-arid ecosystem. *Annals Botany.* 107, 397–405. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq245>
- Thomas, R.L., Sheard, R.W., Moyer, J.R., 1967. Comparison of conventional and automated procedures for nitrogen, phosphorus, and potassium analysis of plant material using a single digestion 1. *Agronomy Journal* 59, 240–243. <https://doi.org/10.2134/agronj1967.00021962005900030010x>
- Trivellini, A., Lucchesini, M., Ferrante, A., Carmassi, G., Scatena, G., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A., 2016. Survive or die? A molecular insight into salt-dependant signaling network. *Environmental and Experimental Botany* 132, 140–153. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.07.007>
- Van Handel, E., 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry* 22, 280–283. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90317-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90317-5)
- Verbruggen, N., Hermans, C., 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>
- Wallace, I.S., Roberts, D.M., 2004. Homology Modeling of Representative Subfamilies of *Arabidopsis* Major Intrinsic Proteins. Classification Based on the Aromatic/Arginine Selectivity Filter. *Plant Physiology* 135, 1059–1068. <https://doi.org/10.1104/pp.103.033415>
- Willadino, L., Camara, T.R., 2010. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos . *Enciclopédia Biosfera.* 6, 1-23.
- Wungrampha, S., Joshi, R., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A., 2018. Photosynthesis and salinity: are these mutually exclusive? *Photosynthetica* 56, 366–381. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0763-7>
- Xin, S., Yu, G., Sun, L., Qiang, X., Xu, N., Cheng, X., 2014. Expression of tomato *SlTIP2;2* enhances the tolerance to salt stress in the transgenic *Arabidopsis* and interacts with target proteins. *Journal of Plant Research.* 127, 695–708. <https://doi.org/10.1007/s10265-014-0658-7>
- Zhao, C.-X., Shao, H.-B., Chu, L.-Y., 2008. Aquaporin structure-function relationships: water flow through plant living cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 62, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.10.015>
- Zhou, L., Wang, C., Liu, R., Han, Q., Vandeleur, R.K., Du, J., Tyerman, S., Shou, H., 2014. Constitutive overexpression of soybean plasma membrane intrinsic protein *GmPIP1;6* confers salt tolerance. *BMC Plant Biology* 14, 181. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-181>

LEGENDA DE FIGURAS

Fig. 1 Conteúdo de sódio de folhas, caule e raízes de plantas jovens de *C. procera* sob 54 horas de exposição ao choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação ($n=4\pm E.P$). Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste T ou teste Mann-Whitney ($p<0,05$).

Fig. 2 Conteúdo hídrico relativo (CHR) em folhas de plantas jovens de *C. procera* sob condições de choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação ($n=4\pm E.P$). Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste T ou teste Mann-Whitney ($p<0,05$).

Fig. 3. (A) Condutância estomática (g_s), (B) assimilação líquida de CO_2 (A) e (C) eficiência do uso da água (EUA) em plantas jovens de *C. procera* sob condições de choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação ($n=4\pm E.P$). Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste T ou teste Mann-Whitney ($p<0,05$).

Fig. 4 (A) Carboidratos solúveis totais (CST), (B) sacarose, (C) frutose, (D) aminoácidos livres totais, (E) prolina, (F) proteínas solúveis totais (PST) em folhas de plantas jovens de *C. procera* sob condições de choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação ($n=4\pm E.P$). Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste T ou teste Mann-Whitney ($p<0,05$).

Fig. 5 (A) Carboidratos solúveis totais (CST), (B) sacarose, (C) frutose, (D) aminoácidos livres totais, (E) prolina, (F) proteínas solúveis totais (PST) em raízes de plantas jovens de *Calotropis procera* sob condições de choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação ($n=4\pm E.P$). Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste T ou teste Mann-Whitney ($p<0,05$).

Fig. 6 Expressão relativa de aquaporinas em raízes de plantas jovens de *C. procera* condições de choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação. (A-F) Proteínas intrínsecas de membrana plasmática. (G-M) Proteínas intrínsecas de tonoplasto. (---) Linha tracejada indica limite entre a regulação positiva (acima da linha) e negativa (abaixo da linha) da expressão. Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste de Randomização de Realocação Pareada Fixa ($p<0,05$).

Fig. S1. Análise fenética de membros da família de aquaporinas de *C. procera* e *Arabidopsis thaliana* pelo método de *Neighbor Joining*, com valores de *bootstrap* ao nível de 1000 replicações. PIP (Proteínas de Membrana Plasmática), TIP (Proteínas de Membrana de Tonoplasto).

Fig.S2. Alinhamento de sequências de aquaporinas de *C. procera* e *Arabidopsis thaliana*. As sequências de aminoácidos foram alinhadas usando o programa MEGA 7. Motivos NPA conservados estão destacados em amarelo. Sítios ar / R (posições H2, H5, LE1 e LE2) estão destacados em caixa de texto.

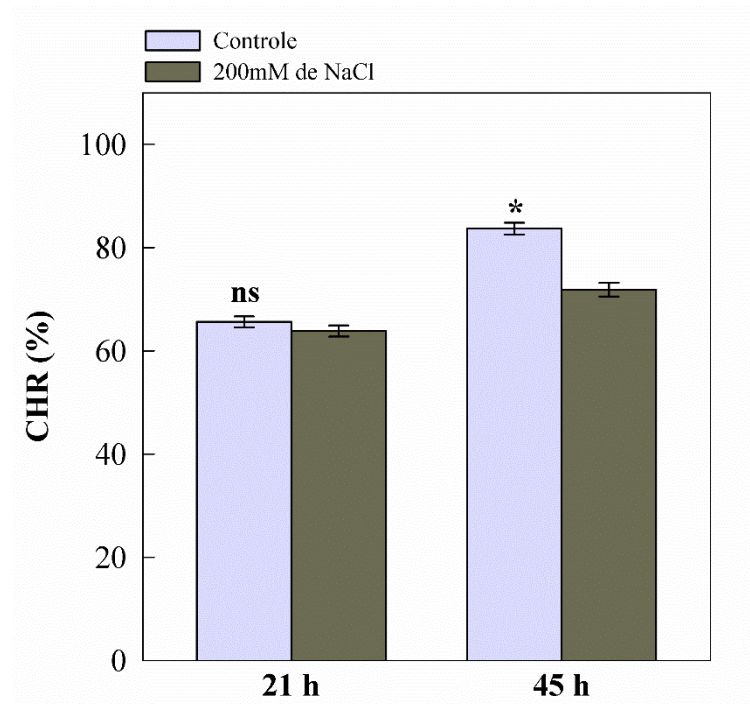


Fig. 1

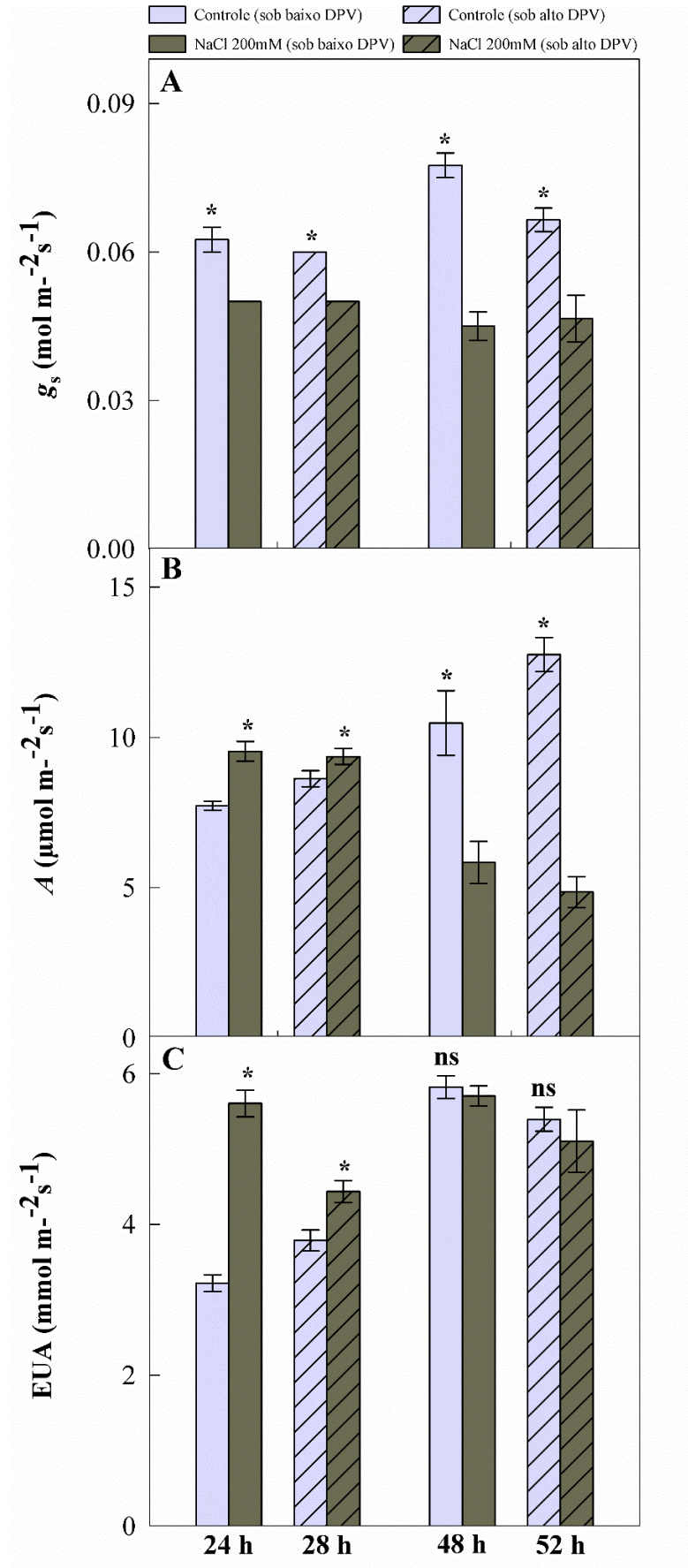


Fig. 2.

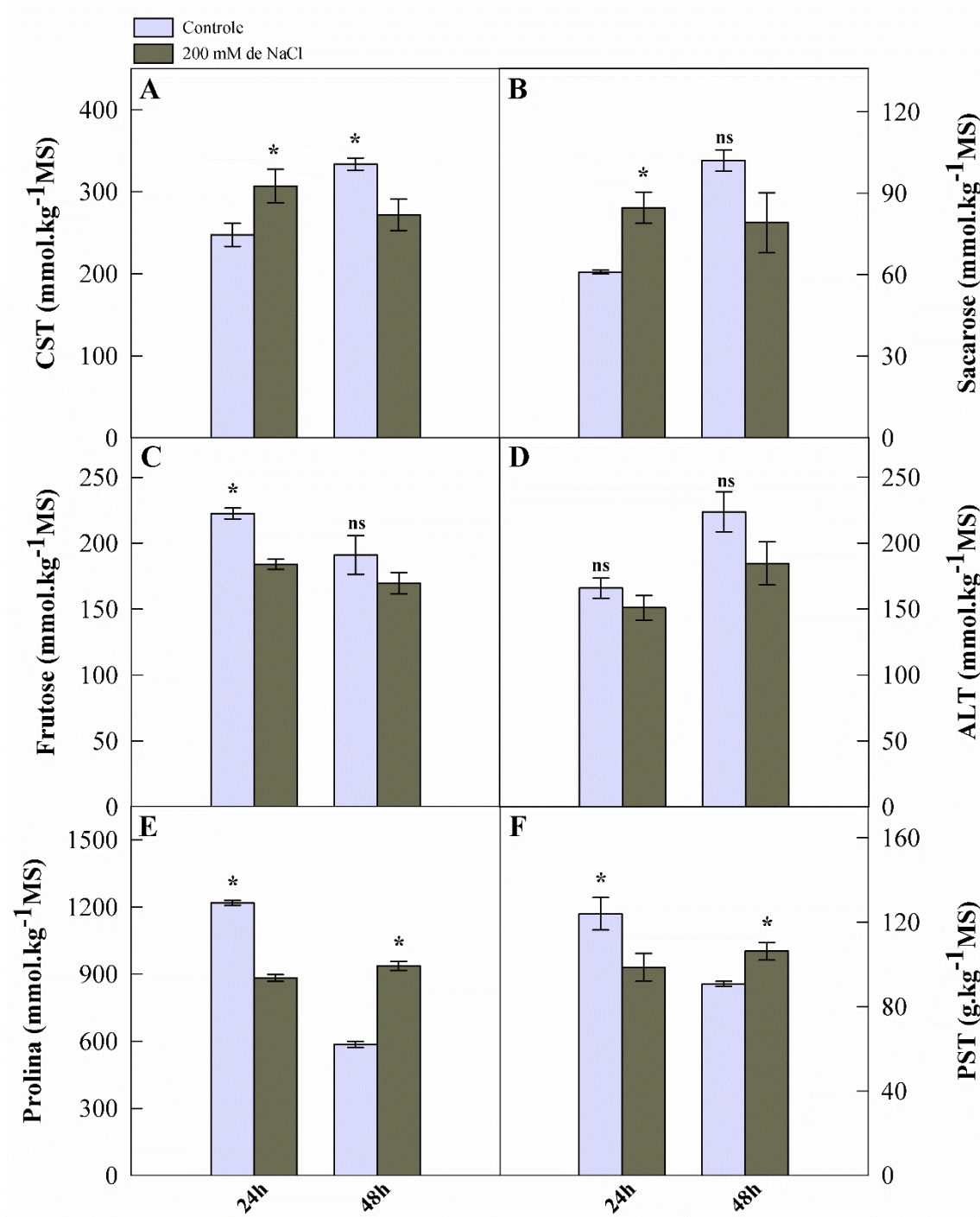


Fig. 3

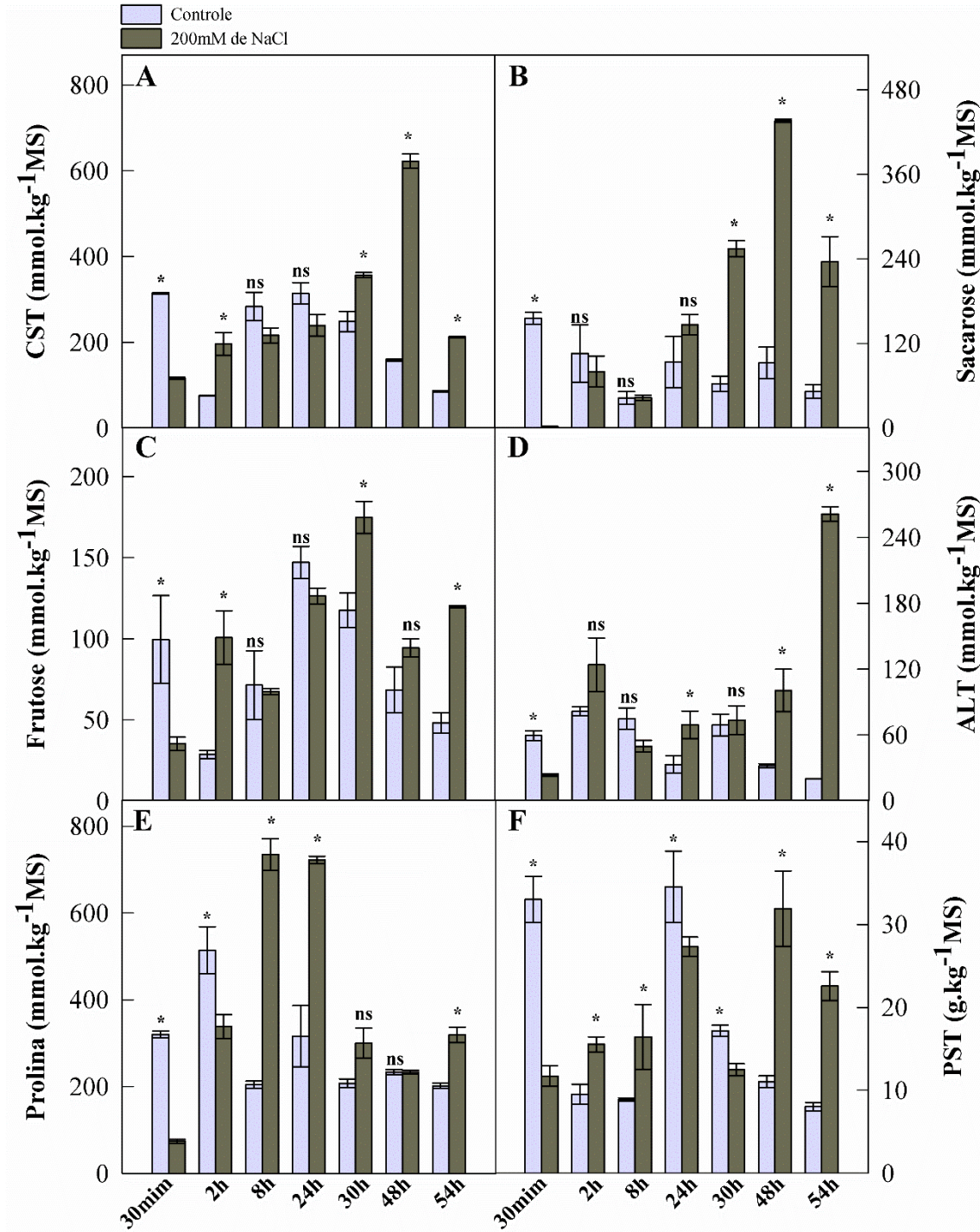


Fig. 4

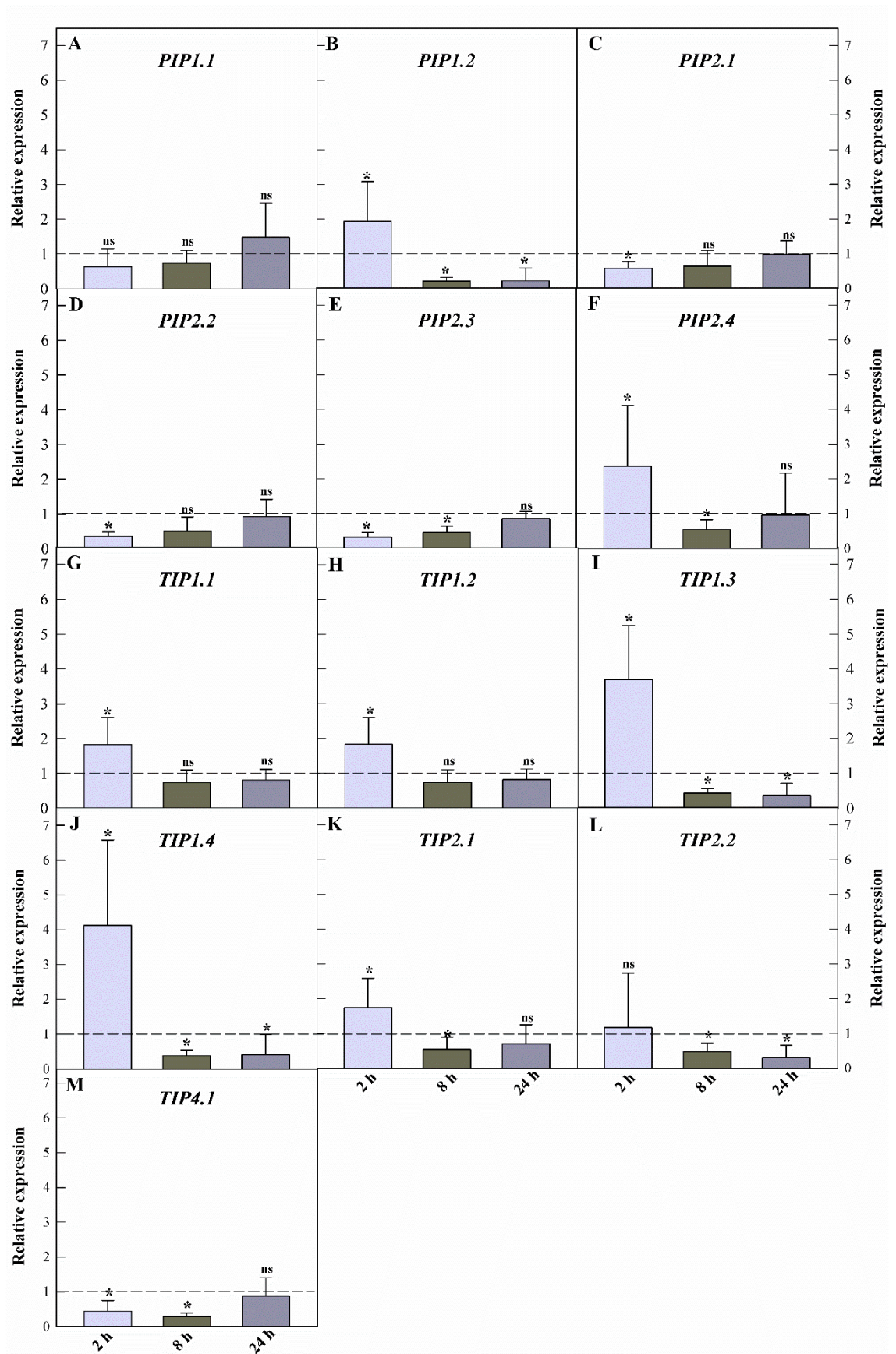


Fig. 5

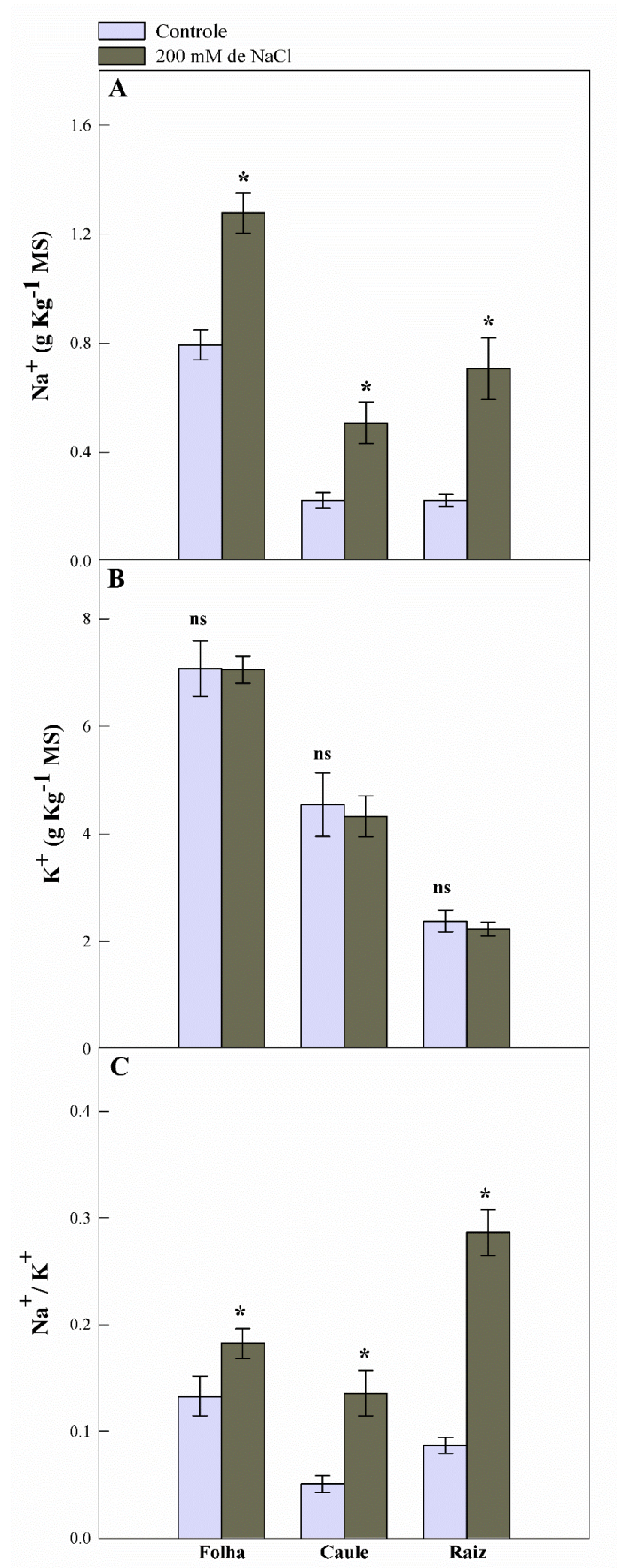


Fig. 6

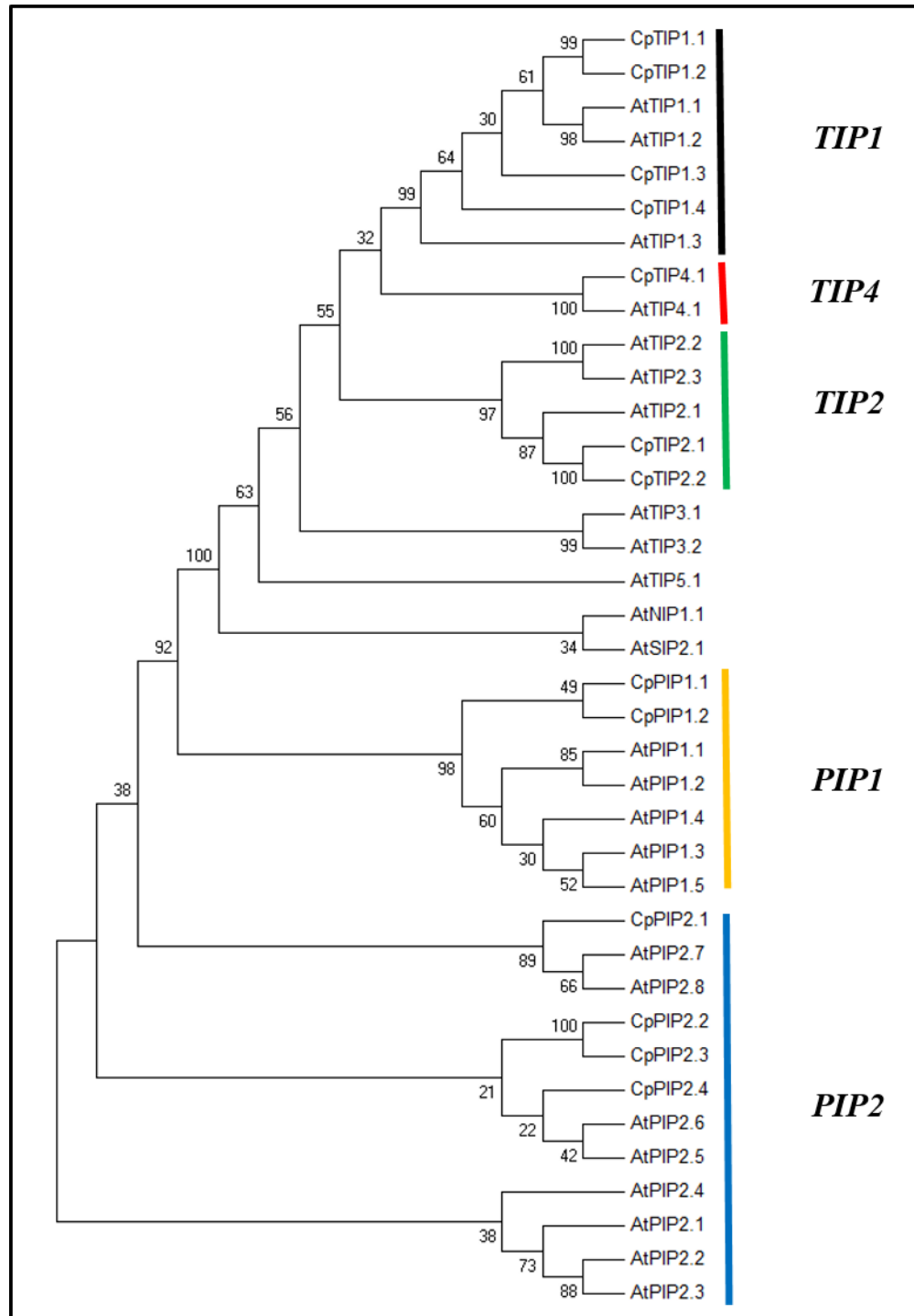


Fig. S1.

	H2	H5	LE1	LE2
CpPIP1.2	KCKSVGIQGIAMFEGMIFALVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKLSLTRLTFYIVMQPPLAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAIIFNKDLGWDDHW			
CpPIP1.1	KCSSVGIQGIAMFEGMIFALVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKLSLARALFYIVMQPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAIIVNRDHAWDDHW			
AtPIP1.5	MCASVGIQGIAMFEGMIFALVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKLSLTRLTFYIVMQPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAIIVNKKDHAWDDHW			
AtPIP1.1	MCASVGIQGIAMFEGMIFALVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKLSLTRLALFYIVMQPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAIIVNKKDHSWDDHW			
AtPIP1.2	MCASVGIQGIAMFEGMIFALVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKLSLTRLAVFYIVMQPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAIIFNKDHAWDDHW			
AtPIP1.3	MCASVGIQGIAMFEGMIFALVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKLSLTRLAVFYIVMQPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAIIVNKKDHAWDDHW			
AtPIP1.4	MCASVGIQGIAMFEGMIFALVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKLSLTRLAVFYIMQPILAPLPIGFAVFLVHLATIPITGTGINPARSLGAAIIVNKKDHSWDDHW			
AtPIP2.6	ACASVGLLGISMAFEGMIFILVYCTAGISGHINPAVTFGLFLASKVSLRAVSYVMAQPVLPAPLPIGFVFMNHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNKKAWDDQW			
CpPIP2.1	QCDGVGLGISMAFEGMIFILVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYMIAQPVLPAPLPIGFVFMNHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNKKIWDHWW			
AtPIP2.7	PCDGVGLLGISMAFEGMIFVLVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKVSLVRALGYMIAQPVLPAPLPIGFVFMNHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNNKAWDDQW			
AtPIP2.8	PCGGVGLLGISMAFEGMIFVLVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKVSLPRAVAYVMAQPVLPAPLPIGFVFMNHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNNKAWDDHW			
CpPIP2.2	QCGGVGLIGISMAFEGMIFVLVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKVSLIRALMYVMAQPVLPAPLPIGFVFMNHLATIPITGTGINPARSLGSVAVIYNKKAWDDHW			
CpPIP2.3	QCGGVGLIGISMAFEGMIFVLVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKVSLIRALMYVMAQPVLPAPLPIGFVFMNHLATIPITGTGINPARSLGSVAVIYNKKAWDDHW			
AtPIP2.5	QCTGVGLIGISMAFEGMIFILVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKVSLVRAMVYVMAQPVLPAPLPIGFAVFIHLATIPITGTGINPARSLGAAIIVNKKAWDDHW			
AtPIP2.4	DCGGVGLIGISMAFEGMIFVLVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKVSLVRLTVLYVIAQPVLPAPLPIGFVFMNHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNNKAWDDQW			
CpPIP2.4	-----MIFILVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAIMYVMAQPVLPAPLPIGFVFMNHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNGKDAWDDHW			
AtPIP2.1	DCGGVGLIGISMAFEGMIFILVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKVSLPRALLYIAQPVLPAPLPIGFVFMNHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNNKSKPWDDHW			
AtPIP2.2	DCGGVGLIGISMAFEGMIFILVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYVMAQPVLPAPLPIGFVFMNHLATIPITGTGINPARSFGAAVIYNNKSKPWDDHW			
AtPIP2.3	DCGGVGLIGISMAFEGMIFILVYCTAGISGHINPAVTFGLFLARKVSLIRAVLYVMAQPVLPAPLPIGFVFMNHLATIPITGTGINPARSFGAAVIFNKSKPWDDHW			
AtPIP5.1	VSGPFGLIPAIALNALSSSVYISWNVSGHVNPAVTFAMAVAGRISVPTAMFYNTSQLAVGPIFIFGVAGANVLAAGPFSGGSMNPACAFGSAVYVG---SFKNQ			
CpTIP4.1	ANPLVGLFVAVAAHALVAVVMISAGFRISGHLNPAVTLGLCVGGHITVRSILYFIQDGLGPLLTGLVVGANIMAGGAFSGASMNPARSFGPALVSG---NMTDHW			
AtTIP4.1	GNTLVGLFAVAVAHAFVAVVMISAG-HISGHLNPAVTLGLLGGHISVFRFLYNIQDGFGLLTGFVVGANILAGGAFSGASMNPARSFGPALVSG---NMTDHW			
AtTIP3.1	TNTPGGLILVALAHAFALFAAVSAAINWSGHVNPAVTFGALVGGRTAIRAIYYWIAQGIIAPLAIGLIVGANILVGGPFSGASMNPARAFGPALVGV---RNIHWW			
AtTIP3.2	TNTPGGLVLVALAHAFALFAAVSAAINWSGHVNPAVTFGALIGGRISVIRAIYYWIAQGIIAPLAIGLIVGANILVGGPFDCASMNPARAFGPALVGV---RNSNHW			
AtTIP1.3	PATPAGLVAASLSHAFALFVAVSVGANISGHVNPAVTFGAFIGGNIITLLRGILYWIAQGIIAPLAIGLIVGANILVGGAFDCASMNPARSFGPAVVS---IWTNHW			
AtTIP1.2	ATTPSGLVAAALAHAFGLFVAVSVGANISGHVNPAVTFGLVGGNITLLRGILYWIAQGIIAPLAIGFIVGANILAGGAFSGASMNPARSFGPAVVS---TWTNHW			
AtTIP1.1	ATTPSGLVAAVAHAFGLFVAVSVGANISGHVNPAVTFGAFIGGNIITLLRGILYWIAQGIIAPLAIGFIVGANILAGGAFSGASMNPARSFGPAVVS---TWTNHW			
CpTIP1.1	AATPAGLISASIAHAFALFVAVSVGANISGHVNPAVTFGAFVGGNITLLRGILYWIAQGIIAPLAIGFIVGANILAGGAFDCASMNPARSFGPAVVS---TWTNHW			
CpTIP1.2	AATPAGLISASIAHAFALFVAVSVGANISGHVNPAVTFGAFVGGNITLLRGILYWIAQGIIAPLAIGFIVGANILAGGAFDCASMNPARSFGPAVVS---TWTNHW			
CpTIP1.3	SSTPSGLVAAIAHAFALFVAVSVGANISGHVNPAVTFGAFVGGNITLLRGILYWIAQGIIAPLAIGFIVGANILAGGAFDCASMNPARSFGPAVVS---TWTNHW			
CpTIP1.4	AGTPAGLISASIAHAFALFVAVSVGANISGHVNPAVTFGAFVGGNITLLRSILYWIAQGIIAPLAIGFIVGANILAGGAFDCASMNPARSFGPAVVS---TWTNHW			
AtTIP2.2	ALDPAGLVAVAVAHAFALFVGVSIAANISGHLNPAVTLGLAVGGNITVITGFFYWIAQGIIAPLAIGFIVGANILAGGPFSGGSMNPARSFGPAVVS---DFSQIW			
AtTIP2.3	ALDPAGLVAVIAIAHAFALFVGVSIAANISGHLNPAVTLGLAVGGNITLITGFFYWIAQGIIAPLAIGFIVGANILAGGPFSGGSMNPARSFGPAVVS---DLSQIW			
CpTIP2.1	ALDPAGLVAVAVCHGAFALFVAVAVGANISGHVNPAVTFGLALGGQITILTGFYWIAQGVIAPIAIGFIVGANILAGGPFSGGSMNPARSFGPAVASG---DFAGNW			
CpTIP2.2	ALDPAGLVAVAVCHGAFALFVAVAVGANISGHVNPAVTFGLALGGQITILTGFYWIAQGVIAPIAIGFIVGANILAGGPFSGGSMNPARSFGPAVASG---DFAGNW			
AtTIP2.1	ALDTPGLVAIAVCHGAFALFVAVAIGANISGHVNPAVTFGLAVGGQITVITGVFYWIAQGTIAPLAIGLIVGANILAGGPFSGGSMNPARSFGPAVAAAG---DFSQHW			

Fig.S2.

Tabela 1. Conteúdo de clorofila *a* (CHL *a*) e Clorofila *b* (CHL *b*) em folhas de plantas jovens de *C. procera* sob condições de choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação (n=4±E.P). Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste T ou teste Mann-Whitney (p<0,05).

Tratamento	CHL <i>a</i> (g.kg ⁻¹ MS)		CHL <i>b</i> (g.kg ⁻¹ MS)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Controle	3,6 ± 0,19	4,5 ± 0,06	1,2 ± 0,08	1,4 ± 0,03
200 mM de NaCl	4,1 ± 0,24 ^{ns}	3,7 ± 0,07*	1,2 ± 0,05 ^{ns}	1,2 ± 0,02*

Tabela S1. Par de primers de genes de aquaporinas e genes normalizadores.

Gene	Número de acesso	Descrição	Sequência do primer (5'-3') (forward/reverse)	Tamanho do produto (pb)	Tm (°C)	Eficiência (%)
PIP1.1	DN144739_c0_g1_i1	Aquaporin PIP1	F: CCGAATGACCAAGCAATGCC R: TACAAGGAACCACCACCTGC	194	60,2 59,9	92,0
PIP1.2	DN74902_c1_g2_i1	Aquaporin PIP1	F: GCATTGTCTTCACGGTATATGC R: ACCACCAAGTAGTAATCAGGGC	162	59,9 59,8	93,6
PIP2.1	DN157061_c2_g5_i1	Aquaporin PIP2	F: AAAGGAGGGCTGAAACAGGG R: AAGGCATTGGGATCCTTCCG	182	59,9 60,0	99,0
PIP2.2	DN7709_c0_g1_i1	Aquaporin PIP2	F: AAAGGACTACCACGATCCGC R: CAAGAATACCAACACCGCCG	200	59,8 59,6	99,1
PIP2.3	DN12149_c0_g1_i1	Aquaporin PIP2	F: TTGTGGCCAAATGCACCATG R: GCAAATGAGCTTCAACCCGG	187	60,0 60,1	91,2
PIP2.4	DN61905_c1_g1_i1	Aquaporin PIP2	F: AAAGCCTGGGACGATCACTG R: TCCCAGAGCTTTCACGTGCTG	111	60,0 60,0	90,6
TIP1.1	DN197439_c9_g1_i1	Aquaporin TIP1	F: TCCATGTCCAGCTAACCACG R: GCGATTGGTTTCATCGTGGG	109	59,8 59,9	93,5
TIP1.2	DN99429_c5_g1_i1	Aquaporin TIP1	F: ACCATCCCGATGCACTCAAG R: ACGAAGAGTGCAAATGCGTG	169	60,1 59,8	100,0
TIP1.3	DN100226_c0_g4_i1	Aquaporin TIP1	F: GGTGCAAATATTCCGGCGG R: AAGCAAGCAACAACGGAACC	131	60,2 59,9	93,1
TIP1.4	DN88187_c1_g1_i2	Aquaporin TIP1	F: AAGGTAATGTGACCGCCGAC R: TAACGGACAATGGAGCAGGC	160	60,4 60,4	99,4
TIP2.1	DN37766_c0_g1_i1	Aquaporin TIP2	F: ACAAGAGGAGCGTGGTCATG R: GCAAATATCTTGGCTGCCGG	188	60,0 60,0	100
TIP2.2	DN26228_c0_g2_i1	Aquaporin TIP2	F: GCAAATATCTTGGCTGCCGG R: ACAAGAGGAGCGTGGTCATG	188	60,0 60,0	95,9
TIP4.1	DN56863_c0_g1_i1	Aquaporin TIP4	F: AGAGGCCCGACCAATAAAC R: AAGGTAACCTTGACGGGCTG	169	59,7 60,0	93,8
CYP23	TR24005 c1_g1_i8	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 23 isoform X2	F: CATGTTCAATCCAGTCGAAGTC R: ATCATCCTTACCAGCAACCAGT	119	59,6 59,9	100
ACT104	TR39342 c4_g5_i5	Actin-104	F: CACAATATGGCTGAGGGTGAG R: GAGCATCATCACCAGCAAATC	91	60,5 60,6	98
UBP25	TR43486 c0_g1_i2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 25	F: AATCACTTCTCTACCGCTCTC R: ATCAGAGGGAGGGTGCTATTG	138	60,0 60,5	100

Tm: Temperatura de melting

5 CONCLUSÃO

Este trabalho forneceu, pela primeira vez a seleção de genes de referência (RGs) candidatos para estudos da expressão gênica em *C. procera*. Além de indicar RGs mais confiáveis para 15 combinações de tempo sob três diferentes condições experimentais, incluindo dois órgãos vegetais e três concentrações de salinidade. Entre os 10 RGs avaliados, *CYP23* mostrou-se um importante candidato a RG para normalização da expressão de *C. procera* sob diferentes condições experimentais. Ao contrário de *UBP25* que deve ser evitado para a normalização da expressão gênica para condições de estresse salino de longa duração em folha de *C. procera*.

O estudo da fisiologia de *C. procera* sob choque salino mostrou que a alta salinidade provocou rápida resposta nos parâmetros fisiológicos de plantas jovens sob condições de casa de vegetação. Alta concentração de NaCl (200 mM) afeta a fotossíntese da espécie a curto prazo, mas pouco afeta seu nível de hidratação. *C. procera* utiliza metabólitos envolvidos nos processos de osmorregulação e osmoproteção para aclimação ao estresse osmótico, exibindo rápida regulação da dinâmica destes metabólitos no sistema radicular. A modulação temporal da expressão de aquaporinas *PIPs* e *TIPs* evidencia a plasticidade da permeabilidade de água do sistema radicular, para responder a redução na entrada de água e desidratação celular geradas pelo solo salinizado. Portanto, o acúmulo de carboidratos e aminoácidos associado a regulação da expressão de aquaporinas contribuem para a alta performance do sistema radicular e alívio do status hídrico foliar sob choque salino.

Neste contexto, este trabalho permitiu abranger o entendimento das respostas fisiológicas e moleculares de *C. procera* à salinidade, principalmente com relação as estratégias de manutenção do balanço hídrico por meio do sistema radicular fornecendo informações relevantes para o melhoramento genético de plantas do metabolismo C₃.

REFERÊNCIAS

- ADAMSKI, M. G.; GUMANN, P.; BAIRD, A. E.. A method for quantitative analysis of standard and high-throughput qpcr expression data based on input sample quantity. **PLoS One**, v.9, n. 8, ago. 2014.
- AGUIAR NETTO, A. D. O. et al.. Características químicas e salino-sodicidade dos solos do Perímetro Irrigado Califórnia, SE, Brasil. **Ciência Rural** v.37, n.6, p 1640-1635, nov. 2007.
- AI-HUA, X. et al.. Differential responses of water uptake pathways and expression of two aquaporin genes to water-deficit in rice seedlings of two genotypes. **Rice Science**, v.24, n. 4, p.187–197, jul. 2017.
- AKBARI, M. et al.. Ion homeostasis, osmoregulation, and physiological changes in the roots and leaves of pistachio rootstocks in response to salinity. **Protoplasma**, v. 255, n. 5, p.1349–1362, mar. 2018.
- ALMEIDA, I. V. B. D. et al.. Characterization and early selection of silk blossom (*Calotropis procera*) genotypes with forage potential. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 3, p. 794-801, jul. 2017.
- AN, J. et al.. Heterologous expression of *Panax ginseng* PgTIP1 Confers enhanced salt tolerance of soybean cotyledon hairy roots, composite, and whole plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, jul. 2017.
- AN, J. et al. The *Panax ginseng* PgTIP1 gene confers enhanced salt and drought tolerance to transgenic soybean plants by maintaining homeostasis of water, salt ions and ROS. **Environmental and Experimental Botany**, v. 155, p. 45–55, 1 nov. 2018.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 1 ago. 2004.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p.105-121, 2009.
- BARBOSA, N.; ALMEIDA-CORTEZ, J.; FERNANDES, G. Uma estranha na paisagem. **Ciência Hoje**, v. 41, jan. 2007.
- BARRS, H. D.; WEATHERLEY, P. E.. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian Journal Biology Sciences**. v.15, p.413–428, 1962.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D.. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205–207, ago. 1973.
- BEITZ, E. et al.. Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 2, p. 269-274, jan. 2006.
- BELLATI, J. et al. Intracellular pH sensing is altered by plasma membrane PIP aquaporin co-expression. **Plant Molecular Biology**, v. 74, n. 1–2, p. 105–118, set. 2010.
- BIASSONI, R.; RASO, A.. **Quantitative Real-Time PCR: methods and protocols**. 2. ed. New York: Humana Press, 2014, 235p.
- BIENERT, G. P. et al. A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes. **BMC biology**, v. 6, p. 26, 10 jun. 2008.
- BLUM, A.. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, p. 4–10, jan. 2017.
- BRADFORD, M. M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248–254, mai. 1976.

- BUI, E. N. Soil salinity: A neglected factor in plant ecology and biogeography. **Journal of Arid Environments**, v. 92, p. 14-25, mai. 2013.
- BUSTIN, S. A.. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 611–622, abr. 2009.
- CAB INTERNATIONAL. Forestry Compendium. **CABI**, 2005. Disponível em <<https://www.cabi.org/fc/about/>>. Acesso em 15 de jun. de 2019.
- CAMPBELL, G. S.; NORMAN, J. M.. **An introduction to environmental biophysics**. 2. ed. New York: Springer, 1998, 286 p.
- CHAUMONT, F.; MOSHELION, M.; DANIELS, M. J. Regulation of plant aquaporin activity. **Biology of the Cell**, v. 97, n. 10, p. 749-764, out. 2005.
- CHAUMONT, F.; TYERMAN, S. D. **Plant Aquaporins: from transport to signaling**. Cham, Switzerland: Springer. 2017, 353p.
- 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, n. 4, p. 551-560, fev. 2009.
- CHEN, H. et al.. A Nucleotide Metabolite controls stress-responsive gene expression and plant development. **PLoS One**, n.10, v.6, out. 2011.
- COLOMBO, R. et al.. Relaciones hídricas, fotosíntesis, y anatomía foliar de dos especies del género *Calotropis*. **Interciencia**, v. 32, n. 11, p. 791-796, nov. 2007.
- CSURHES, S. **Weed Risk Assessment: Calotrope–*Calotropis procera***. Biosecurity Queensland, Queensland Primary Industries and Fisheries: Brisbane, 2009, 17 p.
- CUSHMAN, J. C. Osmoregulation in plants: implications for agriculture. **American Zoologist**, v. 41, n. 4, p. 758-769, ago. 2001.
- DANIELS, M. J.; MIRKOV, T. E.; CHRISPEELS, M. J. The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. **Plant Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1325–1333, dez. 1994.
- D’ODORICO, P. et al.. Global desertification: drivers and feedbacks. **Advances in Water Resources**, v. 51, p. 326-344, jan. 2013.
- DE ANDRADE, L. M. et al.. Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. **Plant Methods**, v.13, abr. 2017.
- DEINLEIN, U. et al.. Plant salt-tolerance mechanisms. **Trends in plant science**, v. 19, n. 6, p. 371-379, jun. 2014.
- DREYER, I.; UOZUMI, N..Potassium channels in plant cells. **FEBS Journal**, v. 278, p.4293–4303, nov. 2011.
- DUBOIS, M. et al.. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350–356, 1956.
- EGAN, A. N.; SCHLUETER, J.; SPOONER, D. M.. Applications of next-generation sequencing in plant biology. **American Journal of Botany**, v.99, p.175–185, fev. 2012.
- ENGEL, A.; FUJIYOSHI, Y.; AGRE, P. The importance of aquaporin water channel protein structures. **The EMBO journal**, v. 19, n. 5, p. 800-806, mar. 2000.
- EVELIN, H.; KAPOOR, R.; GIRI, B.. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. **Annals of Botany**, v.104, p.1263–1280, dez. 2009.

- FABRICANTE, J. R.; DE OLIVEIRA, M. N. A.; DE SIQUEIRA-FILHO, J. A. Aspectos da ecologia de *Calotropis procera* (Apocynaceae) em uma área de Caatinga alterada pelas obras do Projeto de Integração do Rio São Francisco em Mauriti, CE. **Rodriguésia**, v. 64, n. 3, p. 647-654, 2013.
- FENG, Z. J. et al.. Identification of the AQP members involved in abiotic stress responses from *Arabidopsis*. **Gene**, v. 646, p. 64-73, mar. 2018.
- FERNIE, A.; USADEL, B. The plant transcriptome—from integrating observations to models. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, mar. 2013.
- FLEXAS, J. et al.. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C₃ plants. **Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 269-279, mai. 2004.
- FLEXAS, J. et al.. Mesophyll conductance to CO₂ and Rubisco as targets for improving intrinsic water use efficiency in C₃ plants. **Plant Cell & Environmental**. v.39, p.965-982, mai. 2016.
- FLOWERS, T. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 307-319, fev. 2004.
- FOREMAN, D. et al.. A modification of the Roe procedure for determination of fructose in tissues with increased specificity. **Analytical Biochemistry**, v.56, p.584-590, dez. 1973.
- FORREST, K. L.; BHAVE, M. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. **Functional & Integrative Genomics**, v. 7, n. 4, p. 263, out. 2007.
- FOX, A. R.; MAISTRIAUX, L. C.; CHAUMONT, F.. Toward understanding of the high number of plant aquaporin isoforms and multiple regulation mechanisms. **Plant Science**, v.264, p.179-187, nov. 2017.
- FROSI, G. et al. Ecophysiological performance of *Calotropis procera*: an exotic and evergreen species in Caatinga, Brazilian semi-arid. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 2, p. 335-344, 2013.
- FU, D. et al.. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. **Science**, v. 290, n. 5491, p. 481- 486, out. 2000.
- GALLEGOS-OLEA, R. et al.. Flavonóides de *Calotropis procera* R. Br.(Asclepiadaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v., n. 29-33, fev. 2008.
- GASPAR, M. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, n. 4, p. 481- 491, out. 2011.
- GOMES, D. et al.. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1788, n. 6, p. 1213 -1228, jun. 2009.
- GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**. v.17: 333-351, mai. 2016.
- GRABHERR, M. G. et al.. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nature Biotechnology**., v.29, p.644-652, jul. 2011.
- GUÉNIN, S. et al. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p. 487-493, fev. 2009.
- GUPTA, A. B.; SANKARARAMAKRISHNAN, R.. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. **BMC Plant Biology**, v. 9, n. 1, p. 134, nov. 2009.
- GUTIERREZ, L. et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, n. 6, p. 609-618, ago. 2008.

- HAAS, B. J; ZODY M.C. Advancing RNA-seq analysis. **Nature Biotechnology**, v.28, p.421–423, mai. 2010.
- HAAS, B. J.et al.. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**., v.8, p.1494–1512, jul. 2013.
- HACHEZ, C.; ZELAZNY, E.; CHAUMONT, F.. Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions? **Biochimica et Biophysica Acta** ,v.1758, p.1142–1156, ago. 2006.
- HANIN, M. et al.. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1787, nov. 2016.
- HASSAN, L. M. et al.. The biology of *Calotropis procera* (Aiton) WT. **Trees**, v. 29, n. 2, p. 311-320, abr. 2015.
- HELLEMANS, J. et al.. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v.8, fev. 2007.
- HOSSAIN, M. M.; LAM, H. M.; ZHANG, J.. Responses in gas exchange and water status between drought-tolerant and -susceptible soybean genotypes with ABA application. **The Crop Journal**, v. 3, p. 500–506, dez. 2015.
- HUB, J.S.; DE GROOT, B.L. Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 4, p. 1198-1203, jan. 2008.
- HUBER, W. et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. **Nature Methods**, v.12, p.115–121, fev. 2015.
- HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, v. 6, n. 4, p. 279–284, jun. 2005.
- HUSSAAN, M. et al.. Microwave-assisted enhancement of milkweed (*Calotropis procera* L.) leaves as an eco-friendly source of natural colorants for textile. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 5, p. 5089-5094, fev. 2017.
- HUSSAIN, S. S. et al. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants via protective proteins and aquaporins. **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 3, p. 401–413, set. 2011.
- HUSSEIN, H. I. et al.. Uscharin, the most potent molluscicidal compound tested against land snails. **Journal of chemical ecology**, v. 20, n. 1, p. 135-140, jan. 1994.
- HUSSEY, P. J.; KETELAAR, T.; DEEKS, M.J.. Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.109–125, fev. 2006.
- IMAI, T. et al.. Evaluation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in *Pyrus pyrifolia* using different tissue samples and seasonal conditions. **PLoS One**, v.9, 2014.
- JAIN M. Next-generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. **Briefings in Functional Genomics**,v.11, p. 63–70, jan. 2012.
- JAVOT, H.; MAUREL, C.. The role of aquaporins in root water uptake. **Annals of Botany**, v. 90, p. 301–313, set. 2002.
- JI, H. et al.. The salt overly sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. **Molecular Plant**, v. 6, p. 275–286, mar. 2013.
- JOHANSSON, I. et al.. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1465, p. 324–342, mai. 2000.

- JOHANSON, U. et al.. The Complete set of genes encoding major *intrinsic proteins in Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. **Plant Physiology**, v.126, p.1358–1369, set. 2001.
- JUNG, J. S. et al.. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 20, p. 14648–14654, mai. 1994.
- KANAKACHARI, M. et al.. Evaluation of suitable reference genes for normalization of qPCR gene expression studies in brinjal (*Solanum melongena* L.) during fruit developmental stages. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 433–450, fev. 2016.
- KAPILAN, R.; VAZIRI, M.; ZWIAZEK, J. J. Regulation of aquaporins in plants under stress. **Biological Research**, v. 51, n. 1, p. 4, 16 jan. 2018.
- KHAN, R. et al.. Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 6, p. 2233–2239, dez. 2007.
- KOCH, I et al. Apocynaceae in lista de espécies da flora do Brasil. **Reflora**, 2015.
Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB80340>>. Acesso em 10 de mar. de 2019.
- KOEVOETS, I. T. et al.. Roots Withstanding their environment: exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v.7, ago. 2016.
- KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, v.54, n. 4, p.391–406, set. 2013.
- KWON, C. W. et al.. Cysteine Protease Profiles of the Medicinal Plant *Calotropis procera* R. Br. revealed by de novo transcriptome analysis. **PLoS One**, v.10, n. 3, mar. 2015.
- KUMAR, V.; ARYA, S. Medicinal uses and pharmacological properties of *Calotropis procera*. **Recent progress in medicinal plants**. Houston, EUA: Studium Press, 2006, 373–388 p.
- LI, B.; DEWEY, C. N.. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v.12, ago. 2011.
- LI, G.; SANTONI, V.; MAUREL, C. Plant aquaporins: Roles in plant physiology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Aquaporins. v. 1840, n. 5, p. 1574–1582, mai. 2014.
- LI, R. et al. Plasma Membrane Intrinsic Proteins SIIP2;1, SIIP2;7 and SIIP2;5 Conferring Enhanced Drought Stress Tolerance in Tomato. **Scientific Reports**, v. 6, 22 ago. 2016.
- LI, X. S. et al.. Reference gene selection in the desert plant *Eremosparton songoricum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.6944–6963, jun. 2012.
- LICHTENTHALER, H. K; BUSCHMANN, C.. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. p.1–8, nov. 2001.
- LIU, C., et al.. Differential expression of ion transporters and aquaporins in leaves may contribute to different salt tolerance in *Malus* species. **Plant Physiology and Biochemical**, v.58, p.159–165, set. 2012.
- LIU, P. et al.. Enhanced root hydraulic conductance by aquaporin regulation accounts for silicon alleviated salt-induced osmotic stress in *Sorghum bicolor* L. **Environmental and Experimental Botany**. v. 111, p. 42–51, mar. 2015.
- LYZENGA, W. J.; STONE, S. L.. Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 599–616, jan. 2012.
- MAESHIMA, M.; ISHIKAWA, F. ER membrane aquaporins in plants. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 456, n. 4, p. 709–716, jul. 2008.

- MANSOUR, M. M. F.; ALI, E. F. Evaluation of proline functions in saline conditions. **Phytochemistry**, v. 140, n. 52-68, ago. 2017.
- MARTÍNEZ-NOËL, G. M.; TOGNETTI, J. A. Sugar Signaling Under Abiotic Stress in Plants. In: **Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress**. Academic Press, Elsevier, 2018, 397-406 p.
- MARTINS, C. P. S. et al.. Expression of the citrus *CsTIP2;1* gene improves tobacco plant growth, antioxidant capacity and physiological adaptation under stress conditions. **Planta**, p. 245, p.951–963, mai. 2017.
- MARTINS, P. K. et al. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-26, jun. 2016.
- MAUREL, C. Aquaporins and water permeability of plant membranes. **Annu Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.** v.48, p.399–429, jun.1997.
- MAUREL, C. et al.. Molecular physiology of aquaporins in plants. **International Review of Cytology**, v.215, p.105-148, 2002.
- MAUREL, C. et al.. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. **Annual of Review Plant Biology**., v. 59, p. 595-624, jun. 2008.
- MAUREL, C. et al.. The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 6, p. 690–698, dez. 2009.
- MAUREL, C. et al.. Aquaporins in Plants. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 4, p. 1321–1358, set. 2015.
- MEKAWY, A. M. M. et al.. Growth, physiological adaptation, and gene expression analysis of two Egyptian rice cultivars under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.87, p.17–25, fev. 2015.
- METZKER, M. L.. Sequencing technologies - the next generation. **Nature Reviews Genetics**.,v.11, p.31–46, jan. 2010.
- MILLER, G. et al.. The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. **Science Signaling**., v.2, ago. 2009.
- MOORE, S., STEIN, W.H.. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. **Journal of Biological Chemistry**. v.176, p.367–388, 1948.
- MOSHELION, M. et al.. Role of aquaporins in determining transpiration and photosynthesis in water-stressed plants: crop water-use efficiency, growth and yield. **Plant Cell & Environmental**, v. 38, n. 9, p. 1785-1793, set. 2015.
- MUEEN, A.; RANA, A.; DIXIT, V.. *Calotropis* Species (Asclepiaceae)-A Comprehensive Review. **Pharmacognosy Magazine**, v. 1, n. 2, p. 48, jan. 2005.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 239-250, mar. 2002.
- MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651-681, fev. 2008.
- MUNNS, R.; GILLIHAM, M. Salinity tolerance of crops—what is the cost? **New phytologist**, v. 208, n. 3, p. 668-673, nov. 2015.
- MUNNS, R. et al. Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. **Functional Plant Biology**, v.43, p.1103–1113, jan. 2016.
- MUTWAKIL, M. Z. et al.. Transcriptomic and metabolic responses of *Calotropis procera* to salt and drought stress. **BMC Plant Biology**, v. 17, dez. 2017.

NADA, R. M.; ABOGADALLAH, G. M. Aquaporins are major determinants of water use efficiency of rice plants in the field. **Plant Science**, v. 227, p. 165–180, out. 2014.

NEGRÃO, S.; SCHMÖCKEL, S.; TESTER, M. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. **Annals of Botany**, v. 119, n. 1, p. 1-11, jan. 2017.

NIU, K.; SHI, Y.; MA, H. Selection of candidate reference genes for gene expression analysis in kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) under abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, fev. 2017.

NOUNJAN, N. et al. High performance of photosynthesis and osmotic adjustment are associated with salt tolerance ability in rice carrying drought tolerance QTL: physiological and co-expression network analysis. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, ago. 2018.

OZSOLAK, F.; MILOS, P. M.. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature Reviews Genetics**, v.12, p.87–98, fev. 2011.

PANDEY, A. et al. Transcriptome and metabolite analysis reveal candidate genes of the cardiac glycoside biosynthetic pathway from *Calotropis procera*. **Scientific Reports**, v.6, out. 2016.

PEDROTTI, A. et al.. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 1308-1324, mai. 2015.

PENG, Y. et al.. Overexpression of a *Panax ginseng* tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. **Planta**, v.226, p.729–740, ago. 2007.

PFAFFL, M. W.. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n. 9, mai. 2001.

PFAFFL, M. W., HORGAN, G.W., DEMPFLER, L.. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, mai. 2002.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509–515, mar. 2004.

POU, A., et al.. Salinity-mediated transcriptional and post-translational regulation of the *Arabidopsis* aquaporin PIP2;7. **Plant Molecular Biology**, v.92, n. 6, p.731–744, dez. 2016.

PURANIK, S. et al.. Comprehensive genome-wide survey, genomic constitution and expression profiling of the NAC transcription factor family in foxtail millet (*Setaria italica* L.). **PLoS One**, v.8, n. 5, mai. 2013.

QADIR, M. et al.. Economics of salt-induced land degradation and restoration. **Natural Resources Forum**, v. 38, n. 4, p.282-295, out. 2014.

RABHI, M. et al.. Photosynthetic responses to salinity in two obligate halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Tecticornia indica*. **South African Journal of Botany**, v. 79, p.39–47, mar. 2012.

RAHMAN, M.; WILCOCK, C. A taxonomic revision of *Calotropis* (Asclepiadaceae). **Nordic Journal of Botany**, v. 11, n. 3, p. 301-308, jul. 1991.

RAMADAN, A. et al. Metabolomic response of *Calotropis procera* growing in the desert to changes in water availability. **PLoS One**, v.9, fev. 2014.

RANGEL, E. D. S.; NASCIMENTO, M. T. Ocorrência de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.(Apocynaceae) como espécie invasora de restinga. **Acta Botânica Brasilica**, v. 25, n. 3, p. 657-663, set. 2011.

RASMUSSEN, R.. Quantification on the LightCycler. In: **Rapid cycle real-time PCR: methods and applications**. Berlin Heidelberg: Springer, 2001.

REDONDO-GÓMEZ, S. et al.. Salt stimulation of growth and photosynthesis in an extreme halophyte, *Arthrocnemum macrostachyum*. **Plant Biology**, v. 12, n. 1, p.79–87, jan. 2010.

RIVAS, R. C. D. A. S. **Ecofisiologia e anatomia de *Calotropis procera* sob estresse abiótico**. 2016. 117f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

RIVAS, R. et al.. Photosynthetic limitation and mechanisms of photoprotection under drought and recovery of *Calotropis procera*, an evergreen C₃ from arid regions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, n. 589-599, set. 2017.

ROBBINS, N. E.; DINNENY, J. R. The divining root: moisture-driven responses of roots at the micro-and macro-scale. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 8, p. 2145-2154, abr. 2015.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K.. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v.26, n. 1, p.139–140, jan. 2010.

RODRÍGUEZ-GAMIR, J. et al.. Aquaporin regulation in roots controls plant hydraulic conductance, stomatal conductance, and leaf water potential in *Pinus radiata* under water stress. **Plant, Cell & Environment**, v.42, n. 2, p.717–729, fev. 2019.

ROY, S. J.; NEGRÃO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p.115-124, abr. 2014.

ROZEMA, J., SCHAT, H.. Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. **Environmental and Experimental Botany** v. 92, p.83–95, ago. 2013.

RUIZ-LOZANO, J.M. et al.. Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 11, p. 4033-4044, jun. 2012.

SAMI, F. et al.. Role of sugars under abiotic stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 54-61, dez. 2016.

SECCHI, F., PAGLIARANI, C., ZWIENIECKI, M. A.. The functional role of xylem parenchyma cells and aquaporins during recovery from severe water stress. **Plant Cell & Environment**, v. 40, n.6, p.858– 871, jun. 2017.

SHAO, H.; WANG, H.; TANG, X.. NAC transcription factors in plant multiple abiotic stress responses: progress and prospects. **Frontiers Plant Science**, v.6, out. 2015.

SHAVRUKOV, Y. Salt stress or salt shock: which genes are we studying? **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 1, p. 119-127, jan. 2013.

SHI, J. et al.. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.11, n. 12, p. 2393–2405, dez. 1999.

SHIVHARE, R.; LATA, C. Selection of suitable reference genes for assessing gene expression in pearl millet under different abiotic stresses and their combinations. **Scientific Reports**, v. 6, mar. 2016.

SHOKRY, A. M. et al. Detection of a Usp-like gene in *Calotropis procera* plant from the de novo assembled genome contigs of the high-throughput sequencing dataset. **Comptes Rendus Biologies**, v.337, n. 2, p.86–94, fev. 2014.

SIEFRITZ, F. et al. PIP1 Plasma Membrane Aquaporins in tobacco: From Cellular Effects to Function in Plants. **The Plant Cell**, v. 14, n. 4, p. 869–876, abr. 2002.

SILVA, M. C. C. et al.. Therapeutic and biological activities of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 4, p. 332-336, abr. 2010.

- SILVEIRA, J. A. G. et al.. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 1, p. 1-8, abr. 2009.
- SINGH, V. et al. Evaluation and Selection of Candidate Reference Genes for Normalization of Quantitative RT-PCR in *Withania somnifera* (L.) Dunal. **PLoS One**, v. 10, n. 3, mar. 2015.
- SINHA, P. et al.. Evaluation and validation of housekeeping genes as reference for gene expression studies in pigeonpea (*Cajanus cajan*) under drought stress conditions. **PLoS One**, v. 10, n. 4, abr. 2015.
- SKORUPA-KŁAPUT, M. et al.. The expression patterns of plasma membrane aquaporins in leaves of sugar beet and its halophyte relative, *Beta vulgaris* ssp. *maritima*, in response to salt stress. **Biologia**, v. 70, n. 4, p. 467–477, mai. 2015.
- SLAMA, I. et al.. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. **Annals of Botany**, v. 115, n. 3, p. 433-447, jan. 2015.
- STEPIEN, P., JOHNSON, G. N.. Contrasting responses of photosynthesis to salt stress in the glycophyte *Arabidopsis* and the halophyte *Thellungiella*: role of the plastid terminal oxidase as an alternative electron sink. **Plant Physiology**, v. 149, p.1154–1165, fev. 2009.
- STONE, S. L.. The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling. **Frontiers in Plant Science**, v.5, abr. 2014.
- SUN, Y. G. et al.. Ectopic expression of *Arabidopsis* glycosyltransferase UGT85A5 enhances salt stress tolerance in tobacco. **PLoS One**, v.8, n. 3, mar. 2013.
- SZABADOS, L.; SAVOURE, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 89-97, fev. 2010.
- TAÏBI, K. et al.. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 306-312, jul. 2016.
- TAMURA, K. et al.. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology Evolution**, v.24, n. 8, p.1596–1599, ago. 2007.
- TANIRA, M. et al.. Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, n. 3, p. 201-205, fev. 1994.
- TEZARA, W. et al.. Water relations and photosynthetic capacity of two species of *Calotropis* in a tropical semi-arid ecosystem. **Annals of Botany**, v. 107, n. 3, p. 397- 405, mar. 2011.
- THOMAS, R. L.; SHEARD, R. W.; MOYER, J. R.. Comparison of conventional and automated procedures for nitrogen, phosphorus, and potassium analysis of plant material using a single digestion 1. **Agronomy Journal**, v. 59, n. 3, p.240–243, mai. 1967.
- TRIVELLINI, A. et al.. Survive or die? A molecular insight into salt-dependant signaling network. **Environmental and Experimental Botany**, v. 132, p.140–153, dez. 2016.
- V PATANKAR, H. et al. Identification of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Subjected to Drought and Salinity. **PloS One**, v. 11, n. 11, nov. 2016.
- VAN HANDEL, E.. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v.22, n. 2, p.280–283, fev. 1968.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, jun. 2002.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v.35, n. 4, p.753–759, nov. 2008.

VITALI, V. et al. Root hydraulic conductivity and adjustments in stomatal conductance: hydraulic strategy in response to salt stress in a halotolerant species. **AoB PLANTS**, v. 7, nov. 2015.

VOGT, K. **A field worker's guide to the identification, propagation and uses of common trees and shrubs of dryland Sudan**. UK: SOS Sahel International, 1996, 167p.

WALLACE, I. S.; ROBERTS, D. M. Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. **Plant Physiology**, v. 135, n. 2, p. 1059-1068, jun. 2004.

WALLACE, I. S.; CHOI, W.G.; ROBERTS, D. M. The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, Aquaporins**. v. 1758, n. 8, p. 1165–1175, ago. 2006.

WANG, P.; HEITMAN, J. .The cyclophilins. **Genome Biology**, v.6, n. 7, jun. 2005.

WANG Z.; GERSTEIN M.; SNYDER M.. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v.10, n. 1, p.57–63, jan. 2009.

WICKE, B. et al.. The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 8, p. 2669-2681, jan. 2011.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1-23, 2010.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, n. 1, p. 75–85, jul. 2005.

WUNGRAMPHA, S. et al.. Photosynthesis and salinity: are these mutually exclusive? **Photosynthetica**, v.56, n.1, p.366–381, mar. 2018.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W. R.. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. **Plant Cell**, v.20, n. 7, p.1736–1737, ago. 2008.

XIAO, X. et al. Validation of suitable reference genes for gene expression analysis in the halophyte *Salicornia europaea* by real-time quantitative PCR. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, jan. 2015.

XIN, S. et al.. Expression of tomato *SITIP2;2* enhances the tolerance to salt stress in the transgenic *Arabidopsis* and interacts with target proteins. **Journal of Plant Research**, v.127, n. 6, p.695–708, nov. 2014.

YANG, Z. et al.. Identification and validation of reference genes for quantification of target gene expression with quantitative real-time PCR for tall fescue under four abiotic stresses. **PLoS One**, v.10, n. 3, mar. 2015.

ZHANG, S. et al. Selection of suitable reference genes for quantitative RT-PCR normalization in the halophyte *Halostachys caspica* under salt and drought stress. **Scientific Reports**, v. 6, ago. 2016.

ZHANG, Y. et al. Selection of suitable reference genes for quantitative real-time PCR gene expression analysis in *Salix matsudana* under different abiotic stresses. **Scientific Reports**, v. 7, jan. 2017.

ZHAO, C. X.; SHAO, H. B.; CHU, L. Y. Aquaporin structure-function relationships: water flow through plant living cells. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 62, n. 2, p. 163–172, abr. 2008.

ZHOU, L. et al.. Constitutive overexpression of soybean plasma membrane intrinsic protein *GmPIP1;6* confers salt tolerance. **BMC Plant Biology**, v.14, n. 1, jul. 2014.

ZHUANG, H. et al. Selection of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR in *Oxytropis ochrocephala* Bunge using transcriptome datasets under abiotic stress treatments. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, jun. 2015.

ANEXO A - NORMAS DO PERIÓDICO PLOS ONE



Style and Format
 Manuscript Organization
 Parts of a Submission
 Additional Information
 Requested at Submission
 Guidelines for Specific Study
 Types
 Give Feedback

Submission Guidelines

Related information for authors

- > [Submission system](#)
- > [Journal scope and publication criteria](#)
- > [Getting started guide](#)
- > [Guidelines for revisions](#)
- > [Publication fees](#)

Style and Format

File format Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, or RTF. Microsoft Word documents should not be locked or protected.

LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. [Read the LaTeX guidelines](#)

Style and Format

File format

Length

Font

Headings

Layout and spacing

Page and line numbers

Footnotes

Language

Abbreviations

Reference style

Equations

Nomenclature

Manuscript Organization

Parts of a Submission

Additional Information

Requested at Submission

Guidelines for Specific Study
 Types

Give Feedback

Length

Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information.

We encourage you to present and discuss your findings concisely.

Font

Use a standard font size and any standard font, except for the font named "Symbol". To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.

Headings

Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.

Layout and spacing

Manuscript text should be double-spaced.

Do not format text in multiple columns.

Page and line numbers

Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).

Footnotes

Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.

Language

Manuscripts must be submitted in English.

You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. [Read the supporting information guidelines](#)

ANEXO B - NORMAS DO PERIÓDICO JOURNAL PLANT PHYSIOLOGY



JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY

Mechanisms of Plant Function: from Molecular to Ecosystem Scales

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0176-1617

DESCRIPTION

The *Journal of Plant Physiology* is a broad-spectrum journal that welcomes high-quality submissions in all major areas of **plant physiology**, including **plant biochemistry**, **functional biotechnology** and **molecular biology**; **growth and development**, **photosynthesis and respiration**, **metabolic pathways**, **transport and translocation**, and **plant responses to biotic and abiotic stress**. Studies are welcome at all levels of integration ranging from molecules and cells to organisms and their environments and are expected to use state-of-the-art methodologies. Therefore pure gene expression studies are not within the focus of our journal. To be considered for publication, papers must significantly contribute to the mechanistic understanding of physiological processes, and not be merely descriptive, or confirmative of previous results. We encourage the submission of papers that explore the physiology of non-model species as well as accepted model species and those that bridge basic and applied research. For instance, studies on agricultural plants that show new physiological mechanisms to improve agricultural efficiency are welcome. Studies performed under uncontrolled situations (field conditions) will not be considered for publication.

The *Journal of Plant Physiology* publishes several types of articles: Original Research Articles, Reviews, Perspectives Articles, and Short Communications. While Reviews and Perspectives papers are usually invited by an editor, we also welcome proposals for such manuscripts on topics of high current interest to the physiology community. Original research papers comprise the majority of published contributions.

Founded in 1909, with roots tracing back to 1818, the *Journal of Plant Physiology* has consistently published landmark papers in plant physiology, and is one of the world's oldest international journals in the botanical sciences.