



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

LAÍS LUANA DE LIMA

**INFLUÊNCIA DO RITMO CIRCADIANO NA FISIOLOGIA E EXPRESSÃO  
GÊNICA DE *Cenostigma pyramidale* SOB SALINIDADE**

Recife  
2020

LAÍS LUANA DE LIMA

**INFLUÊNCIA DO RITMO CIRCADIANO NA FISIOLOGIA E EXPRESSÃO  
GÊNICA DE *Cenostigma pyramidale* SOB SALINIDADE**

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.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos

Recife

2020

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB4/1

Lima, Laís Luana de

Influência do ritmo circadiano na fisiologia e expressão gênica de *Cenostigma pyramidale* sob salinidade / Laís Luana de Lima – 2020.

125 f.: 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, 2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Fabaceae 2. Expressão gênica 3. Estresse (Fisiologia) I. Santos, Mauro Guida dos (orient.) II. Título

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-172

**LAÍS LUANA DE LIMA**

**INFLUÊNCIA DO RITMO CIRCADIANO NA FISIOLOGIA E EXPRESSÃO  
GÊNICA DE *Cenostigma pyramidale* SOB SALINIDADE**

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.

19/02/2020

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos – UFPE

---

Prof. Dr. Marcus Vinícius Loss Sperandio – UFRPE

---

Prof. Dr. Marciel Teixeira de Oliveira – UFPE

---

Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto – UFPE

---

Dr. João Pacífico Bezerra Neto - UFPE

Recife

2020

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade em realizar esse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos pelo comprometimento para que esse trabalho caminhasse da melhor forma possível, além do apoio e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Marciel Teixeira de Oliveira pela disponibilidade em ajudar sempre que possível. Nunca medindo esforços para deixar o laboratório com as melhores condições de trabalho.

À professora Profa. Dra. Ana Maria Benko e o Prof. Dr. Kido por abrir as portas de seus laboratórios para que análises moleculares fossem realizadas.

À professora Profa. Dra. Valesca Pandolfi pela dedicação em nos acompanhar na aprendizagem nas análises moleculares.

À professora Profa. Dra. Gabriella Frosi, pela vasta contribuição no andamento desse projeto. Sempre disposta a ajudar é sem dúvida um exemplo de dedicação e profissionalismo. Obrigada por todo suporte e pela amizade.

Às Dras. Rebeca Rivas e Maria Reis, por todo suporte no laboratório de biologia molecular, além dos momentos descontração dentro dos laboratórios em que frequentamos por longas jornadas.

A todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia Vegetal, que foram fundamentais para a realização desse trabalho. Que não mediram esforços em ajudar quando requisitados, especialmente a Rafaela Ferreira que me acompanho do começo ao fim nas análises da bancada. Sempre com muita dedicação e comprometimento. Gratidão.

A toda equipe dos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal (LGBV), Biologia Vegetal (LGM) e Citogenética Vegetal, da UFPE pelo suporte nos mais diferentes momentos e que sempre se mostraram solícitos nos momentos que precisei.

Ao Laboratório de Química do Solo (UFRPE) por disponibilizar seu espaço e equipamentos para realização das nossas análises.

A FACEPE por conceder a bolsa de estudos. Recurso fundamental para que eu pudesse me dedicar a esse trabalho.

Aos amigos do doutorado (Turma 2020), por dividir todas as dores e delícias dessa jornada. Gostaria de agradecer especialmente ao Bruno Lustosa, Fernando Sena, Lucas Costa, Silvia Caroline e Silvia Santos que me “socorreram” sempre que necessário e promoverem ótimos momentos de descontração e amizade.

Aos amigos da vida por todo apoio emocional durante a realização do doutorado e pela compreensão, por não está presente em vários momentos devido a dedicação a esse trabalho. Gostaria de agradecer especialmente a Aline Magalhães, Camila Melo, Jacqueline Boulitreau, Ana Laura Dutra, Ana Clara Magalhães, Nathalia Bandeira, Maurílio Figueiredo, Gustavo Araújo, Juliana Pereira, Virgínia Svedese, Jhinny Almeida e Rair Menezes. Gratidão por tudo, vocês são incríveis.

Ao meu namorado, Diego César Nunes, um exemplo de companheirismo, amizade e paciência. Que não mediu esforço para que esse trabalho fosse concluído. Sempre com palavras de suporte e positividade, não me deixando esmorecer mesmo quando eu ficava desesperada (e foram muitos momentos de desespero). Muito obrigada por tudo!

Aos meus familiares por todo apoio, cuidado e amor. Especialmente aos meus pais, Marinalva e Luiz, a minha irmã Juliana e a minha prima Júlia que sempre estiveram comigo em todos os momentos e que nunca hesitaram em me ajudar no que fosse necessário.

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

## RESUMO

Ritmos circadianos são “marca-passos” endógenos que permite que os organismos se antecipem as mudanças diárias. Em plantas, informações sobre a base molecular para esse sistema já se encontra bem descrito, inclusive no seu envolvimento na tolerância a diferentes tipos de estresse abiótico. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar respostas fisiológicas e moleculares de plantas jovens de *Cenostigma pyramidale* sob salinidade e como o ritmo circadiano influencia essas respostas. Em diferentes momentos do dia (manhã e início da noite) foi aplicado o choque salino e avaliado os perfis metabólicos desencadeados. Nos dois conjuntos experimentais as plantas acumularam altas quantidades de Na<sup>+</sup>, em relação ao controle, em seus tecidos foliares e foram capazes diminuir essa concentração até o fim do experimento. Sugerindo que essa espécie se utiliza da recirculação de Na<sup>+</sup> para tolerar o estresse. Em seu metabolismo, no geral, as plantas apresentaram ciclos diurnos em relação ao amido, prolina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As plantas submetidas ao choque salino no início da manhã demonstraram maiores alterações em sua homeostase, pelo maior acúmulo de peróxido de hidrogênio e MDA, e um maior investimento em prolina. Quando se levou em consideração o tempo de aplicação do estresse, em tecido radicular, as plantas submetidas ao estresse salino no início da manhã, foi observado que à medida que aumentava o tempo de exposição ao estresse também ocorreu o aumento nos teores de prolina. No entanto, ocorreu a diminuição nas concentrações de MDA. Os dados indicaram que a alta salinidade promove respostas rápidas nos parâmetros fisiológicos de plantas de *C. pyramidale* sob condições de casa de vegetação, principalmente no sistema radicular. Informações *in silico* baseadas na análise do transcriptoma radicular de *C. pyramidale* sob salinidade (100 mM) em diferentes tempos de estresse, demonstraram que o sal estresse afetou a expressão de componentes do relógio circadiano. Houve indução de *Gigantea*, após 30 min e 2h de aplicação do estresse, com sua repressão no estresse máximo (após 11 dias sob salinidade). *ELF4* (*Early Flowering 4*), um gene relatado na literatura com expressão noturna e essencial para a ritmicidade, também apresentou expressão diferencial, estando reprimido no estresse máximo.

**Palavras-chave:** Relógio circadiano; trocas gasosas; solutos osmóticos; peroxidação lipídica; recirculação de sódio; expressão gênica; *ELF4*; *Gigantea*.

## ABSTRACT

Circadian rhythms are endogenous “pacemakers” that allow organisms to anticipate daily changes. In plants, information on the molecular base for this system is already well described, including its role in the tolerance to different types of abiotic stress. The present work aimed to characterize the physiological and molecular responses of young plants *Cenostigma pyramidale* under salinity, and how the circadian rhythm influences these responses. At different times of the day (morning and early evening) a salt shock was applied and the triggered metabolic profiles were evaluated. In the two experimental sets, the plants accumulated high amounts of  $\text{Na}^+$  in their leaf tissues in relation to the control and were able to decrease this concentration until the end of the experiment, suggesting that this species employs  $\text{Na}^+$  recirculation in order to tolerate stress. In their metabolism, the plants generally presented daytime cycles in relation to starch, proline, and  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The plants subjected to the salt shock early in the morning did not demonstrate greater alterations in their homeostasis due to the higher accumulation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and MDA, and to the greater investment in proline. When taking the stress application time into account, in the root tissue of the plants subjected to salt stress early in the morning, it was observed that as the exposure time to stress increased, so did the contents of proline. However, there was a decrease in MDA concentrations. The data indicated that high salinity promotes quick responses in the physiological parameters of plants of *C. pyramidale* under plant nursery conditions, especially in the root system. *In silico* information based on the root transcriptome analysis of *C. pyramidale* under salinity (100 mM) in different stress times demonstrated that salt stress affected the expression of the components of the circadian clock. There was an induction of *Gigantea* after 30 minutes and 2 hours of stress application, with its repression at maximum stress (after 11 days under salinity). ELF4 (Early Flowering 4), a gene reported in the literature with nighttime expression and essential for rhythmicity, also presented a differential expression, being repressed at maximum stress.

**Keywords:** Circadian clock; gas exchange; osmotic solutes; lipid peroxidation; sodium recirculation; gene expression; ELF4; *Gigantea*.



## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	9
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	12
2.1 RITMOS BIOLÓGICOS .....	12
2.2 RITMOS CIRCADIANOS .....	13
2.3 ESTRESSE ABIÓTICO E RELÓGIO CIRCADIANO NAS PLANTAS .....	16
2.4 SALINIDADE .....	16
2.5 EFEITOS DAS ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SAIS SOBRE AS PLANTAS .....	18
2.6 RESPOSTAS E MECANISMOS DE TOLERÂNCIA À SALINIDADE .....	19
2.3 <i>Cenostigma pyramidade</i> (Tul.) L. P. QUEIROZ .....	21
<b>3 ARTIGO 1</b> .....	23
<b>4 ARTIGO 2</b> .....	54
<b>5 ARTIGO 3</b> .....	74
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	100
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	101
<b>APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO</b> .....	110
<b>APÊNDICE B – MATERIAL SUPLEMENTAR</b> .....	121

## 1 APRESENTAÇÃO

Muitas das atividades fisiológicas e comportamentais das espécies ocorrem em eventos temporais. Esses aspectos podem variar em sua regularidade, no entanto, eles sempre estão conectados com os eventos periódicos do ambiente. Essas conexões entre o ambiente-atividades biológicas são chamadas de ritmos biológicos (SWEENEY, 1962). Levando em consideração que a sincronização ambiental ocorre desde bactérias a eucaryotos mais derivados, é de se supor que pressões seletivas levaram os organismos a correlacionar suas atividades com os eventos temporais do ambiente (PITTENDRIGH, 1993). Provavelmente a programação das atividades para que ocorressem em fase específica dentro de um ciclo puderam garantir que reações incompatíveis sejam acontecessem em momentos temporais distintos, garantindo assim um melhor desempenho dos organismos (MITSUI et al., 1986).

Um subconjunto dos ritmos biológicos é o ritmo circadiano. Este pode ser considerado um sofisticado mecanismo que garante a persistência de um ritmo que possui periodicidade correspondente ao movimento de rotação da Terra (aproximadamente 24 h) (SWEENEY, 1962; GARDNER et al., 2006). Os primeiros estudos realizados sobre ritmos circadianos foram realizados em plantas e desde então trabalhos das relações do ciclo diário de luz/escuro tem sido realizados com outros organismos (MITSUI et al., 1986; QIAN et al., 2012). Em plantas, várias atividades estão sob controle circadiano, como condutância estomática, assimilação de CO<sub>2</sub>, abertura floral, produção de fitorreguladores e expressão de genes envolvidos na tolerância ao estresse (ATKINS; DODD, 2014; DODD et al., 2015; GRUNDY; STOKER; CARRÉ, 2015; WELLER; ORTEGA, 2015; DIOS et al., 2016, 2017; GESSLER et al., 2017). E estudos recentes apontam que aproximadamente 30% do transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* está sob controle circadiano (COVINGTON et al., 2008).

Estudos em nível molecular do relógio circadiano já foram investigados em algumas espécies (MARTINO-CATT; ORT, 1992; MARCOLINO-GOMES et al., 2014), mais profundamente em *A. thaliana* (GREEN; TOBIN, 1999; HALL et al., 2001; SEO; MAS, 2014). Em síntese, o funcionamento do relógio se inicia pela manhã com expressão de dois fatores de transcrição LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL) e CCA (CICARDIAN CLOCK ASSOCIATED), que são reprimidos pela expressão das chamadas proteínas PRR (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR). Durante a madrugada um complexo noturno, formado por três proteínas (ELF3, ELF4 e LUX) inibe a expressão

das PRR. Assim a expressão de LHY e CCA sobe novamente pela manhã (SEO; MAS, 2014). No entanto, mais do que controlar as atividades metabólicas das plantas, estudos recentes vêm demonstrando que o relógio contribui para a capacidade das plantas tolerarem diferentes tipos de estresse ambiental e se adaptarem a eles (GRUNDY; STOKER; CARRÉ, 2015). Isso se deve pelo relógio está no controle da expressão de uma grande fração de genes responsivos ao estresse (WILKINS et al., 2009; HABTE et al., 2014). Em contrapartida, trabalhos vêm indicando que diferentes tensões ambientais funcionam com *input* para o relógio circadiano resultando em uma expressão alterada e *splicing* diferencial dos genes do relógio (BENDIX; MARSHALL; HARMON, 2015; GRUNDY, STOKER; CARRÉ, 2015). Além disso, já foi demonstrado que as plantas apresentam capacidade de respostas diferenciadas ao longo do dia, dependendo do momento que em o estresse ambiental é aplicado (em nível transcricional) (WILKINS; BRÄUTIGAM; CAMPBELL, 2010; GREENHAM; MCCLUNG, 2015; PARK et al., 2016). Logo, a compreensão das interações de diferentes estresses com o relógio circadiano se tornou alvos vários estudos nos últimos anos.

Dentre os estresses abióticos que mais limitam a produtividade da biomassa vegetal, está o estresse salino. Para suportar essa adversidade as plantas alteram sua morfologia, fisiologia, metabolismo e expressão gênica, que em conjunto resultam em algum grau de tolerância (GUPTA et al., 2014). Em um cenário em que mudanças ambientais vêm acontecendo de forma mais rápida e intensa, a compreensão de como esse estresse abiótico impacta (ou não) no relógio circadiano se faz necessário, uma vez que uma boa sincronização com ambiente resulta em um aumento no *fitness* das espécies (GREEN et al., 2002). Além disso, é necessário investigar essas informações em espécies lenhosas, que apresentam uma estratégia de vida diferente das espécies que até o momento foram alvos desses estudos (espécies que apresentam ciclo de vida curto ou são domesticadas) (NAKAMICHI, 2011).

Dessa forma, o presente estudo visa investigar a performance fisiológica e alterações na expressão gênica de uma espécie lenhosa nativa da caatinga, *Cenostigma pyramidale* (Tul.) L. P. Queiroz (Fabaceae) submetida alta salinidade. Através desse conjunto de dados, o estudo pretende compreender: 1) como o tempo de exposição ao sal afeta os níveis de solutos orgânicos e balanço redox em uma situação de choque salino; 2) se a entrada do estímulo em diferentes momentos do dia desencadeia perfis de respostas diferenciados no metabolismo primário; 3) identificar *in silico* os genes do relógio circadiano no transcriptoma radícula de *C. pyramidale* e verificar se salinidade age como

um *input* alterando seus níveis de expressão. Com isso desejamos fornecer informações sobre as conexões entre salinidade e o relógio circadiano em uma espécie lenhosa importante para florestas tropicais sazonalmente secas.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 RITMO BIOLÓGICOS

Os ritmos biológicos são observados em praticamente em todos os organismos, desde os mais basais aos mais derivados na escala evolutiva (SWEENEY, 1962). Estes relógios são sofisticados componentes adaptativos que permitem que as funções biológicas sejam colocadas em uma “base” de tempo regular (MCCLUNG, 2006; FUKUDA et al., 2007). Os primeiros experimentos que demonstraram a medição precisam do tempo pelas plantas foram realizados por Ganer e Allard (1920). Este trabalho mostrou que as plantas produzem flores em certas estações devido a sua capacidade de medir a duração do dia ou, mais exatamente a duração de período escuro ininterrupto, com refino suficiente para detectar a estação do ano. Com o tempo vários experimentos mostraram que esse comportamento rítmico é extremamente comum nas plantas e que existe toda uma classe de fenômenos em que a medição do tempo é o comportamento característico (SWEENEY, 1962).

A capacidade de regulação endógena dos ritmos biológicos ocorre na presença ou ausência de ciclos ambientais (por exemplo, períodos de luminosidade e escuridão e sazonalidade), permitindo a organização temporal das funções biológicas e o acontecimento das atividades em uma base temporal regular (ROENNEBERG; WIRZJUSTICE; MERROW, 2003). Entretanto, o padrão do ritmo expresso em condições constantes é denominado ritmo em livre-curso e este é ajustado quando submetidos às pistas temporais ambientais (MCCLUNG, 2006). Logo, a geração endógena dos ritmos pode ser submetida a ajustes temporais contínuos por pistas periódicas do ambiente (MCCLUNG, 2006; GREENHAM; MCCLUNG, 2015).

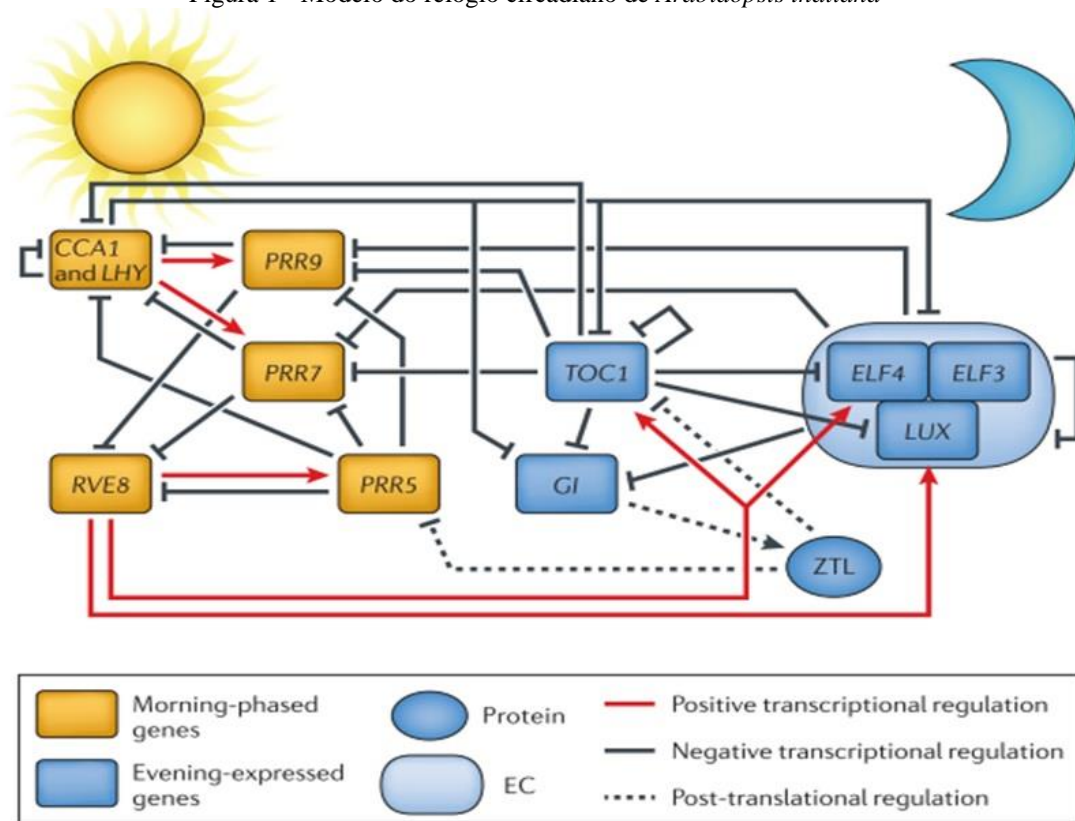
A sincronização pode ser definida como a relação de ajuste temporal entre o ritmo endógeno e os ciclos ambientais (HARMER, 2009). Esta possui funções essenciais como ajustar o período e a fase dos ritmos endógenos de acordo com a duração e as fases dos ciclos ambientais (MÁS; YANOVSKY, 2009). A correspondência incorreta entre os ritmos ambientais e os endógenos mostrou reduzir o conteúdo de clorofila foliar, a assimilação, o crescimento e aumentou a mortalidade (DODD et al., 2005). Os sinais ambientais como luz e temperatura são chamados de *zeitgeber* (“doador do tempo”) (MCCLUNG, 2006), sendo os responsáveis por redefinir o relógio na planta (MÁS; YANOVSKY, 2009), embora seja a luz de longe o *zeitberg* mais dominante. Muitos dos

componentes do relógio das plantas são sensíveis à luz, mostrando transcrição sensível à presença de luz (GREENHAM; MCCLUNG, 2015).

## 2.2 RITMOS CIRCADIANOS

Os organismos demonstram de fato organização temporal, e, portanto, são capazes de medir o tempo. Essa apropriação de ritmicidade, devido às condições ambientais diárias, em uma escala de 24 horas, levou a definição de ritmo circadiano (do latim cerca de um dia). O relógio circadiano é um oscilador biológico que gira em torno de 24 horas, que permite os organismos a anteciparem às mudanças diárias previsíveis que estão ligadas a rotação da Terra (MCCLUNG, 2006; GRUNDY; STOKER; CORRÉ, 2015). Os ritmos circadianos controlam muitos processos nas plantas, incluindo condutância estomática, assimilação de CO<sub>2</sub>, fotossíntese, produção de fitorreguladores e expressão genes de tolerância (MARTINO-CATT; ORT, 1992; WILKINS; BRÄUTIGAM; CAMPBELL, 2010). Por muito tempo se perguntou se os componentes que formam o relógio eram totalmente endógenos (SWEENEY, 1962). No entanto, só na década de 1990, que se observou um rápido progresso em direção à identificação dos componentes do relógio (Tabela 1) e a dos mecanismos oscilatórios centrais para o relógio circadiano (MCCLUNG, 2006). Esses avanços se deram, em grande parte, devido ao surgimento de *Arabidopsis thaliana* como um poderoso modelo que permitiu a análises genéticas avançadas (SOMERVILLE; KOORNNEEF, 2002; KOORNNEEF; MEINKE, 2010).

O relógio circadiano é composto por três “circuitos de retorno” que são interligados. Dois fatores de transcrição de domínio MYB únicos, CIRCADIAN AND CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) e LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) parecem desempenhar papéis fundamentais em cada *loop*, sendo propostos como o oscilador central do relógio (ALABADÍ et al., 2001). O funcionamento do relógio se inicia pela manhã com expressão de dois fatores de transcrição LHY e CCA1. CCA1 e LHY reprimem a expressão de um componente noturno TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1), um membro da família das PRR (*Pseudoresponse Regulator*) (MCWATTERS; DEVLIN, 2011). Por sua vez, CCA1 e LHY são *down-regulated* pela a expressão das chamadas proteínas PRR 7, 9 e 5 (*Pseudo-Response Regulator*). Durante a madrugada um complexo noturno, formado por três proteínas (ELF3, ELF4 e LUX) inibe a expressão das PRR. Assim a expressão de LHY e CCA sobe novamente pela manhã. (Figura 1).

Figura 1 - Modelo do relógio circadiano de *Arabidopsis thaliana*

Fonte: Greenham e Mcclung, 2015. Nature.

No entanto, outras conexões entre os módulos são estabelecidas e vários participantes e suas regulações foram adicionados à lista original dos componentes do relógio (SIMON; DODD, 2017). Além do controle transcritivo, evidências vêm demonstrando que mecanismos como *splicing* alternativo, *turnover* de proteínas e modificações da cromatina refinam ainda mais a precisão e a robustez dos osciladores circadianos (GREENHAM; MCCLUNG, 2015). Até o momento mais de 20 componentes associados ao relógio foram identificados em *A. thaliana* (HSU; HARMER, 2014) e homólogos desses genes também já foram identificados e caracterizados em outras espécies (FABRICANTE; ANDRADE; MARQUES, 2010; YON et al., 2012; CALIXTO; WAUGH; BROWN, 2015). No entanto vários estudos recentes (de MIZUNO; NAKAMICHI, 2005; KIM et al., 2010; MONTAIGU; COUPLAND, 2017) vêm demonstrando que é grande a complexidade do relógio circadiano em *A. thaliana* e que muitas “peças” do quebra-cabeça ainda estão faltando.

Tabela 1 - Principais genes do relógio circadiano em *Arabidopsis thaliana*

<b>Gene</b>	<b>Descrição</b>	<b>Horário da atividade da proteína</b>	<b>Função molecular</b>	<b>Referência</b>
<i>CCA1</i>	CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1	Manhã	Fator de transcrição; controla diretamente a expressão de genes de saída do relógio; repressão dos genes expressos à tarde/noite.	HARMER, 2009
<i>LHY</i>	MYB-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR LHY	Manhã	Fator de transcrição; repressão dos genes expressos a tarde/noite.	HARMER, 2009
<i>PRR9</i>	PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 9	Depois do amanhecer	Fator de transcrição; reprime a expressão de CCA1 e LHY	MIZUNO; NAKAMAMICHI, 2005; NAKAMICHI et al., 2005
<i>PRR7</i>	PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7	Depois do amanhecer	Fator de transcrição; reprime a expressão de CCA1 e LHY	NAKAMICHI et al., 2005
<i>PRR5</i>	PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5	Tarde	Fator de transcrição; reprime a expressão de CCA1 e LHY	NAKAMICHI et al., 2012; WANG; FUJIWARA; SOMERS, 2010
<i>PRR3</i>	PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 3	Fim de tarde/Noite	Fator de transcrição; modula a estabilidade de transcrição do TOC1	PARA et al., 2007
<i>TOC 1 (PRR1)</i>	PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 1	Fim de tarde/Noite	Fator de transcrição; reprime a expressão de CCA1 e LHY	HUANG et al., 2012
<i>LUX</i>	LUX ARRHYTHMO	Noite	Fator de transcrição; reprime a expressão de PRR9 e genes de saída	NUSINOW et al., 2011
<i>ELF 3</i>	PROTEIN EARLY FLOWERING 3	Noite	Regulador de transcrição; reprime a expressão de PRR9	NUSINOW et al., 2011
<i>ELF 4</i>	PROTEIN EARLY FLOWERING 3	Noite	Regulador de transcrição; reprime a expressão de PRR9	HERRERO et al., 2012
<i>ZTL</i>	CLOCK-ASSOCIATED PAS PROTEIN ZTL	Fim de tarde	Proteína F-BOX; regula a estabilidade das proteínas de TOC1	MÁS et al., 2003
<i>GI</i>	GIGANTEA		Proteína nuclear; interação proteína-proteína	DALCHAU et al., 2011

Fonte: A autora (2020).



### 2.3 ESTRESSE ABIÓTICO E RELÓGIO CIRCADIANO NAS PLANTAS

Devido à previsibilidade das mudanças diárias no ambiente, é de se esperar que o relógio circadiano ajude as plantas na adaptação às tensões abióticas (HSU; HARMER, 2014). Nos últimos anos alguns estudos vem relatando que o relógio tem influência nas respostas ao estresse abiótico, contribuindo para a tolerância vegetal a diferentes tipos de estresse (DODD et al., 2005; FOWLER; COOK; THOMASHOW, 2005; GRUNDY; STOKER; CORRÉ, 2015; SYED et al., 2015). Isso ocorre porque o relógio circadiano controla uma grande fração de genes responsivos ao estresse abiótico (WILKINS; BRÄUTIGAM; CAMPBELL, 2010; GRUNDY; STOKER; CORRÉ, 2015). Por exemplo, a produção de fitormônios é um tipo de resposta das plantas submetidas a estresses abióticos. A síntese de ácido abscísico (ABA), que é aumentada rapidamente após estresse salino e a seca, tem seus níveis sob controle circadiano (MIZUNO; YAMASHINO, 2008). Estudo realizado em tabaco mostra variações significativas nas concentrações de ABA em suas folhas, sendo relatados picos três horas após escuridão e queda máxima de concentração após exposição à luz (NOVAKOVA et al., 2005). O estresse hídrico também afeta a expressão dos genes do relógio circadiano, levando a uma dessincronização do período circadiano. Isso sugere que ocorre uma reconfiguração de novos ritmos, levando à adaptação da planta as novas condições impostas pelo ambiente ( MARCOLINO-GOMES et al., 2014; GRUNDY; STOKER; CORRÉ, 2015). Esses reajustes podem promover um equilíbrio, permitindo o crescimento e a tolerância a estresses abióticos. Mutações nos componentes do relógio circadiano não só impactam em seu oscilador central, mas também alteram nas habilidades das plantas em tolerar condições de estresse e se aclimatarem a essa nova condição (GRUNDY; STOKER; CORRÉ, 2015). Essas informações são relevantes e de grande interesse para a produção de variedades tolerantes. Uma vez, que o relógio circadiano está envolvido nas interações ambientais e que uma grande fração de genes importantes na tolerância ao estresse e de traços agrícolas de interesse parecem estar sob sua regulação (BENDIX; MARSHALL; HARMON, 2015).

### 2.4 SALINIDADE

A salinização é um fator limitante para o desenvolvimento e produtividade vegetal. Está pode ocorrer de forma natural, chamada de salinização primária, ou por

influência antropica, a salinização secundária (FAO; ITPS, 2015). A salinização primária pode ocorrer devido à acumulação de íons provenientes do itemperismo, baixa pluviosidade e elevada taxa de evapotranspiração (ESTEVES; SUZUKI, 2008). Já desmatamentos, utilização de água salobra na irrigação e sistemas de drenagem ineficientes são as causas mais frequentes da salinização secundária (POLLE; CHEN, 2015). O processo de salinização envolve o acúmulo desses sais na solução do solo, podendo existir altas concentrações de sais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  (PEDROTTI et al., 2015), sendo cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) ou carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), em maior predominância (POLLE; CHEN, 2015). Solos afetados por sais podem ser classificados em salinos, sódicos e salino-sódicos, dependendo da concentração de sais, condutividade elétrica e quantidade de  $\text{Na}^+$  disponível para troca iônica (WICKE et al., 2011). Solos salinos são caracterizados por apresentar elevada concentração de  $\text{Na}^+$  e apresentarem baixa capacidade de troca iônica, condutividade elétrica entre 2 e 4  $\text{mS cm}^{-1}$ . Já os solos sódicos possuem uma alta capacidade de troca catiônica e mais de 15% de  $\text{Na}^+$  trocável. Os solos sódicos podem subclassificados em moderadamente sódico (entre 20 e 30%), fortemente sódico (de 30 a 40%) e extremamente sódico (mais de 40%) (RICHARDS, 1954). Solos salino-sódicos além de possuírem alta porcentagem de  $\text{Na}^+$  trocável, também possuem altas concentrações desse íon na solução do solo (POLLE; CHEN, 2015). A existência de locais afetados pelas altas concentrações de sais promoveu a seleção de espécies adaptadas a tais condições. Segundo esse critério as plantas podem ser classificadas em I) glicófitas, que suportam uma concentração de moderada de salinidade, e II) halófitas, que são plantas que apresentam a capacidade de completar seu ciclo de vida em ambientes com concentrações acima de 200 mM de  $\text{NaCl}$  (FLOWERS; HAJIBAGHER; CUPSON, 1986).

A área de solos salinizados vem aumentando significativamente em todo planeta. No Brasil estima-se que cerca 25% das áreas irrigadas do território estejam nessas condições, estando estes em sua maioria localizados na região semiárida do nordeste (GHERRY, 2000). A implementação da irrigação e as condições climáticas locais são os principais fatores que tem levado a um aumento na concentração de sais nesses solos. Logo, se torna de extrema urgência a busca por técnicas que ajudem a reduzir a salinidade do solo, seja estas por técnicas de manejo agrícola ou pelo emprego de técnicas de melhoramento genético, a fim de selecionar genótipos tolerantes as altas concentrações de sais no solo.

## 2.5 EFEITOS DAS ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SAIS SOBRE AS PLANTAS

A alta salinidade prejudica o estabelecimento, crescimento e desenvolvimento das plantas, promovendo reduções na produtividade (LATEF; MIRANSARI, 2014), focando em seus aspectos fisiológicos, as altas concentrações de sais afeta as plantas, principalmente de duas maneiras: déficit hídrico, devido à redução do potencial osmótico da solução do solo que leva a redução da disponibilidade de água para as plantas (efeito osmótico) e pelos efeitos tóxicos de íons específicos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ). As tensões causados pelos íons estão diretamente relacionados à alteração na taxa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , pois o  $\text{Na}^+$  externo impacata no influxo do  $\text{K}^+$  intracelular. Além disso, também é observado um acúmulo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no citosol (TUTEJA, 2007). A elevada concentração  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  intracelular prejudicam a estrutura das enzimas e outras macromoléculas, danificam as organelas, prejudicam o processo fotossintético e respiração, inibem a síntese proteica e induz uma deficiência iônica (PORCEL; AROCA; RUIZ-HOZANO, 2012). Quando os efeitos do estresse osmótico excedem os níveis de tolerâncias, ocorrem distúrbios funcionais, como redução na fotossíntese, fechamento estômático, senescência e redução do crescimento (VOLKMAR; HU; STEPPUHN, 1998; PASCALE; RUGGIERO; BARBIERI, 2003). O desequilíbrio nutricional também é observado, devido à diminuição na absorção de nutrientes, no entanto, este pode ser considerado um efeito indireto (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2008). É relatada, adicionalmente, a ocorrência de injúrias, como necrose foliar. Sendo essas lesões, provocadas pela elevada salinidade, notáveis nas mais diversas partes da planta.

A redução da na disponibilidade de água causada pela salinidade faz com que as plantas lancem mão de estratégias para minimizar a perda de água, a fim de manter o conteúdo hídrico. Assim, o fechamento estomático se torna um dos primeiros mecanismos utilizados pela planta para tolerar a deficiência hídrica, evitando assim a perda excessiva de água por transpiração (CAMPOS; HSIE, 2012; MEDEIROS et al., 2014). Como efeitos colaterais, ocorre a redução da taxa fotossintética devido o aumento da resistência estomática á difusão de  $\text{CO}_2$  (MAHAJAN; TUTEJA, 2005; CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2008). Com a queda na transpiração, a eficiência do uso da água, que representa a relação entre a assimilação de  $\text{CO}_2$  por molécula de água (MANSUR; BARBOSA, 2000; SILVA et al., 2009), pode vir a aumentar (HUANG et al., 2014a). Com a redução da condutância estomática e da concentração de  $\text{CO}_2$ , ocorre uma redução na atividade do ciclo de Calvin, levando a uma diminuição do consumo de ATP e do

NADPH, diminuindo a disponibilidade de  $\text{NADP}^+$  (BAKER; ROSENQVIST, 2004). O desequilíbrio entre a absorção e a utilização da energia absorvida, leva a um acúmulo de energia, fazendo com que as plantas apresentem uma resposta conhecida como fotoinibição (MORALES, 2014). Além disso, o excesso de energia é prejudicial, pois o fluxo de elétrons provenientes da fotólise da água reduz o  $\text{O}_2$  contribuindo para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (ZHU, 2003; BATOOL, SHAHZAD; ILYAS, 2014), como superóxidos, peróxidos e hidroxila. Essas moléculas em níveis elevados podem causar danos oxidativos aos lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. No entanto, estudo recente vem apontando o papel dessas moléculas na sinalização ao estresse (POLLE; CHEN, 2015).

## 2.6 RESPOSTAS E MECANISMOS DE TOLERÂNCIA À SALINIDADE

As plantas quando expostas a alta salinidade apresentam processos danificados como síntese de proteínas, metabolismo de lipídios e fotossíntese. E para tolerar os efeitos osmóticos impostos pela salinidade, as plantas necessitam diminuir seu potencial hídrico a um nível abaixo do encontrado no solo, garantindo a absorção de água, processo conhecido como ajustamento osmótico ou osmorregulação (YAMAGUCHI; BLUMWALD, 2005). Esse ajuste ocorre pela capacidade de elevar a concentração de sais, absorvidos da solução do solo, e também pelo aumento na síntese de solutos compatíveis (WILLADINO; CAMARA, 2010). Muitas plantas desencadearam mecanismos de tolerância através da exclusão, compartimentalização dos sais ou prevenção da entrada de sal (MUNNS; TESTER, 2008), evitando assim os efeitos deléteiros na fotossíntese e outros processos chaves do metabolismo pelas alterações iônicas.

A sinalização ao estresse salino na planta é, primeiramente, percebida em nível de membrana plasmática, por meio de receptores. Tal ação resulta na geração de moléculas envolvidas em uma sinalização secundária, como  $\text{Ca}^{2+}$ , inositol e ácido abscísico (PORCEL; AROCA; RUIZ-HOZANO, 2012). Quando o  $\text{Na}^+$  ou os sais são elevados no solo, a planta tende a absorver mais  $\text{Na}^+$ , resultando na diminuição da absorção do  $\text{K}^+$ . O  $\text{Na}^+$  compete com o  $\text{K}^+$  pelos seus sítios de ligação, que estão envolvidos em várias funções celulares essenciais. Entretanto, essas funções não podem ser realizadas pela ligação do  $\text{Na}^+$ . Uma elevada razão  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , geralmente promovida pela salinidade, causa desequilíbrio iônico no citoplasma e conseqüentemente prejuízos em vias metabólicas

(GIRI; MUKERJI, 2004). O  $K^+$  possui um papel chave no metabolismo da planta, pois está envolvido na síntese de proteínas e atividade enzimática (LEIGH; WYN JONES, 1984). A regulação de absorção líquida de  $Na^+$  é resultado de uma alta extrusão ativa do  $Na^+$  na membrana plasmática através do antiporte  $Na^+/H^+$  (POLLE; CHEN, 2015). A compartimentalização tem como objetivo minimizar a concentração dos íons no citoplasma, sendo estes alocados em vacúolo. Alternativamente à compartimentalização no vacúolo, os sais podem ser transportados para a parede celular, o que, por sua vez, pode resultar na desidratação da célula (MÜHLING; LÄUCHLI, 2002).

Uma das consequências da exposição à alta salinidade é a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que resultam em danos em nível celular e molecular. No entanto, estudos recentes tem demonstrado que fatores de transcrição, como *heat-shocks Factors* (HSF), são sensíveis a  $H_2O_2$  e ativam enzimas antioxidantes para atenuar os efeitos das ERO em plantas sob estresse salino. A ação de enzimas antioxidativas, como catalase, superóxidos dismutase e ascorbato peroxidase resultam em plantas com maior tolerância ao estresse oxidativo e suas concentrações aumentam sob estresse salino (RIVAS; OLIVEIRA; SANTOS, 2013). Além do fator enzimático, moléculas como glutatona, tocoferol e ácido ascórbico atuam como antioxidantes, fazendo parte do sistema antioxidativo não enzimático (POLLE; CHEN, 2015). Outras moléculas que atuam na proteção das plantas em nível celular é a prolina e glicina betaína, aminoácidos que atuam na osmorregulação e osmoproteção (TUTEJA, 2007). Para a acumulação de solutos compatíveis, como glicina betaína, prolina e manitol, em resposta ao estresse salino, é necessário a ativação de rotas metabólicas que sintetizam tais solutos e o mesmo ocorre para a síntese de enzimas.

O acúmulo do aminoácido prolina é um dos mais frequentemente reportados como modificações induzidas pela salinidade nas plantas (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Em condição salina, a prolina atua na célula como um osmólito protetor e não tóxico para manter um balanço osmótico sob baixos potenciais hídricos (TUTEJA, 2007). Além disso, a prolina pode atuar na estabilização das estruturas das proteínas, favorecer a estabilização do pH citosólico, auxiliar no equilíbrio redox das células estressadas e no sequestro de espécies reativas de oxigênio (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008; SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

Além dos mecanismos fisiológicos, adaptações a níveis morfológicos e anatômicos também surgem em resposta à alta salinidade. O processo de abscisão se dá principalmente nas folhas. A planta pode desprender suas folhas quando estas possuem

altos teores de íons indesejáveis, assim ocorre uma economia de água por transpiração (YENSEN, 2006). Folhas suculentas, que apresentam maior espessura e tecidos capazes de estocar água, tem como objetivo reduzir a salinidade apoplástica, mantendo o turgor celular (DUARTE et al., 2013), permitindo que as plantas possa sobreviver com alto níveis de sais em parte dos seus tecidos. As glândulas de sal, mecanismos presentes em glicófitas, são formações que excretam sais das folhas como forma de controlar o excesso no interior das células. Essa excreção de sais contribui para o balanço iônico das folhas (FERNANDES et al., 2010).

### 2.7 *Cenostigma pyramidale* (Tul.) L. P. QUEIROZ

A Caatinga é uma floresta tropical seca brasileira, tendo boa parte de sua localização no semiárido nordestino, com características fitogeográficas específicas e nos últimos anos vem se aplicando esforços para estudar a biota da caatinga (LEAL; TABARELLI; SILVA, 2003). Quanto à flora, por exemplo, há registro de aproximadamente 900 espécies vegetais, sendo 380 delas endêmicas desse bioma (GIULIETTI et al., 2002). A família Fabaceae é uma das mais representativas dentro do bioma caatinga, com aproximadamente 320 espécies (QUEIROZ, 2009). Entre essas espécies está *Cenostigma pyramidale*, conhecida popularmente como catingueira. Essa espécie ocorre na região Norte, no estado do Amazonas, sendo também amplamente distribuída no Nordeste semiárido brasileiro, nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe, tendo como domínios fitogeográficos a Amazônia e Caatinga (LEWIS; SCHRIRE; LOCK, 2005; SILVA et al., 2009). É considerada uma das espécies mais representativas da Caatinga (FALCÃO et al., 2015)

*C. pyramidale* apresenta uma grande faixa de tolerância ambiental, apresentando um porte arbustivo quando a disponibilidade hídrica é restrita e porte arbóreo quando a disponibilidade hídrica é maior, com porte médio de 4-6 m de altura, podendo atingir até 12 m. Sua madeira é branco-amarelada com elevada densidade, contendo grandes quantidades de celulose e lignina, sendo indicada para recomposição florestal mista de áreas degradadas. Essa espécie se adapta facilmente a diferentes tipos de solos, apresentando uma rápida germinação após o início das chuvas. Ela investe na caducifolia durante a estação seca, estratégia relacionada à economia de água por transpiração, e na estação chuvosa apresenta um rápido rebrotamento de suas folhas. Essas folhas são

bipinadas, apresentando uma coloração rosada quando jovens e esverdeadas quando maduras e as flores são racimos curtos de coloração amarela. Os frutos são vagens achatadas de coloração castanho-claro quando maduros, as sementes também são achatadas de coloração castanho-claro quando maduras e a raiz é do tipo pivotante (MAIA, 2004).

Essa espécie apresenta múltiplas utilidades, como potencial madeireiro, restauração florestal, aplicações industriais, com suas folhas constituindo fonte de forragem para o gado, podendo ser utilizadas, assim como as flores e cascas, no uso medicinal (tratamento de diversas infecções, atividade antioxidante, farmacológica e antifúngica) (BAHIA et al., 2005; CRUZ et al., 2007; ALVIANO et al., 2008).

*Cenostigma pyramidale* vem sendo estudada por diferentes linhas de pesquisa dentro da biologia vegetal. Leite; Machado (2009) realizaram estudos envolvendo biologia reprodutiva e polinização em *C. pyramidale*. Estudos abordando aspectos ecofisiológicos também foram realizados. Lima et al. (2012) realizaram estudos envolvendo a maturação fisiológica da semente. Falcão et al. (2015) avaliou a plasticidade fenotípica e estratégias ecofisiológicas de *C. pyramidale*, em campo, em caatinga com diferentes estágios sucessionais, onde foi observado que seus atributos variam de acordo do estágio de sucessão. Sendo observado a plasticidade fenotípica dessa espécie, sendo a água o principal recurso promotor de alterações funcionais para aclimatação. Frosi et al. (2016) realizou um ensaio experimental, onde plantas jovens dessa espécie foram inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e submetidas a diferentes níveis de fósforo foliar. Logo, a utilização de *C. pyramidae* como modelo para experimentos envolvendo fisiologia vegetal e biologia molecular pode ser de grande valia para compreender o que essa espécie expressa para tolerar as condições, muitas vezes adversas, encontradas na caatinga, como estresse hídrico e salinidade.

### 3 ARTIGO 1

---

**APLICAÇÃO DE CHOQUE SALINO EM DIFERENTES MOMENTOS DO DIA  
DESENCADEIA RESPOSTAS DISTINTAS NO METABOLISMO PRIMÁRIO  
DE *CENOSTIGMA PYRAMIDALE* (FABACEAE), UMA ESPÉCIE LENHOSA DE  
FLORESTA TROPICAL SAZONALMENTE SECA**

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERÍODICO:

*Theoretical and experimental botany.*



**Aplicação de choque salino em diferentes momentos do dia desencadeia respostas distintas no metabolismo primário de *Cenostigma pyramidale* (Fabaceae), uma espécie lenhosa de floresta tropical sazonalmente seca**

Laís Luana de Lima<sup>1</sup>, Gabriella Frosi<sup>1</sup>, Rafaela Lopes<sup>1</sup>, Mauro Guida dos Santos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil;

\*Corresponding author: Tel.: +55 81 21268844. E-mail: address:maurogsantos@gmail.br

## RESUMO

Em plantas, muitos processos como, por exemplo, condutância estomática, assimilação de CO<sub>2</sub> e expressão de genes de tolerância a estresses bióticos e abióticos são controlados por osciladores endógenos, como o relógio circadiano. Estudos recentes demonstraram que estresses como frio, seca e salinidade agem como *input* no relógio circadiano levando a uma dessincronização do período circadiano, levando à adaptação da planta às novas condições impostas pelo ambiente. Nosso estudo investigou a performance fisiológica de uma espécie lenhosa nativa da caatinga *Cenostigma pyramidale* (Fabaceae) submetida a choque salino (200mM) no início da manhã e início da noite, nas primeiras 72 horas de aplicação do estresse. Levando em consideração que aproximadamente 30% do metabolismo primário está sob controle do relógio circadiano, nos perguntamos se diferentes níveis de repostas serão desencadeados em seu status metabólico, já que alterações aos níveis transcricionais resultam em modificações bioquímicas e fisiológicas. Nos dois conjuntos experimentais, quando comparados ao controle, foi observado um acúmulo de altas quantidades de Na<sup>+</sup> nos tecidos foliares já nas primeiras horas de exposição ao sal, sendo observada sua diminuição até o fim do experimento, assim, sugerindo que essa espécie se utiliza da recirculação de Na<sup>+</sup> para tolerar o estresse. Em seu metabolismo, no geral, as plantas apresentaram ciclos diurnos em relação ao amido, prolina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Já nas plantas sob estresse, ocorreu uma diminuição na concentração de amido e um aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA e prolina. Ao final do experimento, as plantas submetidas ao choque salino no início da manhã demonstraram maiores alterações em sua homeostase, pelo maior acúmulo de peróxido de hidrogênio e MDA e um maior investimento em prolina para atenuar os efeitos do estresse osmótico, que não foi observado nas plantas submetidas ao estresse no início da noite. Esses resultados sugerem que a transpiração diurna é um fator importante nos estudos que investigam plantas sobre estresse salino. Além disso, abre um debate sobre questões metodológicas em ensaios que investigam choques salinos de curto períodos, uma vez que poucos estudos informam o momento do dia em que foi aplicado o estresse.

**Palavras-chave:** trocas gasosas, recirculação de sódio, peróxido de hidrogênio, prolina, MDA, folha, horário de coleta.

**ABREVIACÕES:** A, taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>; FAA, aminoácidos livres totais; SS, carboidratos solúveis totais; E, transpiração foliar; ETR, taxa de transporte de elétrons; Fv/Fm, eficiência quântica máxima do fotossistema II; Fv'/Fm', eficiência máxima do fotossistema II a um dado dfff; gs, condutância estomática; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrogênio; MDA, dialdeído malônico; NPQ, quenching não fotoquímico; TPS, proteínas solúveis totais; qP, quenching fotoquímico.

## 1. Introdução

Ao investigar aspectos fisiológicos e moleculares relacionados ao comportamento de plantas frente a fatores bióticos e abióticos adversos, deve-se considerar um ponto crucial, capaz de influenciar a maior parte das respostas das espécies vegetais, o ritmo circadiano. A regulação circadiana pode fornecer um sofisticado mecanismo adaptável capaz de garantir um ritmo ideal entre crescimento e tolerância a estresses abióticos. Isso permite que as plantas encontrem um equilíbrio devido à orquestração da expressão gênica ao longo do dia (Greenham and McClung, 2015). Fatores endógenos controlados por relógios biológicos possivelmente conferem vantagem seletiva a espécies vegetais, como observado em *Arabidopsis thaliana* (Bläsing et al., 2005; Green et al., 2002; Green and Tobin, 1999) em que a perda do ritmo causou uma queda do *fitness* nessa espécie (Green et al., 2002). Estudos demonstraram que o ritmo circadiano influencia o teor de clorofila, fotossíntese e eficiência no uso da água ao longo do dia, contribuindo para a tolerância a estresses abióticos (Grundy et al., 2015). Particularmente, foi observado que muitos dos genes responsivos a alta salinidade, déficit hídrico e calor, estão sob o controle do relógio circadiano (Grundy et al., 2015; Marcolino-Gomes et al., 2015). Entretanto, estudos envolvendo ritmo circadiano e estresses abióticos são restritos a espécies modelos como *A. thaliana* (Bläsing et al., 2005; Green and Tobin, 1999) ou espécies cultivadas, como a soja (Marcolino-Gomes et al., 2014; Rodrigues et al., 2015), existindo lacunas sobre essas informações em espécies lenhosas.

A salinização dos solos é um dos principais problemas ambientais estabelecido em várias partes do mundo. Na Caatinga, floresta tropical sazonalmente seca, localizada em quase toda sua totalidade na região nordeste brasileira (Santos et al., 2014), a salinidade é um dos principais estresses abióticos que limitam o desenvolvimento das plantas. A salinização promove redução da produtividade vegetal, pois causa seca

fisiológica, toxidez pelo acúmulo de íons, principalmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e desequilíbrio no balanço nutricional (Munns and Tester, 2008; Polle and Chen, 2015). Para suportar essa condição, as plantas possuem mecanismos intrínsecos de tolerância, visando evitar danos severos em seu metabolismo como redução da condutância estomática e transpiração, acúmulo de osmorreguladores e osmoprotetores, que também atuam como sinalizadores. O aumento da atividade do sistema antioxidante enzimático e não enzimático é igualmente observado (Foyer and Noctor, 2003; Medeiros et al., 2014).

Considerando as alterações metabólicas que ocorrem no período de 24 horas em função das variações de luz e temperatura, não é surpreendente imaginar que respostas diferenciadas serão desencadeadas dependendo do momento da entrada do estresse. Fowler et al. (2005), demonstraram que quando um estímulo de estresse é dado em diferentes momentos do dia, a magnitude da resposta transcricional varia de acordo com o controle circadiano, em planta de *A. thaliana*, sob baixas temperaturas. Em um experimento investigando a regulação circadiana na tolerância ao sal, com aplicação do estresse salino em momentos distintos do dia (dia/noite), foi possível observar que a tolerância ao estresse salino difere no dia *versus* a noite. Nessas condições as plantas do tratamento dia produziu menos biomassa quando comparados ao tratamento noite (Park et al., 2016). Levando em consideração que aproximadamente 30% do metabolismo primário está sob controle do relógio circadiano (McClung, 2006), nos perguntamos se esses diferentes níveis de repostas serão percebidos já em seu status metabólico, já que alterações a níveis transcricionais resultam em modificações bioquímicas e fisiológicas.

Dessa forma, o presente estudo visa investigar a performance fisiológica de uma espécie lenhosa nativa da caatinga *Cenostigma pyramidale* (Fabaceae) submetida a choque salino (200mM) no início da manhã e início da noite, nas primeiras 72 horas de aplicação do estresse. Através desse conjunto de dados, o estudo buscou averiguar se a aplicação do choque salino em diferentes momentos do dia desencadearia respostas diferenciadas em seu metabolismo primário e alterações em seus padrões circadianos.

## 2. Materiais e Métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco, localizada no nordeste brasileiro ( $8^{\circ}08'58''\text{S}$ ,  $34^{\circ}56'55''\text{W}$ ), a uma temperatura média de  $34 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 40-60% de umidade relativa e luz natural (fluxo luminoso máximo:  $1400 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  e mínimo). O período de coleta do

material vegetal foi janeiro/2017, com 13h/11h (luz/escuro). Até o início do experimento as plantas foram mantidas em hidratação ideal (capacidade de 250 mL). Além disso, foi adicionada solução nutritiva de Hoagland (F total), a cada 15 dias, a fim de suprir todos os nutrientes necessários para o pleno desenvolvimento das plantas. Para responder as perguntas do trabalho, foi realizado um delineamento experimental com os seguintes tratamentos: Dia\*Controle (DC), Dia\*Sal (DS), Noite\*Controle (NC) e Noite\*Sal (NS). Para cada tratamento foram destinadas 48 réplicas biológicas (uma planta por vaso), totalizando 192 unidades experimentais. A cada horário estabelecido, foram coletadas simultaneamente quatro réplicas biológicas, das plantas controle e das irrigadas com solução de NaCl (200 mmol) (Fig. S1). Amostras das folhas estressadas foram aplicadas em momentos previamente escolhidos, considerando o tempo ZT, sendo ZT0 considerando o início da luz e o ZT13 o fim da luminosidade. Já a fazer escura foi considerada do intervalo de ZT14 até ZT24, no entanto para as análises bioquímicas foram utilizadas três réplicas biológicas. Foram amostradas quatro réplicas biológicas em cada momento de coleta. As folhas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As folhas foram destinadas para avaliar os parâmetros bioquímicos.

As medidas de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram realizadas a partir das 8:00h e todos os dias durante todo o experimento, sendo realizadas em uma folha totalmente expandida e não senescente. Nos dias em que se realizaram as medidas de trocas gasosas foi medida a temperatura e umidade do ar utilizando-se um termo-higrômetro (Termo-Higro SH 122, J Prolab. São José dos Pinhais, BR). Esses dados foram utilizados para o cálculo do déficit de pressão de vapor (DPV), que variou entre 3.44 KPa e 2.19 KPa entre os dias do experimento (valores para medidas realizadas as 8:30 da manhã (4h ZT), seguindo metodologia proposta por Campbell and Norman (1998). Foram mensuradas a taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), transpiração foliar (E) e a condutância estomática (gs) utilizando um analisador de gases por infravermelho (IRGA, ADC, modelLCi-pro; Hoddesdon, UK). A densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) foi mantida correspondente com as condições do ambiente que ficou em torno de 800  $\mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$ . Todas as medidas foram realizadas às 8 horas da manhã (4 horas ZT). Foi realizada uma medida antes da aplicação da solução salina nas plantas para verificar se todas se encontravam em condições experimentais equiparáveis.

Para avaliar a fluorescência da clorofila *a*, foram realizadas medidas tanto com as folhas adaptadas ao escuro por 30 minutos quanto para as folhas adaptadas à luz. Essas medidas foram realizadas com o auxílio de um fluorômetro portátil Fluor Pen FP100

(Photon Systems Instruments, Brno, CzechRepublic). Foram determinados a fluorescência mínima ( $F_o$ ), máxima ( $F_m$ ) e calculada a fluorescência variável ( $F_v = F_m - F_o$ ) para as folhas adaptadas ao escuro. Com as folhas adaptadas à luz, foram mensuradas a emissão de fluorescência no estado de equilíbrio ( $F'$ ) e a fluorescência máxima ( $F_m'$ ). A partir desses parâmetros, como forma de avaliar a capacidade fotoquímica, foram calculados os seguintes parâmetros: eficiência quântica máxima ( $F_v/F_m$ ) e eficiência máxima do fotossistema II ( $F_v'/F_m'$ ), a taxa de transporte de elétrons [ $ETR = (\phi_{PSII} \times DFFF \times 0,5 \times 0,84)$ ], onde o rendimento quântico do fotossistema II é expresso como  $\phi_{PSII} = F_m' - F_t / F_m'$ , DFFF é a densidade do fluxo de fótons fotossintetizantes, 0,5 representa a fração de energia de excitação distribuída para o PSII e 0,84 a porcentagem de luz absorvida pelas folhas em um dado DFFF (Baker, 2008). Também foi calculado o quenching fotoquímico [ $qP = (F_m' - F_t) / (F_m' - F_o)$ ] e não fotoquímico [ $NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$ ].

Para estimar o conteúdo hídrico relativo foliar (CHR), foram coletados folíolos de folhas maduras e não senescentes em todas as manhãs do experimento. A obtenção do CHR foi processada seguindo equação proposta por (Barrs and Weatherley, 1962):  $CHR (\%) = (P_f - P_s) / (P_t - P_s) \times 100$ . Onde:  $P_f$ ,  $P_s$  e  $P_t$  significam, respectivamente, peso fresco, peso seco e peso turgido do material vegetal coletado para a análise.

A partir do material foliar coletado foram determinados os teores de carboidratos solúveis totais (SS) (DuBois et al., 1956). Para quantificar o teor de amido foi utilizado o pallet da extração etanólica de carboidratos (DuBois et al., 1956). Foram quantificados também os açúcares redutores (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) e o teor de frutose (Foreman et al., 1973). Além dessas também foram quantificados os teores de proteínas solúveis totais (Bradford, 1976) aminoácidos livres totais (Moore and Stein, 1948), prolina (Bates et al., 1973) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Alexieva et al., 2001), dialdeído malônico (MDA) (Cakmak and Horst, 1991) todos a partir de uma massa de 50 mg.

Foi quantificado o conteúdo de sódio das folhas em todos os pontos amostrais do experimento. Após a secagem em estufa ( $60^\circ C$ ) até atingir peso constante, 500 mg de material foliar foi digerido em solução de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) em bloco digestor a  $350^\circ C$  para obtenção do extrato das amostras (Thomas et al., 1967). O conteúdo de sódio foi determinado por fotometria de emissão de chamas (DM-62, Digimed, São Paulo, BR).

### 2.1. Análise estatística

Os dados foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro-wilk) e homogeneidade das variâncias para saber se os dados apresentavam os pré-requisitos necessários para a utilização da estatística paramétrica. O conjunto de dados que não atendeu os requisitos necessários foi submetido a testes não paramétricos. Foi realizado um teste T (ou Wilcox), com nível de significância a 5%, para comparar as médias entre os tratamentos (Sal x Controle), em cada ponto de coleta. Nós utilizamos modelos lineares generalizados mistos (GLMMs) para determinar se as variáveis bioquímicas analisadas diferem entre o tratamento controle\*dia e os demais tratamentos. Como variável explicativa (efeito fixo) do modelo, usamos os efeitos do sal. Considerando que realizamos medidas ao longo do tempo para cada tratamento, utilizamos as coletas como efeito aleatório para todos os modelos, uma vez que cada tratamento foi coletado 12 vezes. Para a implementação do GLMM, usamos o pacote `glmmTMB`, e a seleção do melhor modelo foi dada pela comparação com o critério de informação Akaike com uma correção para o tamanho finitos de amostra (AICc) para selecionar os modelos mais bem suportados. Essa abordagem reduz os problemas associados aos testes múltiplos linearidade de variáveis explicativas e amostras pequenas (Burnham e Anderson, 2002). Os modelos com melhor suporte foram selecionados com base em seus AICc, que revelam a probabilidade de um determinado modelo – com base nos dados e no ajuste. A seleção do melhor modelo foi realizada usando a função `ICtab` no pacote `bbmle`. Foi realizada uma análise de componentes principais para verificar se existia uma tendência de agrupamento entre os tratamentos e verificar quais eram as variáveis mais influentes na separação dos possíveis grupos. Para essa análise consideramos os dados dos três últimos pontos de coleta de cada tratamento, assim conseguimos observar o balanço das respostas bioquímicas em diferentes momentos de coleta de material vegetal. Para essa análise multivariada foram utilizados os pacotes `Factoextra` (Kassambara and Mundt, 2017), `PCAmixdata` e `ggplot2`. Para todas as análises foi utilizado o software R 3.5.1 (Team, 2018).

### **3. Resultados**

A rega salina promoveu um rápido acúmulo de  $\text{Na}^+$  nas folhas de *C. pyramidae*. Após aproximadamente duas horas, para as plantas DS, e quatro horas para as plantas NS, da aplicação do choque salino, as folhas apresentaram um aumento em suas concentrações

( $p < 0.05$ ). Surpreendentemente, após atingir uma concentração máxima de  $\text{Na}^+$  em relação às plantas controle (aproximadamente 200% em ambos os conjuntos experimentais), foi observado sucessivas quedas na concentração de  $\text{Na}^+$ , tendo as últimas coletas deixado de apresentar diferença estatísticas entre o tratamento controle (Fig. 1 a e b).

As trocas gasosas apresentaram alterações já nas primeiras 24 horas após exposição ao sal. No geral, as plantas submetidas à rega salina, exibiram um decréscimo das trocas gasosas e status hídrico em comparação as plantas controle. A condutância estomática (*gs*) reduziu nas plantas submetidas à rega salina a partir do segundo dia do experimento (após 24h e 15h, em DS e NS, respectivamente). As plantas submetidas ao choque salino no período da manhã apresentaram uma redução de 62.5%, 70% e 53%, nas primeiras 24h, 48h e 72h, respectivamente ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2). Já as plantas irrigadas com solução noturna no início da noite apresentaram uma redução mais amena após as primeiras 15h do choque salino (12.5%,  $p < 0.0001$ ). No entanto, nos dias seguintes do experimento, após 40h e 63h de aplicação do estresse, demonstram quedas pronunciadas, de 77.85% e 76.4% da *gs*, respectivamente ( $p < 0.05$ ). A redução da *gs* é um dos principais mecanismos de defesa contra o déficit hídrico causado pela seca fisiológica, devido a altas concentrações de sais e já foi observada em diversos estudos (Habte et al., 2014; Huang et al., 2014a).

Com relação à assimilação líquida de  $\text{CO}_2$ , também foram observadas reduções nas plantas submetidas ao estresse em relação ao controle. As plantas DS apresentaram uma redução de 30% após 24h da aplicação da rega salina ( $p < 0.01$ ). Nas leituras seguintes, 48h e 72h, foi observada uma leve recuperação, apresentando uma queda de 20% e 12%, respectivamente ( $p < 0.01$ ). Já nas plantas NS foi verificada uma redução de 21% após 15h de exposição ao sal ( $p < 0.001$ ). Nas medidas seguintes, 40h e 63h, foram observadas reduções mais acentuadas, uma que as plantas submetidas ao estresse tiveram um desempenho 80% e 78.5% menor que as plantas controle, respectivamente ( $p < 0.05$ ).

Sobre a eficiência do uso da água (EUA), as plantas regadas pela manhã não demonstraram diferença estatística entre os tratamentos ao longo de todo o experimento (Fig. 2 g). Já o tratamento que recebeu rega salina às 17:00 horas, após 15h e 40h, o controle apresentou uma maior eficiência no uso da água ( $p < 0.05$ ). As 63h não foram mais observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. (Fig. 1 f).

Com relação ao conteúdo hídrico foliar (CHR), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nos três dias do experimento, tendo as plantas DC, DS, NC e NS, valores médios de CHR de 82.6, 73.1, 80.5 e 79.2%, respectivamente.

Entre os parâmetros de fluorescência avaliados, a maioria deles se manteve constantes durante todo o experimento. A maior variação ocorreu no segundo dia do experimento das plantas que foram submetidas à rega salina pela manhã. (Tab. 1).

Para análise dos resultados, nós procuramos encontrar padrões de repostas, identificando as alterações que ocorreram nas primeiras 24 horas, pois temos pontos amostrais que permitem observar todo um ciclo circadiano e também alterações par-a-par (controle *versus* estresse) a fim de observar alterações pontuais que ocorreram ao longo de todo experimento. Levando em consideração o momento da aplicação do estresse, e controlando o efeito da coleta, o GLMM mostrou que as concentrações dos metabólitos diferiram entre os tratamentos. No geral, as plantas DS apresentaram uma maior concentração de prolina, as NC um maior acúmulo de amido, aminoácidos, frutose e peróxido e menor de MDA. Já as plantas NS apresentaram um maior acúmulo de aminoácidos e peróxido de hidrogênio (Tab. 2).

As variáveis relacionadas ao metabolismo do carbono, como carboidratos solúveis totais (SS), frutose e amido apresentaram padrões de comportamento diferenciados. Para amido, as plantas submetidas a choque salino apresentaram valores mais baixos que os controles tanto nas plantas irrigadas pela manhã como a noite. No entanto, para as plantas irrigadas pela manhã com a solução salina, diferenças significativas foram observadas já nas primeiras coletas. Já nas plantas irrigadas no início da noite, diferenças estatísticas acentuadas só foram observadas a partir de 12h da aplicação do estresse (10h). Diferenças entre condições estressadas e controle foram mais acentuadas durante o período de luz, em particular após 12 horas de período luminoso (Fig 3 a e b). Com relação a SS, as plantas submetidas a salinidade pela manhã desencadearam uma redução na sua concentração após 8 horas do choque salino. No entanto, observou-se uma tendência de aumento de concentração de SS ao final do experimento. Já as plantas em que a imposição salina ocorreu no início da noite, o aumento só foi observado no último momento de coleta (118%,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 3 c e d). Com relação à frutose, só foi possível observar diferenças entre os tratamentos no experimento com irrigação no início da noite, onde as plantas submetidas a condição salina apresentaram uma redução na concentração de frutose (33%,  $p < 0.01$ ) (Fig 3 e e f). Os açúcares redutores também demonstram comportamentos distintos em relação aos tratamentos. As plantas do tratamento DS apresentaram valores mais baixos que o controle ( $p < 0.05$ ) nas primeiras horas após a imposição do choque salino. Aumentos nos níveis de açúcares redutores só foram observados nas últimas coletas do experimento. Nas plantas NS foi observado um



aumento já nas primeiras horas após aplicação do estresse. Esse aumento se manteve durante quase todo o experimento ( $p < 0.01$ ) (Fig 3 g e h). Em ambos os experimentos, as diferenças mais acentuadas ocorreram no período luminoso.

Com relação aos solutos envolvidos no metabolismo de nitrogênio, também foram observadas diferenças entre os tratamentos. Apenas um momento de coleta apresentou diferenças estatísticas, com relação ao TSP, entre o controle e o estressado no tratamento dia. No entanto, nas plantas do tratamento NS, foi observada uma tendência de aumento na concentração nas últimas coletas, apresentando diferença estatística na última coleta, com um aumento de 140% em relação ao controle ( $p < 0.01$ ) (Fig 4 a e b). Para aminoácidos livres totais, só foram observadas diferenças no tratamento noite. Inicialmente houve um aumento de 50%, após 2h da aplicação do estresse ( $p < 0.01$ ). Nas coletas seguintes em que foram observadas diferenças, as plantas estressadas apresentaram menores concentrações de FAA, tendo a última coleta apresentando os valores mais, em torno de 40% menor que as plantas controle (Fig 4 c e d). Os tratamentos submetidos ao choque salino apresentaram concentrações mais altas de prolina durante todo experimento, com diferença estatística em vários pontos de coleta (Fig 4 e e f). Divergindo do que ocorreu em amido e açúcares redutores, as diferenças mais acentuadas para esse aminoácido ocorreram no período noturno (entre 14-24h), tanto para DS e NS, como para as plantas submetidas à salinidade apresentando concentrações mais altas. A principal divergência entre os tratamentos submetidos ao estresse foi em que as plantas DS apresentaram um aumento acentuado nas últimas coletas. Esse padrão não foi observado nas plantas NS.

Quanto ao teor de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) também foram observadas alterações nos dois conjuntos experimentais. Entretanto, aumentos acentuados só foram observados em DS, com um pico de concentração na última coleta, onde foi quantificada uma concentração três vezes mais alta em relação às plantas controle (Fig 5 a e b). Com relação ao dialdeído malônico (MDA), as plantas submetidas ao choque salino no período da manhã apresentaram aumento em suas concentrações em vários momentos de coleta. As maiores diferenças foram observadas nos últimos momentos de coleta, tendo a última coleta apresentada um aumento de aproximadamente 400% em relação às plantas controle (Fig. 5 c). Já as plantas NS apresentaram inicialmente uma redução dos níveis de MDA, com um aumento em aproximadamente 24h após aplicação do choque salino. No entanto, não foram mais observadas diferenças estatísticas até o fim do experimento (Fig 5 d).

Uma análise de componentes principais foi realizada, considerando as variáveis bioquímicas analisadas e os três últimos momentos de coleta. A PCA foi capaz de explicar 52.9% de toda a variação nos dados, considerando os dois eixos principais (DIM1 e DIM2). Foi possível observar uma discreta separação entre DC, NC e NS. O tratamento DS apresentou o maior distanciamento dos demais tratamentos ao longo da DIM1 (Fig 7).

#### 4. Discussão

Nossos resultados demonstram que as plantas apresentam diferentes estratégias para lidar com o estresse salino em diferentes momentos do dia (dia *versus* noite). Essa diferença de sensibilidade frente ao estresse salino não é totalmente inesperada, uma vez que a taxa de transpiração, que facilita o transporte de  $\text{Na}^+$  das raízes para a parte aérea, é bem mais alta durante o dia que a noite (Park et al., 2016), dessa forma a velocidade de absorção acaba diferindo do momento da aplicação do estresse. Durante a noite, devido à baixa taxa de transpiração, a entrada de  $\text{Na}^+$  se deu de forma mais lenta. Estudos demonstraram que a transpiração noturna diminui a redistribuição hidráulica, podendo resultar em uma diminuição na absorção de nutrientes (Howard et al., 2009). Basicamente são conhecidos dois mecanismos básicos que promovem a tolerância ao sal: os que retardam a entrada de  $\text{Na}^+$  na planta e os que visam minimizar a concentração de sais no citoplasma (Munns, 2002; Munns and Tester, 2008). Análises eletrofisiológicas indicaram que proteínas HKT1 são capazes de mediar tanto o influxo como o efluxo de  $\text{Na}^+$ , dependendo do gradiente eletroquímico, promovendo uma recirculação de  $\text{Na}^+$  via floema em *A. thaliana* (Berthomieu et al., 2014). Essa estratégia pode desempenhar um papel importante na proteção dos tecidos aéreos contra o acúmulo de  $\text{Na}^+$ . Os baixos níveis de  $\text{Na}^+$  nas folhas de *C. pyramidale* ao final do experimento, após apresentar um acúmulo três vezes maior em relação ao controle, fornecem fortes indícios de que essa espécie se utiliza de mecanismos de recirculação de  $\text{Na}^+$  para enfrentar o estresse salino e proteger seus fotossistemas.

Sob condições de alta salinidade a diminuição da  $g_s$  afeta a fotossíntese, pois este mecanismo promove uma redução da disponibilidade de  $\text{CO}_2$  no sítio de fixação da rubisco (Chaves et al., 2008). Essa estratégia é considerada como uma resposta de aclimatação da planta ao choque salino, favorecendo a economia de água (Chaves et al., 2008). O fechamento estomático também está fortemente influenciado pela ação de

sinalizadores químicos, como o ácido abscísico (ABA), que também está envolvido na acumulação de prolina (Gómez-Cadenas et al., 1998). O declínio fotossintético observado no estudo também foi verificado por Frosi et al. (2017) ao trabalhar com a mesma espécie em condições mais brandas de estresse salino (100 mmol). Logo, independente do momento da aplicação do estresse, reduções nas taxas fotossintéticas eram esperadas em ambos conjuntos experimentais, tendo em vistas que essas respostas são amplamente descritas em plantas glicófitas (Silva et al., 2010; Ben Ahmed et al., 2012; Huang et al., 2014b; Frosi et al., 2017; Marriboina et al., 2017).

Além de ajustamentos fotossintéticos as plantas quando submetidas ao estresse salino promovem alterações no seu metabolismo primário. É sabido que vários parâmetros do metabolismo vegetal está sob regulação circadiana, como condutância estomática e assimilação de CO<sub>2</sub> (Habte et al., 2014), síntese de ABA (Mizuno and Yamashino, 2008; Sanchez et al., 2011), amido (Dodd and Webb, 2014; Webb and Satake, 2015), prolina (He et al., 2002) e peróxido de hidrogênio (Grace et al., 2012). Alguns ritmos são regulados por ciclos ambientais de luz ou temperatura, no entanto, outros permanecem em um ambiente sem variação, o que implica que eles estão sob um mecanismo endógeno, o relógio circadiano (McWatters and Devlin, 2011). Mais precisamente, estudos transcricionais revelaram que grande porção de genes de *A. thaliana* se expressa ritmicamente (aproximadamente 89%) independente da condição que esteja submetida (Michael et al., 2008). Em nossos resultados, foi possível observar claramente padrões e que alguns metabolitos primários estão sob controle do relógio circadiano, apresentando padrões de aumento e queda em intervalos de tempo de exposição da luminosidade (ou não), independente do momento de exposição ao choque salino.

A coordenação do crescimento, tanto no período luminoso quanto no escuro, é resultado de um fino gerenciamento do carbono, pois até mesmo curtos períodos de escassez podem levar a inibição do crescimento (Stitt et al., 2007). Em nossos experimentos foi possível observar o aumento de amido no período luminoso nas plantas controle em ambos os conjuntos experimentais. Já as plantas submetidas ao estresse apresentaram uma acentuada queda nas concentrações de amido. Os picos nas concentrações desse carboidrato coincidem com o aumento da exposição à luz (entre 10h e 12h ZT). Estes foram justamente os horários que podemos observar diferenças estatísticas mais pronunciadas entre os tratamentos. O acúmulo de amido na presença de luz e sua degradação no escuro ocorreram quase que linearmente (Webb and Satake,

2015; Mora-García et al., 2017), e padrões de acumulação e degradação foram observados mesmo quando variáveis ambientais, como irradiância e concentrações de CO<sub>2</sub> e nutrientes foram alterados (Gibon et al., 2009; Tschoep et al., 2009; Hummel et al., 2010). No entanto, em nossos experimentos foram observadas alterações nos padrões em momentos críticos, pois após um longo período de exposição à luminosidade, as plantas apresentaram um déficit hídrico que combinado com o aumento de sais no solo e aumento na concentração de Na<sup>+</sup> no tecido foliar acabaram por resultar em um fechamento estomático. Com a diminuição na chegada de CO<sub>2</sub> no sítio da fixação da rubisco, a síntese de amido fica comprometida. É necessário realizar ajustes na taxa de síntese e principalmente degradação de amido a fim de evitar sua escassez de carbono. Em nosso experimento, foi notável que as plantas, mesmo submetidas a uma nova condição ambiental, apresentaram níveis muito semelhantes em relação ao controle nas coletas realizadas no fim do período escuro (24h ZT). Sob déficit hídrico ou estresse osmótico, a degradação do amido parece ser mediada por enzimas hidrolíticas (BAM1, AMY3 e PHS1), assim sugerindo que uma complexa rede de regulação enzimática é ativada resultando em uma plasticidade no *tunover* de amido (Thalman et al., 2016). Embora esteja bem documentado que luminosidade e relógio circadiano sejam agentes regulatórios fundamentais para o metabolismo do amido, o impacto final sobre a atividade das enzimas do amido frente a estresse abiótico ainda não foi completamente compreendida (Thalman and Santelia, 2017).

O aumento nos níveis desse aminoácido não só fornece tolerância ao estresse, devido a sua atuação na proteção de membranas, proteínas e DNA (Liang et al., 2013), mas também serve como reserva de nitrogênio durante a recuperação (Hare and Cress, 1997). Além disso, He et al. (2002) correlacionaram um aumento da atividade das enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidante com o aumento dos níveis de prolina. Nossos resultados mostraram que nas plantas controles ocorre naturalmente um acúmulo de prolina em decorrência do maior tempo de exposição à luz. No período escuro ocorre um declínio à medida que se aumenta o tempo de ausência de luz. Estudos já mostraram que os níveis *PRP* (proteína rica-prolina) apresentam uma variação diurna, ao nível transcricional. Níveis mínimos ocorreram no período noturno e níveis máximos entre 10-16h ZT em plantas de soja sob condições naturais (16-h light/8-h dark, 10°-30 °C) (He et al., 2002). Em nosso experimento, as alterações de padrões na concentração de prolina foram observadas na ausência de luz. Nesses horários, os níveis de prolina continuaram elevados. A manutenção de níveis altos de prolina, quando seria esperada a

diminuição nos seus níveis, evidencia o papel desse aminoácido na tolerância ao estresse (Verbruggen and Hermans, 2008; Miller et al., 2010).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são consequências inevitáveis do metabolismo aeróbico (Foyer and Noctor, 2003; Sanchez et al., 2011). Quando a produção de ROS excede a sua eliminação, essas biomoléculas podem causar danos na célula resultando em estresse oxidativo (Miller et al., 2010). No entanto, a manutenção de um sinal de ROS, do local de origem do estresse ao alvo da resposta, é crucial para enfrentamento de situações de estresse (Miller et al., 2010). Em nossos resultados podemos observar padrões de produção de ROS que foram crescentes no período luminoso (mais acentuada) e no período noturno. A luminosidade é o principal impulsionador da fotossíntese e sendo a produção de ROS uma das suas consequências, não é surpreendente que os níveis ROS flutuem ao longo do dia (Grace et al., 2012; Guadagno et al., 2018). Estudos recentes demonstraram que a produção de ROS é controlada pelo relógio circadiano, em que foi possível observar padrões de expressão específicos em momentos do dia, tanto ao nível transcricional como na produção de  $H_2O_2$ , e que essa regulação temporal também reflete sobre a atividade enzimática da catalase (Grace et al., 2012). Mesmo as plantas NC e NS tenham apresentados níveis médios mais elevados na concentração de  $H_2O_2$  (Tab. 2), quando comparadas às plantas as DC, estes não foram acompanhados pelo um maior acúmulo de MDA, que inclusive foi estatisticamente mais baixo nas plantas NC. A acumulação de ROS aumenta o dano da membrana ao produzir substâncias envolvidas na peroxidação lipídica como o MDA (Polle and Chen, 2015; Sami et al., 2016), sendo esta resposta comum em vários estudos que investigam as respostas ao estresse salino (Huang et al., 2014b; Mittal et al., 2012). Já o maior acúmulo de peróxido de hidrogênio, nas plantas SN, indica que essa molécula estava exercendo outras funções. Boursiac et al. (2008) demonstraram que  $H_2O_2$  é um potente inibidor de condutividade hidráulica sob condições salinas devido à redução na abundância de aquaporinas PIP. ROS atuam como moléculas sinalizadoras de estresse (Foyer and Noctor, 2005; Miller et al., 2010), mas também de crescimento (Mangano et al., 2016) e desenvolvimento (Mhamdi and Breusegem, 2018). Logo, o aumento em suas concentrações não deve ser vistos apenas como eventos prejudiciais que devem ser evitados ou aliviados, podendo ser visto também como pré-requisitos para as plantas responderem adequadamente e induzir mecanismos adequados de aclimatação (Miller et al., 2010).

## 5. Conclusão

A alta salinidade desencadeou respostas rápidas nos parâmetros fisiológicos em condições da casa de vegetação sob luminosidade natural. A imposição de uma alta concentração de NaCl afetou a fotossíntese da espécie já nas primeiras 24 horas, porém não afetou seu nível de hidratação. Além disso, foi possível observar respostas diferentes devido à imposição da solução salina em diferentes momentos do dia, em que as plantas regadas no início do dia apresentaram um maior desequilíbrio em seu balanço redox, levando a um maior acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA, se utilizando da prolina como uma das estratégias para promover a osmorregulação. Além disso, nossos dados demonstraram que as respostas à imposição de altas concentrações de sódio (200 mM) é um processo dinâmico em que alterações não são condições constantes que podem ser observados em alguns momentos do dia e em outros não, ou seja, flutuações diárias também são uma fonte de variação em experimentos. Esse ensaio mostra o quão importante é informar os horários em que o material biológico foi coletado e em que momento foi aplicado o estresse, tendo em vista que muitas vezes essas informações são suprimidas nos trabalhos científicos, principalmente em estudos moleculares, uma vez que a variação temporal é um fator importante em experimentos de salinidade em curto prazo.

## Agradecimentos

Laís Luana de Lima agradece a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de estudos (IBPG-0852-2.03/15). Laís Luana de Lima e Mauro G. dos Santos são gratos pela infraestrutura e equipamentos dos Laboratórios de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco (LFV-UFPE), Laboratório de Química de Solos (UFRPE) e Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBV-UFPE) que permitiram a execução do trabalho.

## Referências

- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell Environ* 24:1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-

- stress studies. *Plant Soil* 39:205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Ben Ahmed C, Magdich S, Ben Rouina B, et al (2012) Saline water irrigation effects on soil salinity distribution and some physiological responses of field grown Chemlali olive. *J Environ Manage* 113:538–544. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.016>
- Berthomieu P, Nublat Â, Brackenbury WJ, et al (2014) Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na<sup>+</sup> recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *The EMBO journal*, 22(9):2004-2014.
- Bläsing OE, Gibon Y, Günther M, et al (2005) Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:3257–3281. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035261.1>
- Boursiac Y, Boudet J, Postaire O, et al (2008) Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant Jo* 56:207–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03594.x>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cakmak I, Horst W (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol Plant* 83:463–468
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2008) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann Bot* 103:551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- Dodd AN, Webb AAR (2014) In a plant's own sweet time. *Biochemical Soc* 8–11
- DuBois M, Gilles K a., Hamilton JK, et al (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Fowler SG, Cook D, Thomashow MF (2005) Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiol* 137:961–8. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058354>
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* 119:355–364
- Foyer CH, Noctor G (2005) Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell* 17:1866–1875
- Frosi G, Barros VA, Oliveira MT, et al (2017) Arbuscular mycorrhizal fungi and foliar

phosphorus inorganic supply alleviate salt stress effects in physiological attributes, but only arbuscular mycorrhizal fungi increase biomass in woody species of a semiarid environment. *Tree Physiol* 38:25–36. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx105>

Gómez-Cadenas A, Tadeo FR, Primo-Millo E, Talon M (1998) Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of citrus seedlings to salt shock. *Physiol. Plant.* 103:475–484

Grace A, Doherty CJ, Mueller-roeber B, et al (2012) CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. *PNAS* 109:17129–17134. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209148109>

Green RM, Tingay S, Wang Z-Y, Tobin EM (2002) Circadian rhythms confer a higher level of fitness to Arabidopsis plants. *Plant Physiol* 129:576–584. <https://doi.org/10.1104/pp.004374>

Green RM, Tobin EM (1999) Loss of the circadian clock-associated protein 1 in Arabidopsis results in altered clock-regulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4176–4179. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4176>

Greenham K, McClung CR (2015) Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nature* 16:598–610. <https://doi.org/10.1038/nrg3976>

Grundy J, Stoker C, Carré IA (2015) Circadian regulation of abiotic stress tolerance in plants. *Front Plants Sci* 6:151–169. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00648>

Guadagno CR, Ewers BE, Weinig C (2018) Circadian Rhythms and Redox State in Plants: Till Stress Do Us Part. *Front Plant Sci* 9:1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00247>

Habte E, Müller LM, Shtaya M, et al (2014) Osmotic stress at the barley root affects expression of circadian clock genes in the shoot. *Plant, Cell Environ* 37:1321–1337. <https://doi.org/10.1111/pce.12242>

Hare PD, Cress WA (1997) Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul* 21:79–102

He CY, Zhang JS, Chen SY (2002) A soybean gene encoding a proline-rich protein is regulated by salicylic acid, an endogenous circadian rhythm and by various stresses. *Theor Appl Genet* 104:1125–1131. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0853-5>

Howard AVAR, Iersel MWVAN, Richards JH, Donovan LA (2009) Night-time transpiration can decrease hydraulic redistribution. *Plant Cell Environ* 32:1060–1070. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01988.x>

Huang C, Wei G, Jie Y, et al (2014a) Effects of concentrations of sodium chloride on photosynthesis, antioxidative enzymes, growth and fiber yield of hybrid ramie. *Plant Physiol Biochem* 76:86–93. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.021>



- Huang C, Wei G, Jie Y, et al (2014b) Plant Physiology and Biochemistry Effects of concentrations of sodium chloride on photosynthesis , antioxidative enzymes , growth and fi ber yield of hybrid ramie. *Plant Physiol Biochem* 76:86–93. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.021>
- Kassambara A, Mundt F (2017) Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. 2017
- Liang X, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF (2013) Proline Mechanisms of Stress Survival. *Antioxidants Redox Signal* 19:998–1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
- Mangano S, Paola S, Juárez D, Estevez JM (2016) Update on Polar Growth ROS Regulation of Polar Growth in Plant Cells. *Plant Physiol* 171:1593–1605. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00191>
- Marcolino-Gomes J, Rodrigues FA, Fuganti-Pagliarini R, et al (2015) Transcriptome-wide identification of reference genes for expression analysis of soybean responses to drought stress along the day. *PLoS One* 10:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139051>
- Marcolino-Gomes J, Rodrigues FA, Fuganti-Pagliarini R, et al (2014) Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086402>
- Marriboina S, Sengupta D, Kumar S, Reddy AR (2017) Physiological and molecular insights into the high salinity tolerance of *Pongamia pinnata* (L.) pierre, a potential biofuel tree species. *Plant Sci* 258:102–111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.02.008>
- McClung CR (2006) Plant Circadian Rhythms. *Plant Cell Online* 18:792–803. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.040980>
- McWatters HG, Devlin PF (2011) Timing in plants - A rhythmic arrangement. *FEBS Lett* 585:1474–1484. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.051>
- Medeiros CD, Ferreira Neto JRC, Oliveira MT, et al (2014) Photosynthesis , antioxidant activities and transcriptional responses in two sugarcane ( *Saccharum officinarum* L .) cultivars under salt stress. *Acta Physiol Plant* 36:447–459. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1425-4>
- Mhamdi A, Breusegem F Van (2018) Reactive oxygen species in plant development. *Primer* 145:1–12. <https://doi.org/10.1242/dev.164376>
- Michael TP, Mockler TC, Breton G, et al (2008) Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet* 4:. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040014>
- Miller GAD, Suzuki N, Ciftci-yilmaz S, Mittler RON (2010) Reactive oxygen species

- homeostasis and signalling. *Plant Cell Environ* 33:453–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Mittal S, Kumari N, Sharma V (2012) Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: Photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiol Biochem* 54:17–26. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.003>
- Mizuno T, Yamashino T (2008) Comparative transcriptome of diurnally oscillating genes and hormone-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*: Insight into circadian clock-controlled daily responses to common ambient stresses in plants. *Plant Cell Physiol* 49:481–487. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn008>
- Moore BYS, Stein H (1948) PHOTOMETRIC NINHYDRIN METHOD FOR USE IN THE CHROMATOGRAPHY OF AMINO ACIDS. *J Biol Chem* 176:367–388
- Mora-García S, de Leone MJ, Yanovsky M (2017) Time to grow: circadian regulation of growth and metabolism in photosynthetic organisms. *Curr Opin Plant Biol* 35:84–90. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.11.009>
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25:239–250
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59:651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Park HJ, Qiang Z, Kim W-Y, Yun D-J (2016) Diurnal and circadian regulation of salt tolerance in *Arabidopsis*. *J Plant Biol* 59:569–578. <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0317-8>
- Polle A, Chen S (2015) On the salty side of life: Molecular, physiological and anatomical adaptation and acclimation of trees to extreme habitats. *Plant, Cell Environ* 38:1794–1816. <https://doi.org/10.1111/pce.12440>
- Rivas R, Oliveira MT, Santos MG (2013) Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant Physiol Biochem* 63:200–208. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.11.026>
- Rodrigues FA, Fuganti-Pagliarini R, Marcolino-Gomes J, et al (2015) Daytime soybean transcriptome fluctuations during water deficit stress. *BMC Genomics* 16:505. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1731-x>
- Sami F, Yusuf M, Faizan M, et al (2016) Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* 109:54–61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.005>
- Sanchez A, Shin J, Davis SJ (2011) Abiotic stress and the plant circadian clock. *Plant Signal Behav* 6:223–231. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14893>
- Santos MG, Oliveira MT, Figueiredo K V., et al (2014) Caatinga, the Brazilian dry tropical forest: Can it tolerate climate changes? *Theor Exp Plant Physiol* 26:83–

99. <https://doi.org/10.1007/s40626-014-0008-0>

Silva EN, Ribeiro R V, Ferreira-silva SL, et al (2010) Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. *J Arid Environ* 74:1130–1137. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2010.05.036>

Stitt M, Gibon Y, Lunn JE, Piques M (2007) Multilevel genomics analysis of carbon signalling during low carbon availability: coordinating the supply and utilisation of carbon in a fluctuating environment. *Functional Plant Biol* 34:526–549

Team RC (2018) R: A language and environment for statistical computing.

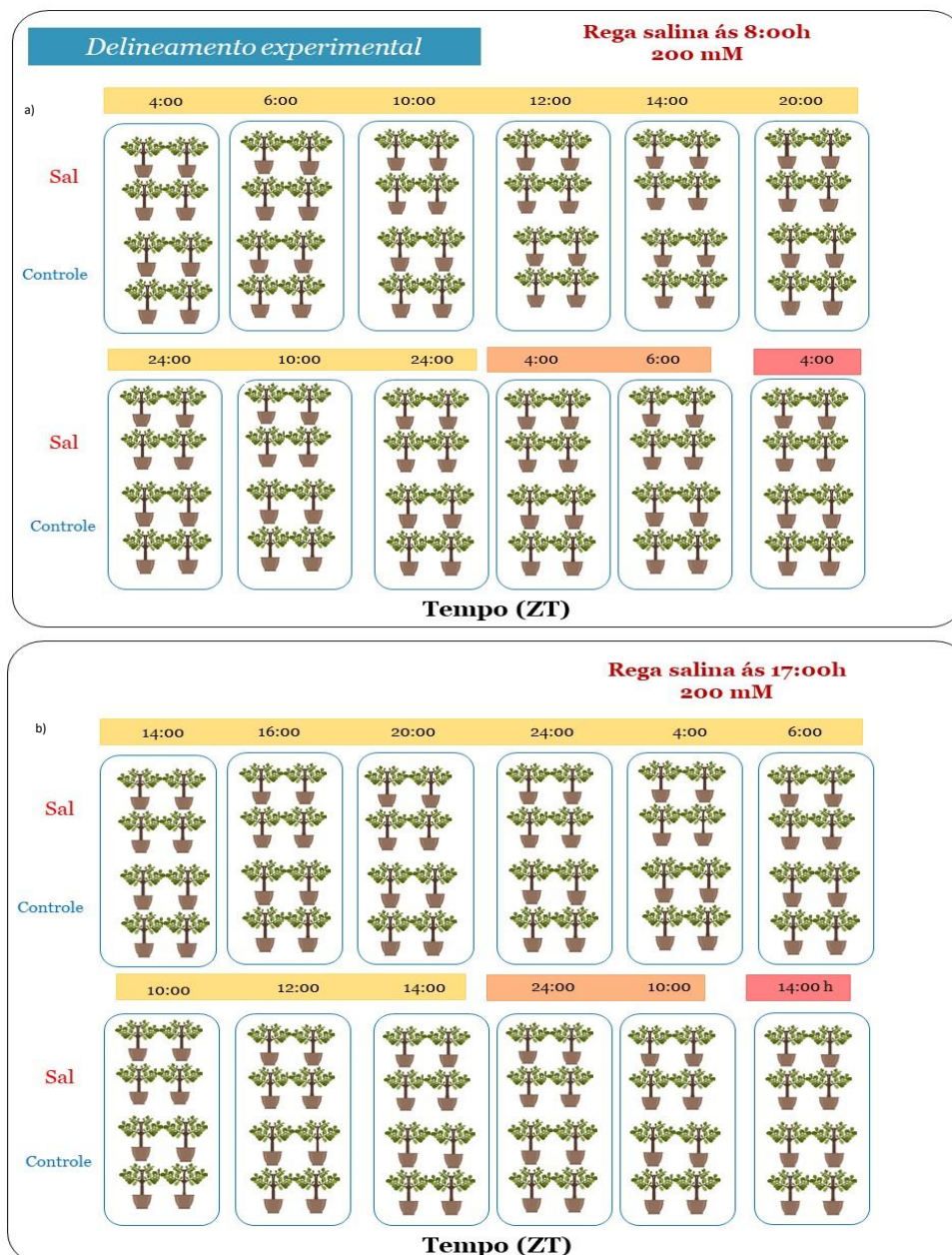
Thalman M, Pazmino D, Seung D, et al (2016) Regulation of Leaf Starch Degradation by Abscisic Acid Is Important for Osmotic Stress Tolerance in Plants. *Plant Cell* 28:1860–1878. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00143>

Thalman M, Santelia D (2017) Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytol* 214:943–951. <https://doi.org/10.1111/nph.14491>

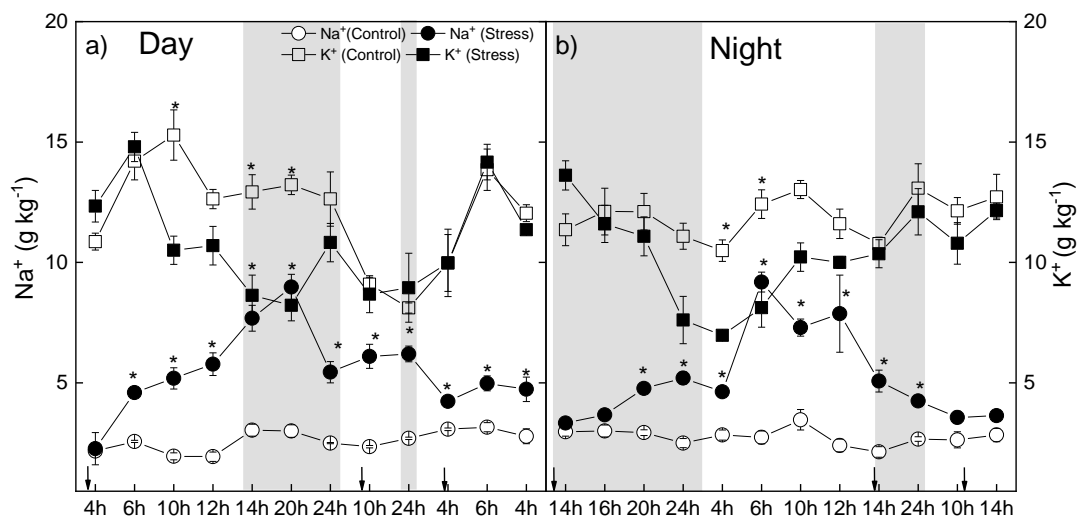
Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids* 35:753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>

Webb AAR, Satake A (2015) Understanding circadian regulation of carbohydrate metabolism in *Arabidopsis* using mathematical models. *Plant Cell Physiol* 56:586–593. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv033>

**Figura S1.** Esquema do delineamento experimental. Em cada momento de coleta (tempo ZT) foram coletadas amostras submetidas ao choque salino e controle. a) indica as coletas realizadas em plantas submetidas ao choque salino pela manhã (8:00) - Dia; b) indica as coletas realizadas em plantas submetidas ao choque salino no início da noite (17:00) - Noite.

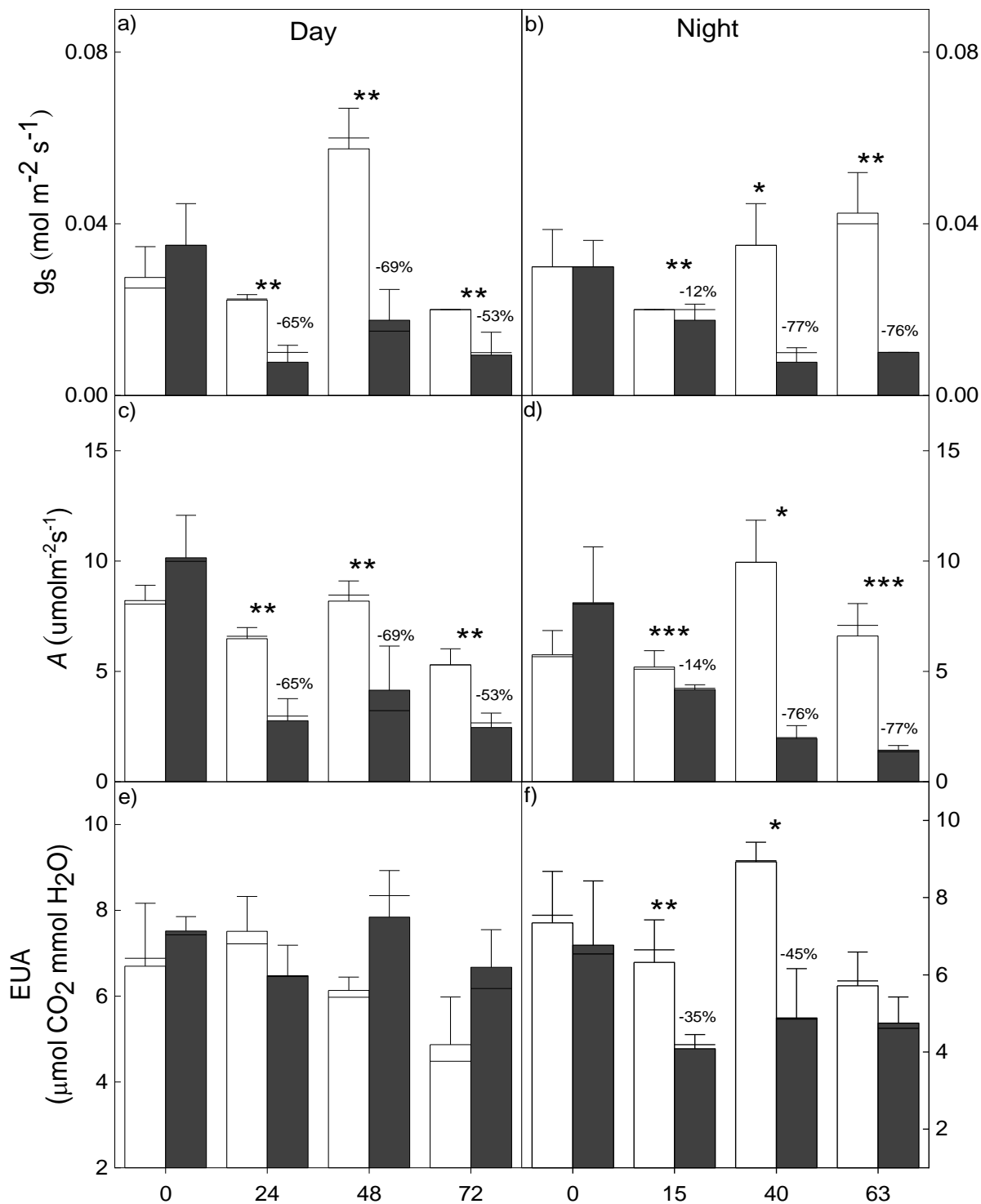


**Figura 1.** Concentração de sódio e potássio de folhas de plantas jovens de *C. pyramidalis* sob 72 horas de exposição ao choque salino (200 mmol de NaCl) em casa de vegetação (n=3±E.P). Valores seguidos por \* diferem entre si pelo teste T ou teste Mann-Whitney. ■ Coletas realizadas no período noturno. Setas indicam o momento da aplicação da solução salina.



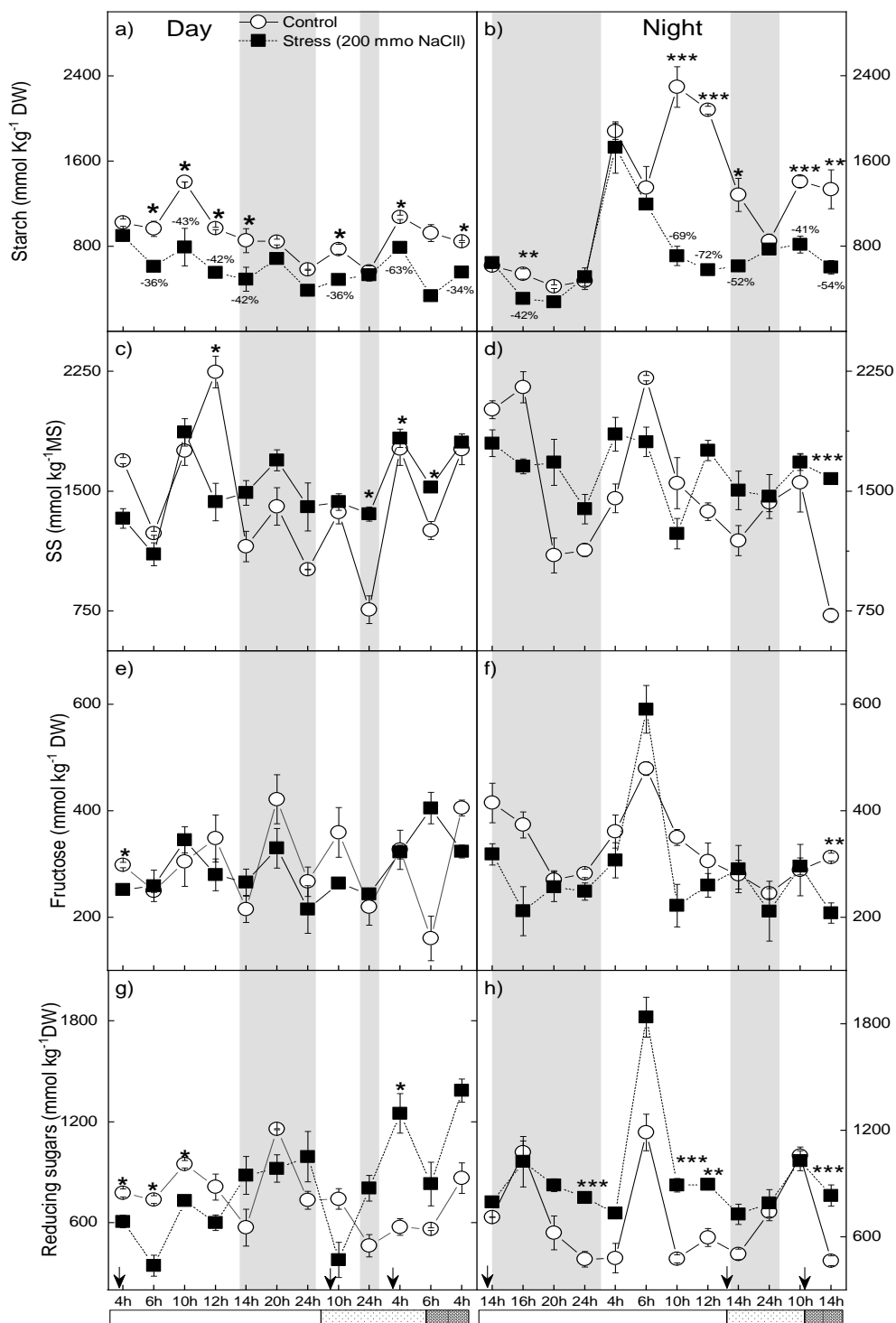
Fonte: A autora (2020).

**Figure 2.** Trocas gasosas nas folhas de plantas jovens de *C. pyramidalis* submetidas a choque salino em momentos diferentes do dia (8:00 horas – Day e 17:00 – Night) em casa de vegetação. As medidas foram realizadas sempre às 4 ZT (a primeira medida foi realizada antes da aplicação da rega salina em ambos os tratamentos, com objetivo de verificar as condições fisiológicas das plantas). As variáveis são: a, b - taxa fotossintética líquida (A); condutância estomática (gs); c, d - condutância estomática (gs); e, f - eficiência do uso da água (EUA); g, h - taxa de transpiração (E). (n = 4 E.P). \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001.



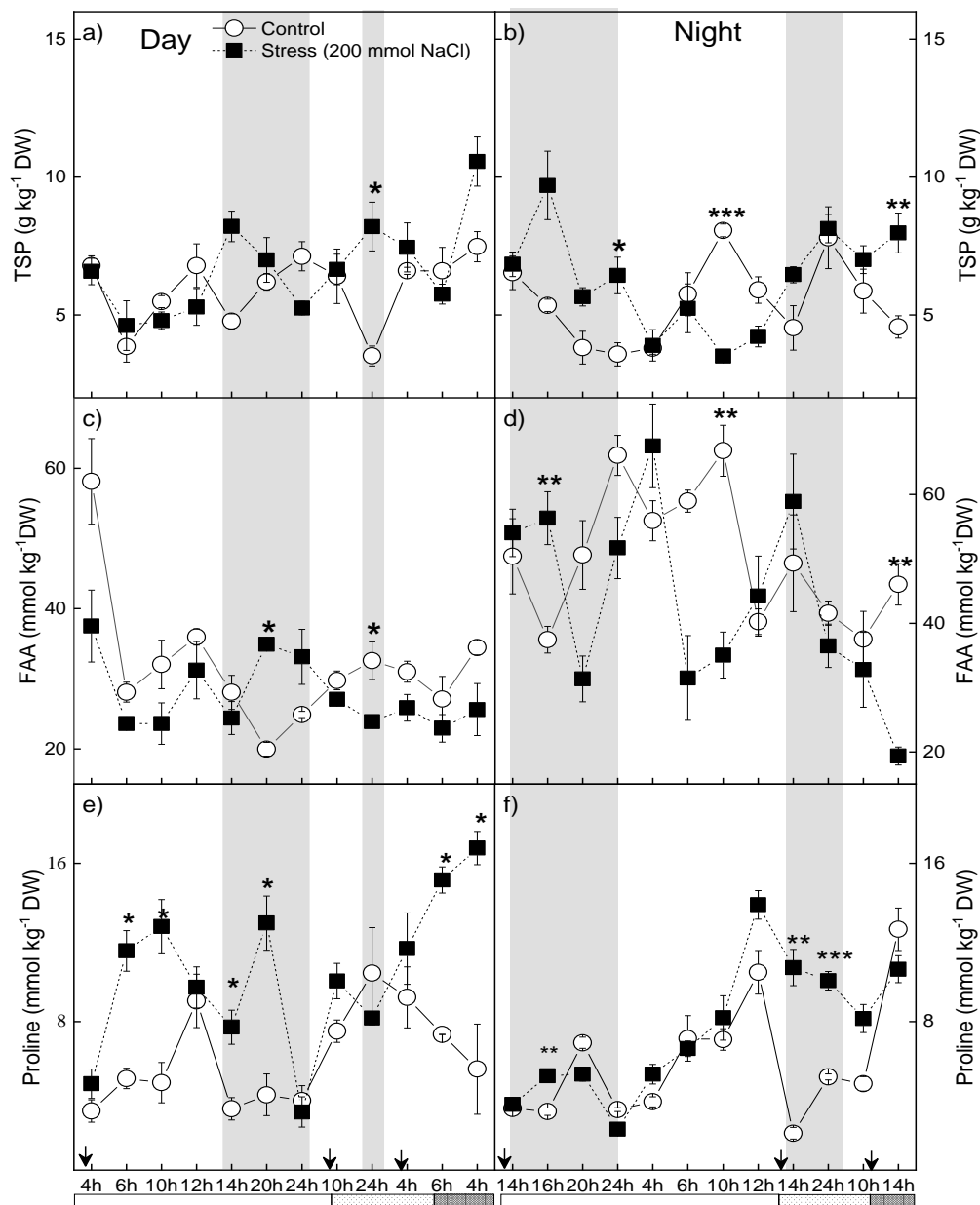
Fonte: A autora (2020).

**Figura 3.** (a-b) Amido, (c-d) açúcares solúveis (SS) e (e-f) frutose e (g-h) Açúcares redutores em plantas jovens de *C. pyramidalis* submetidas a choque salino em momentos diferentes do dia (8:00 horas – Day e 17:00 – Night). (n = 3 E.P). \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001. ■ Coletas realizadas no período noturno. Setas indicam o momento da aplicação da solução salina. Barras indicam: coleta realizadas nas primeiras 24 horas (branca), nas 48 horas (cinza clara) e 72 horas (cinza escuro).



Fonte: A autora (2020).

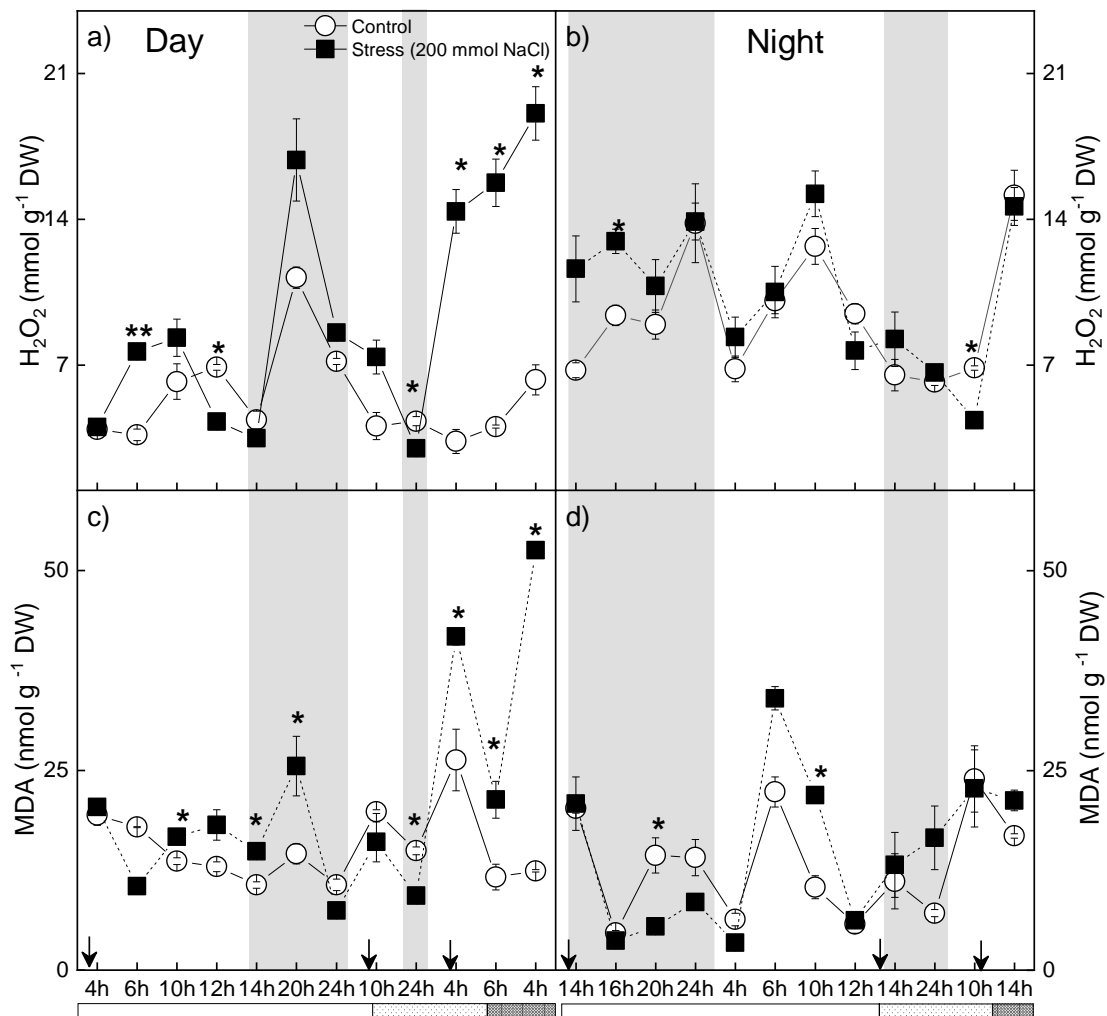
**Figura 4.** a-b) Aminoácidos, (c-d) proteínas solúveis totais (SS) e (e-f) prolina em plantas jovens de *C. pyramidalis* submetidas a choque salino em momentos diferentes do dia (8:00 horas – Day e 17:00 – Night). (n = 3 E.P). \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001. ■ Coletas realizadas no período noturno. Setas indicam o momento da aplicação da solução salina. Barras indicam: coleta realizadas nas primeiras 24 horas (branca), nas 48 horas (cinza clara) e 72 horas (cinza escuro).



Fonte: A autora (2020)

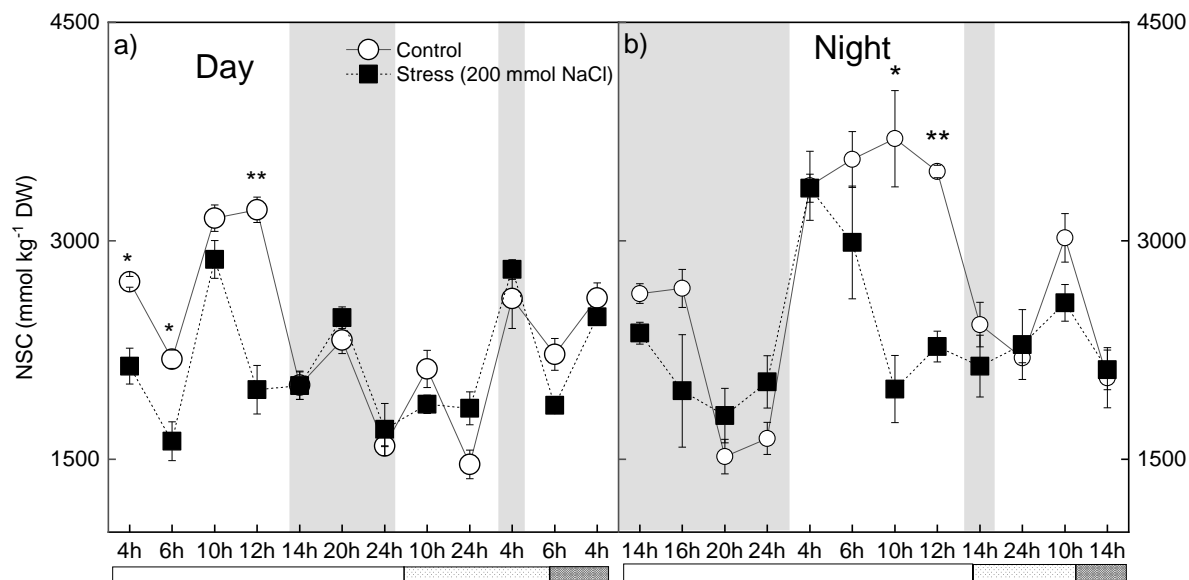


**Figura 5.** (a-b) peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e (c-d) MDA em plantas jovens de *C. pyramidalis* submetidas a choque salino em momentos diferentes do dia (8:00 horas – Day e 17:00 – Night). (n = 3 E.P). \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001. ■ Coletas realizadas no período noturno. Setas indicam o momento da aplicação da solução salina Barras indicam: coleta realizadas nas primeiras 24 horas (branca), nas 48 horas (cinza clara) e 72 horas (cinza escuro).



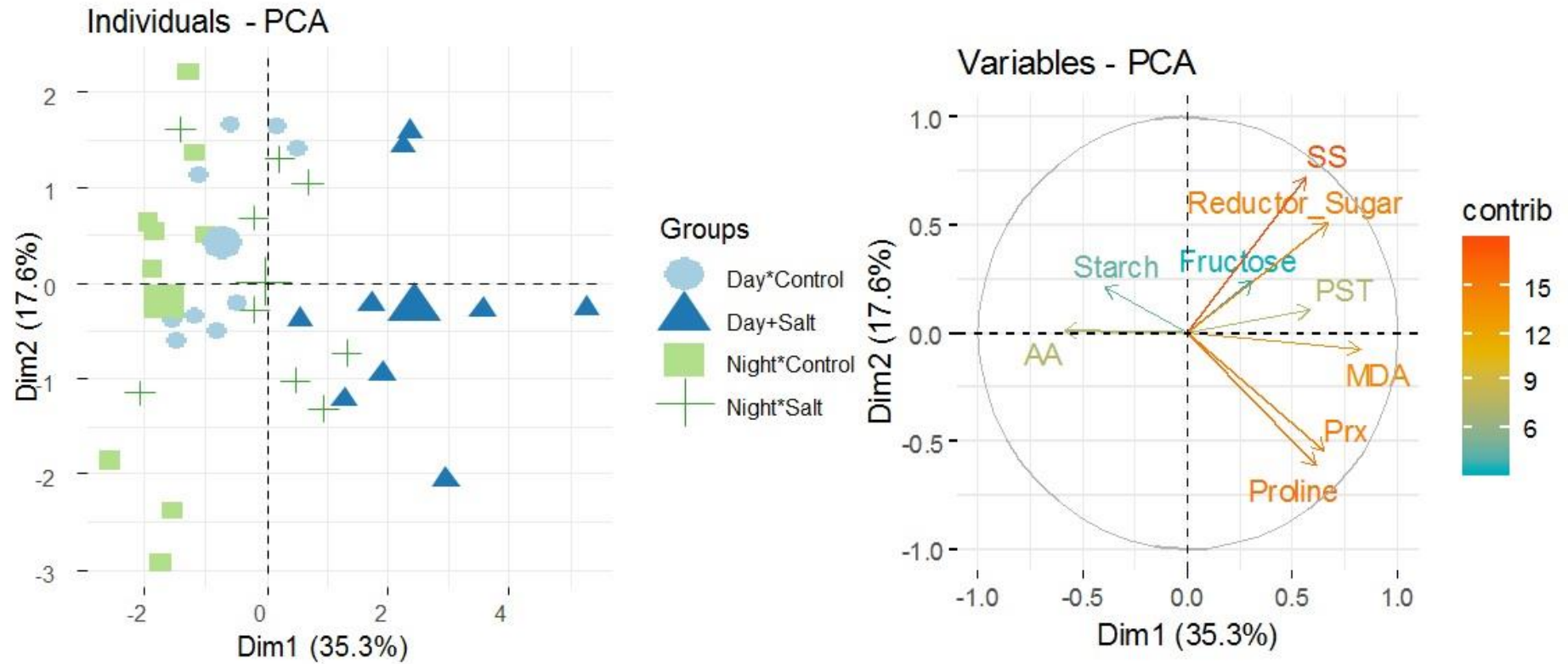
Fonte: A autora (2020).

**Figura 6.** (a-b) Teores de carboidratos não-estruturais em plantas jovens de *C. pyramidalis* submetidas choque salino em momentos diferentes do dia (8:00 horas – Day e 17:00 – Night). (n = 3 E.P). \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001. ■ Coletas realizadas no período noturno. Setas indicam o momento da aplicação da solução salina Barras indicam: coleta realizadas nas primeiras 24 horas (branca), nas 48 horas (cinza clara) e 72 horas (cinza escuro).



Fonte: A autora (2020).

**Figura 7.** Análise de componentes principais (PCA) baseada nos parâmetros bioquímicos de plantas jovens de *C. pyramidale* submetidas a choque salino em momentos diferentes do dia (8:00 horas – Day e 17:00 – Night). Foram utilizados os dados das três últimas coletas.



Fonte: A autora (2020)

**Tabela 1.** Fluorescência da clorofila em plantas jovens de *C. pyramidale* submetidas a salinidade (NaCl 200 mmol) (n = 4 ±E.P.). \* P <0.05 (t test at 5%).

Parameters	Control			Saline		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<b>Day</b>						
Fv/Fm	<b>0,72 ±0,03</b>	0,75 ±0,01	0,74 ±0,01	<b>0,77 ±0,01*</b>	0,71±0,01	0,75 ± 0,02
Fv'/Fm'	0,46 ±0,03	0,52 ±0,03	0,49 ±0,02	0,48±0,02	0,43±0,02	0,46 ±0,008
NPQ	0,15 ±0,06	0,32 ±0,1	0,58 ±0,1	0,44±0,15	0,37±0,09	0,58 ±0,15
QP	0,58 ±0,06	0,26 ±0,02	0,42 ±0,09	0,55±0,03	0,6 ±0,04	0,42 ±0,10
φPSII	0,40 ±0,06	<b>0,15±0,01*</b>	0,28 ±0,08	0,38±0,03	<b>0,39±0,04</b>	0,28 ±0,08
ETR	175,3±24,2	<b>171,4 ±15,</b>	<b>69,1 ±16,4*</b>	164,1±13	<b>66,3±4,6*</b>	<b>60,4 ±17,2</b>
	15h	40h	63h	15h	40h	63h
<b>Night</b>						
Fv/Fm	<b>0,71±0,02*</b>	0,75 ±0,02	0,74 ±0,03	<b>0,6 ±0,02</b>	0,72±0,02	0,72 ±0,02
Fv'/Fm'	0,48 ±0,03	0,46 ±0,03	0,46 ±0,02	0,46 ±0,03	0,41±0,03	0,42 ±0,02
NPQ	0,29 ±0,13	0,44 ±0,05	0,48 ±0,05	0,22 ±0,05	0,35±0,11	0,26 ±0,08
QP	0,6 ±0,03	0,58 ±0,06	0,51 ±0,03	0,43 ±0,08	0,65±0,03	0,62 ±0,03
φPSII	0,44±0,06	0,39±0,02	0,33±0,09	0,26 ±0,06	0,43±0,02	0,4 ±0,03
ETR	184 ±16,7	136,9±16,2	142,5 ±12,8	116,9 ±30,2	151,1±8,3	181,5 ±14,1

Fonte: A autora (2020).

**Tabela 2.** Resultados dos modelos de melhor ajuste ( $\Delta AIC_c < 2$ ) que examinaram as influências do fator fixo (sal) e aleatório (coleta) para cada parâmetro bioquímico analisado.

Fator do modelo	$\beta$	SE	Z	P-value	Fator do modelo	$\beta$	SE	Z	P-value
<b>Prolina</b>					<b>Proteína</b>				
Sal (200 mmol)					Sal (200 mmol)				
Sal*Dia	0.4454	0.1509	2.951	<b>0.00317 **</b>	Sal*Dia	0.05540	0.10621	0.522	0.6019
Controle*Noite	-0.2057	0.1032	-1.993	<b>0.04622 *</b>	Controle*Noite	-0.13110	0.06991	-1.875	0.0608 .
Sal*Noite	0.2093	0.1509	1.386	0.16560	Sal*Noite	-0.03127	0.10621	-0.294	0.7684
Efeito aleatório	0.0728	0.2698			Efeito aleatório	0.03835	0.1958		
Resíduo	0.1916	0.4377			Resíduo	0.08798	0.2966		
<b>Amido</b>					<b>SS</b>				
Sal (200 mmol)					Nulo				
Sal*Dia	-0.21061	0.12181	-1.73	0.08379 .	Sal*Dia	-	-	-	-
Controle*Noite	0.30474	0.10547	2.89	<b>0.00386 **</b>	Controle*Noite	-	-	-	-
Sal*Noite	-0.16574	0.12181	-1.36	0.17360	Sal*Noite	-	-	-	-
Efeito aleatório	0.02228	0.1493			Efeito aleatório	0.01220	0.1104		
Resíduo	0.20023	0.4475			Resíduo	0.07157	0.2675		
<b>Aminoácidos</b>					<b>Frutose</b>				
Sal (200 mmol)					Sal (200 mmol)				
Sal*Dia	-0.09491	0.08310	-1.14	0.253358	Sal*Dia	0.03128	0.07410	0.42	0.6729
Controle*Noite	0.37332	0.05980	6.24	<b>&lt;0.001 ***</b>	Controle*Noite	0.12487	0.05958	2.10	<b>0.0361 *</b>
Sal*Noite	0.29454	0.08310	3.54	<b>&lt;0.001 ***</b>	Sal*Noite	-0.01040	0.07410	-0.14	0.8884
Efeito aleatório	0.01997	0.1413			Efeito aleatório	0.01164	0.1079		

Resíduo 0.06437 0.2537

---

**Açúcares redutores**

Sal (200 mmol)

Sal*Dia	-0.005247	0.106962	-0.05	0.9609
Controle*Noite	-0.120775	0.068828	-1.75	0.0793 .
Sal*Noite	0.189193	0.106962	1.77	0.0769 .

Efeito aleatório 0.04022 0.2006

Resíduo 0.08527 0.2920

---

**MDA**

Sal (200 mmol)

Sal*Dia	0.1558	0.2103	0.741	0.4588
Controle*Noite	-0.2689	0.1080	-2.490	<b>0.0128 *</b>
Sal*Noite	-0.2882	0.2103	-1.370	0.1706

Efeito aleatório 0.1954 0.4420

Resíduo 0.2100 0.4583

---

Resíduo 0.06389 0.2528

---

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Sal (200 mmol)

Sal*Dia	0.26933	0.15916	1.692	0.090619 .
Controle*Noite	0.52899	0.08926	5.926	<b>&lt;0.001 ***</b>
Sal*Noite	0.57008	0.15916	3.582	<b>&lt;0.001 ***</b>

Efeito aleatório 0.1042 0.3228

Resíduo 0.1434 0.3787

---

p<0.1, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001. Variáveis significativas estão em negrito

Fonte: A autora (2020).

**4 ARTIGO 2**

---

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE SALINO NAS RESPOSTAS BIOQUÍMICAS DE  
*CENOSTIGMA PYRAMIDALE* (FABACEAE): RAÍZES E FOLHAS**

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO:

*Plant, cell and environment*

**Influência do estresse salino nas respostas bioquímicas de *Cenostigma pyramidale* (Fabaceae): raízes e folhas**

Laís Luana de Lima<sup>1</sup>, Gabriella Frosi<sup>1</sup>, Rafaela Lopes<sup>1</sup>, Ana Maria Benko-Iseppon<sup>2</sup>, Valesca Pandolfi<sup>2</sup>, Mauro Guida dos Santos<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>*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**

O estudo teve como objetivo caracterizar respostas bioquímicas (açúcares solúveis totais, prolina, peróxido de hidrogênio e MDA) em tecidos foliares e radiculares em plantas jovens de *Cenostigma pyramidale*, uma espécie lenhosa de alta representatividade da Caatinga, uma floresta tropical sazonalmente seca, após exposição ao choque salino. Foram coletados tecidos em cinco momentos (10 h, 30 h, 43h, 48h e 50h) após a exposição ao estresse. Em folhas, foram observadas alterações nas concentrações de MDA, com um aumento significativo após 30 h de exposição ao sal (aproximadamente 50%) e que se manteve após 48 (18%) e 50 h (111%). Alterações nos níveis de prolina foram observadas apenas no início do estresse (10 e 30 h), com mais de 100% de aumento em comparação ao controle. Com relação ao tecido radicular, a prolina apresentou uma regulação positiva ao longo do tempo, enquanto que as concentrações de aldeído malônico foram inicialmente altas no início do estresse (~ 20%), com reduções ao longo da exposição ao estresse, mas sempre superior ao controle.

**Palavras-chave:** estresse salino, *Cenostigma pyramidale*, aldeído malônico, prolina.

**ABREVIACÕES:** salinidade; solutos orgânicos; Chl *a*, clorofila *a*; Chl *b*, clorofila *b*; carboidratos solúveis totais; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrogênio, MDA, aldeído malônico.



## 1 INTRODUÇÃO

A salinização do solo é um risco ambiental predominante em todo planeta, especialmente em regiões áridas e semiáridas (Munns and Tester, 2008; Jorda, 2004; Schofield and Kirkby, 2003). Estima-se que aproximadamente um bilhão de hectares estão sob efeito desse estresse abiótico no mundo (Fao and Itps, 2015). No Nordeste Brasileiro, cerca de 30% das terras produtivas possuem algum grau de salinização, resultante, principalmente, de projetos de irrigação inadequados (Gorji; Tanik and Serbel, 2015). Encontrada na região Nordeste do Brasil, a Caatinga se insere no bioma de floresta tropical sazonalmente seca (Silva et al., 2017). Esta floresta sofre forte influência das irregularidades de chuva e aumento nas concentrações de sais no solo, devido elevada evapotranspiração e manejo inadequado do solo (Silva et al., 2017; Tabarelli et al., 2018). Logo, as plantas estabelecidas nesses ecossistemas estão frequentemente expostas a condições que levam ao estresse hídrico e/ou salino. Além disso, a Caatinga apresenta um elevado adensamento populacional que inserem outros tipos de perturbações a sua vegetação, pois as plantas se tornam recursos bastante utilizados pelas populações humanas e animais estabelecidas na região (Silva et al., 2017; Tabarelli et al., 2018).

O aumento nas concentrações de sais no solo submete a vegetação a uma condição ambiental desfavorável, devido aos impactos em sua homeostase, acarretando um prejuízo em seu crescimento e produtividade (Frosi et al., 2016; Jaarsma; de Vries and de Boer 2013; Polle and Chen, 2015; Singh, 2015). Entre os efeitos tóxicos resultantes do excesso de sais no solo destacam-se os danos nas estruturas enzimáticas e organelas, prejuízos no desempenho fotossintético, inibição na síntese proteica e deficiência iônica (Porcel; Aroca and Ruiz-Lozano, 2012). Diante dessa condição ambiental desfavorável, as plantas utilizam-se de respostas adaptativas, como ativação do sistema antioxidante enzimático e não enzimático e acúmulo de solutos orgânicos compatíveis, como prolina, glicina betaína e açúcares (Deinlein et al., 2014; Sami et al., 2016; Szabados and Savouré, 2010), para assegurar a homeostase osmótica, controlar e reparar os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio e estabelecer um novo ritmo de crescimento (Gill and Tuteja, 2010). O acúmulo de metabolitos orgânicos é uma estratégia observada por diversas espécies na tolerância a alta salinidade (Duarte et al., 2013; Frosi et al., 2017; Mittal, Kumari, and Sharma 2012). Esses solutos além de reestabelecer o fluxo de água em relação ao meio hipertônico, devido à redução da pressão osmótica, também atuam na eliminação dos radicais livres, na proteção das estruturas celulares e manutenção das

atividades enzimáticas (Kao, 2015; Ranney; Bassuk and Whitlow, 1991), podendo ser acumulados em altos níveis sem prejudicar as funções celulares (Slama et al., 2015). Ensaio experimentais que investigam as respostas ao aumento da salinidade no solo podem ser executados de duas maneiras: 1) através da exposição gradual, o estresse salino ou 2) pela aplicação instantânea a altos níveis de salinidade ( $\geq 150$  mM), i.e., o choque salino. Estudos moleculares já indicaram que vias diferentes são ativadas dependendo de como se dá a aplicação do sal. Apesar do choque salino ser incomum na natureza, estudos utilizando essa metodologia desenham um excelente cenário para investigar as repostas ao estresse osmótico e iônico (Shavrukov, 2013a).

*Cenostigma pyramidale* (Tul.) L.P. Queiroz, popularmente conhecida como ‘catingueira’ é uma Fabaceae lenhosa que é bastante explorada devido ao interesse madeireiro (Silva et al., 2009), medicinal (Alviano et al., 2008). Sendo assim estudos que investiguem a tolerância de espécies, como *C. pyramidale*, nativa, abundante e de interesse social, a condições adversas extremas se faz necessário para contribuir com informações para estudos destinados a recuperação/restauração ambiental.

Diante do exposto, nosso estudo teve como objetivo caracterizar as repostas bioquímicas de *C. pyramidale* sob choque salino, baseado na hipótese de que o sistema radicular dessa espécie apresenta um acúmulo mais rápido e acentuado de solutos orgânicos, principalmente carboidratos e prolina, em relação às folhas para minimizar o estresse oxidativo e manter o fluxo de água e a captação de nutrientes diante de uma redução do potencial osmótico.

## **2 MATERIAS E MÉTODOS**

### **2.1 Condições de crescimento, material vegetal e delineamento experimental**

O experimento foi realizado na casa de vegetação do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, localizada em Recife, região Nordeste do Brasil (8°08'58'S, 34°56'55'W), a uma temperatura média de  $34 \pm 2$  °C, umidade relativa de 40-60% e luz natural (fluxo máximo de luz:  $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

As sementes de *Cenostigma pyramidale* (Fabaceae) foram germinadas em vasos contendo 5 kg de areia lavada e mantidas em casa de vegetação por seis meses. Até o início do experimento as plantas foram mantidas em hidratação ideal (capacidade de pote de 250 mL). Foi adicionada solução nutritiva de Hoagland (força total), a cada 15 dias, a

fim de suprir a demanda de nutrientes necessários para o pleno desenvolvimento das plantas. Posteriormente, as plantas foram submetidas a dois tratamentos: 1) Controle: plantas regadas todos os dias com água deionizada na capacidade de pote e 2) Choque salino: plantas regadas todos os dias com solução salina de 200 mM de NaCl. Cada tratamento foi composto por 25 indivíduos. Para determinação dos tempos de coleta do material vegetal foi utilizado como referência o momento inicial de aplicação da salinidade (8:00 h). Por fim, foram coletadas folhas e raízes dentro das primeiras 50 h após exposição à salinidade, nos tempos 10 h, 30h, 43h, 48h e 50h. Os dados fisiológicos e de concentração foliar interna de NaCl estão descritos na tabela 1.

## 2.2 Análises bioquímicas

Para análise dos solutos orgânicos foram utilizadas folhas e raízes coletadas nos diferentes tempos após o início da imposição da salinidade (10 h, 30h, 43h, 48h e 50h). Os tecidos vegetais coletados foram utilizados para quantificação de carboidratos solúveis totais (SS), prolina, clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), carotenoides (Car) (Lichtenthaler and Buschmann, 2005), aldeído malônico (MDA) (Cakmak and Horst, 1991) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Alexieva et al., 2001). As análises foram determinadas em espectrofotômetro com duplo feixe ajustado ao comprimento de onda específico para cada composto orgânico. Todas as amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a - 80 °C.

## 2.3 Análises estatísticas

Os dados das variáveis bioquímicas foram submetidos ao teste T (ou Wilcox quando não atendidos os pré-requisitos do teste) para comparação das médias (controle × choque salino) com nível de significância de 5 %. Os dados que não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade foram submetidos ao teste Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Os dados das variáveis bioquímicas (SS, prolina, MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram submetidos a uma análise de regressão linear com R<sup>2</sup> ajustado ( $p < 0,05$ ). Os modelos dos tratamentos foram comparados com análise de covariância e as análises foram realizadas considerando o fator sal e o tempo de exposição ao sal como covariável. Uma análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para verificar se houve uma tendência de agrupamento entre os tratamentos, além de identificar quais eram as variáveis mais

influentes na separação dos possíveis grupos. Para essa análise multivariada foram utilizados os pacotes Factoextra (Kassambara e Mundt, 2017), PCAmixdata e ggplot2. Para todas as análises foi utilizado o software R 3.5.1 (R Core Team, 2018).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Resposta bioquímica de folhas e raízes

O aumento da salinidade desencadeou alterações no metabolismo nas folhas de *C. pyramidale* dentro das 50 h da aplicação do choque salino. Após 10h de exposição a alta salinidade foi observada um aumento da prolina e MDA (127%), na parte aérea (Fig. 2 a e 4 c). Já no tecido radicular, aumento significativo foi observado apenas na concentração de MDA (139%) (Fig. 4 d). Na segunda coleta, realizada após 30h da exposição ao choque salino, os níveis de prolina e MDA se mantiveram altos em relação as plantas controle (197% e 37%) nas folhas (Fig. 2 a; Fig. 1 c). Os aumentos dessas variáveis também foram mais altos no tecido radicular, de 255% para o MDA (Fig. 1 c) e 126% para a prolina (Fig. 2 b). Interessantemente, após 43h de exposição a rega salina foi observado um aumento de carotenoides (200%) nas plantas sob choque salino, sendo essa resposta a única observada no tecido foliar, nesse momento de coleta (Fig. 4 c). No tecido radicular, para esse mesmo tempo de exposição, os níveis de prolina e MDA ainda se mantiveram significativamente altos em relação as plantas controle, 207 e 94%, respectivamente (Fig. 3 b; Fig. 4 d). Na coleta realizada após 48h, a parte aérea apresentou aumento significativo nos pigmentos fotossintéticos (Chl *a*, Chl *b* e Car) (Fig. 1 a, b, c) e MDA (Fig. 1 c), no entanto foi observado uma redução de aproximadamente 50% nos teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 1 a). No tecido radicular, os níveis de prolina, MDA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permaneceram estatisticamente mais altos que as plantas controle (Fig. 3 b; Fig. 4 b, d).

A última coleta realizada após 50h de exposição a rega salina, os níveis de pigmentos fotossintéticos se mantiveram mais altos nas plantas submetidas ao sal (Fig. 4 a, b, c), além dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA (Fig. 1 a, c). No entanto, os níveis de carboidratos de solúveis totais (SS) passaram a ser estatisticamente mais altos que as plantas controle (aumento de 60%) (Fig. 3 a). Um aumento de aproximadamente 100% na concentração dos SS também foi observado no tecido radicular (Fig. 3 b), acompanhado com o aumento nos níveis de prolina e MDA, 159 e 53% respectivamente (Fig. 3 a; Fig. 4 d).

### 3.2 Ancova

Através das regressões lineares foi possível observar que na parte aérea, apenas a prolina apresentou uma tendência de queda em suas concentrações ao longo do tempo de exposição ao sal (Fig. 5 c). Para essas variáveis as linhas de regressão entre os tratamentos diferiram quanto a inclinação. Para as demais variáveis (SS, MDA e  $H_2O_2$  – Fig. 5 a, e, g) analisadas não foram observadas nenhuma relação linear.

No sistema radicular, as plantas apresentaram um aumento nas concentrações de prolina com o tempo de exposição ao sal. Por outro lado, as plantas controles apresentaram uma diminuição ao longo do tempo do experimento (Fig. 5 d) e as concentrações de MDA apresentaram uma tendência de diminuição ao longo do experimento (Fig. 5 f).

### 3.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

Uma análise de componentes principais foi realizada para *C. pyramidale* considerando as variáveis bioquímicas analisadas, para o sistema radicular e parte aérea, considerando todos os pontos amostrados dentro das 50 h após aplicação da solução salina. Para a parte aérea as variáveis foram capazes de explicar 80,4% da variação dos dados, no entanto alguns tempos de coleta (10 h e 43 h) permaneceram agrupados as plantas controle. Para DIM 1, as variáveis mais importantes foram carotenoides, clorofila *b* e *a*, respectivamente. Já para DIM 2, foram peróxido, açúcares solúveis totais e MDA (Fig. 6 b). Já para o sistema radicular, os dados foram capazes de explicar 71,43% da variação dos dados, considerando os dois primeiros componentes principais. Houve formação de dois grandes grupos, em função da salinidade, seguindo ao longo da DIM 1, sendo as variáveis mais relevantes a prolina e o MDA, sendo essa componente responsável por explicar 51,7% dessa variação. Já a DIM 2 explicou 19,7% da variação tendo como mais variáveis com maiores valores de contribuição os açúcares solúveis totais (SS) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Fig. 6 a).

## 4 DISCUSSÃO

Ensaio com choque salino são uma excelente oportunidade de observar as respostas simultâneas da planta aos efeitos do choque osmótico, que são mais

proeminentes no tecido radicular e o estresse iônico na parte aérea (Shavrukov, 2013b). *C. pyramidale* parece investir em prolina como ajustamento inicial à resposta ao estresse salino, em se tratando de osmorregulador. Aumentos significativos já foram observados após 10h em folhas, sendo está uma resposta rápida quando considerado que alterações nesse parâmetro só puderam ser observadas após 30h no tecido radicular. Embora o acúmulo de prolina seja uma resposta importante e bem aceita nem sempre ocorre uma boa correlação entre o acúmulo de prolina e o tempo de estresse (Jaarsma et al., 2013). No entanto, no tecido radicular esse comportamento foi observado, demonstrando que essa espécie investe nesse aminoácido como umas das primeiras estratégias para suportar a alta salinidade, e mantém esse aumento à medida que aumenta o tempo de exposição ao sal. A prolina é um aminoácido multifuncional com funções relacionadas à proteção da integridade de proteínas e enzimas (Szabados and Savouré, 2010) e estudos têm apontado que esta pode atuar na eliminação de ROS devido a sua relação com a atividade de enzimas antioxidantes (Verbruggen and Hermans, 2008). Foi observado que plantas com a mutação de *P5CSI* na prolina mostraram atividade significativamente mais baixa, em relação às selvagens, nas enzimas do ciclo glutatona-ascobarto sob salinidade. Foi sugerido que o acúmulo de prolina pode estar envolvido na estabilidade ou atividade dessas enzimas (Strizhov and Ja, 2008). Logo, a utilização de uma molécula que oferta múltiplos benefícios pode ser uma estratégia eficiente para tolerar uma condição tão adversa, como um choque salino.

Associada ao estresse salino, a rápida diminuição do potencial hídrico, principalmente em condições de choque, ocorre um desequilíbrio, devido aos excessos de íons ou deficiência nutricional (Munns and Tester, 2008). Isso acaba resultando na liberação de elétrons em estados de alta energia que acabam sendo transferidos para o oxigênio molecular, formando espécies reativas de oxigênio (ROS), como o  $H_2O_2$  (Foyer and Noctor, 2005). As plantas submetidas ao choque salino apresentaram acúmulos pontuais (após 48h em raiz e 50h em folhas), no entanto, valores significativamente mais altos de MDA foram observados durante todo o experimento, indicando que outras espécies reativas de oxigênio, como  $^1O_2$ ,  $O_2^-$  e  $HO\cdot$  (Miller et al., 2010), podem ter contribuído em maior peso pelo dano oxidativo, caracterizado pelo acúmulo de MDA. Ainda assim, em folhas, foi observada uma correlação positiva entre o  $H_2O_2$  e o SS (cor=0.72; p=0.002) e o MDA (cor=0.54; p 0.037), demonstrando que este também é responsável pelo acúmulo desses compostos. ROS também possuem papel fundamental na transmissão de sinais envolvidos na resposta ao estresse (Farmer and Mueller, 2013) e

interage com outras redes de sinalização que regulam a aclimação da planta, incluindo a fosforilação de cálcio, hormônios e proteínas (Miller et al., 2010). Apesar da mensuração do MDA ser amplamente utilizada como uma resposta ao estresse oxidativo (Rivas et al., 2013; Huang et al., 2014) sua produção pode ser induzida pela lipoxigenase, geralmente benéfico responsável pela produção de reguladores, ou produção de ROS (Farmer and Mueller, 2013). Em nosso ensaio os níveis de MDA nas plantas submetidas a salinidade se mantiveram altos em relação as plantas controle, no entanto, o tecido radicular apresentou relação negativa como o tempo de exposição ao sal. Estudos recentes vem apontando que um aumento transitório do MDA podem indicar processos de aclimação e não dano e ainda, que essa molécula pode exercer diferentes funções como ativação de genes reguladores envolvidos na tolerância, proteção celular e ativação do sistema antioxidante (Morales and Munné-Bosch, 2019). No entanto, a interpretação correta se os níveis de MDA são transitórios ou se mantem constantemente altos só será possível com a mensuração dessa variável em vários pontos de coleta dentro do experimento, pois medidas pontuais podem levar a equívocos quanto a função real exercida por essa molécula.

Em nosso experimento podemos verificar que a exposição ao sal, levou ao acúmulo de clorofila a, b e carotenoides. O aumento de carotenoides já foi relacionado com a tolerância a estresses abióticos (Duarte et al., 2013b; Frosi et al., 2017), inclusive já foi demonstrado que tal mecanismo envolvendo pigmentos associa alterações fisiológicas e genéticas. Nesse último caso a repressão de um gene, regula o conteúdo de  $\beta$ -caroteno, carotenoides totais e capacidade antioxidante, sugerindo que níveis aumentados desses pigmentos contribuem para a tolerância ao estresse salino (Kim et al., 2012). O aumento da concentração de pigmentos fotossintéticos pode ter contribuído para minimizar os danos da peroxidação lipídica no tecido foliar, uma vez que quando comparado ao tecido radicular, as plantas submetidas a salinidade apresentaram valores mais próximos do controle. Além disso, a ação fotoprotetora desempenhada pelos carotenoides pode ajudar a dissipar o excesso de energia, impedindo danos a maquinaria fotossintética (Latowski; Szymanska and Strzałka, 2013). O aumento na concentração de pigmentos também foi observado por Frosi et al. (2017), com a mesma espécie sob salinidade de 100 mM.

Quanto ao carboidrato, seu aumento significativo na concentração só pode ser observado após 50 h de exposição ao sal, em ambos os tecidos. Indicando que o acúmulo dessas macromoléculas é uma resposta mais tardia para essa espécie em condições de

estresse salino. O acúmulo de carboidratos, especialmente sacarose, frutose, trealose, rafinose e frutanos, que são osmólitos compatíveis, contribuem para redução do potencial osmótico contribuindo assim na tolerância, sendo uma reposta amplamente descrita em espécies submetidas a salinidade (Sami et al., 2016). Além disso, estudos já demonstraram o papel sinalizador dos carboidratos (Rolland; Moore and Sheen 2002) controlando processos a níveis transcricionais, pós transcricionais e pós-traducionais (Bläsing et al., 2005).

Em conclusão, o choque salino em *C. pyramidale*, nas primeiras 50h de exposição, promoveu alterações no acúmulo de açúcares solúveis totais, tanto em tecido radicular como foliar. Em folhas as repostas no acúmulo de prolina foi rápida, porém transitória, tendo esse tecido investido principalmente em pigmentos fotossintéticos para atenuar os efeitos da chegada de Na<sup>+</sup>. Provavelmente o acúmulo de prolina foi uma estratégia investida devido as características multifuncionais desse aminoácido. E ainda, o aumento nas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA parece estar ligado mais a atuação dessas moléculas como sinalizadoras do que na caracterização de uma possível desregulação em seu status redox. Estudos que investiguem o papel sinalizador do MDA e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no sistema antioxidativo podem fornecer informações importantes de como essa espécie consegue tolerar uma condição de alta salinidade tão severa.

## **AGRADECIMENTOS**

Laís Luana de Lima agradece a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de estudos (IBPG-0852-2.03/15). Laís Luana de Lima e Mauro G. dos Santos são gratos pela infraestrutura e equipamentos dos Laboratórios de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco (LFV-UFPE), Laboratório de Química de Solos (UFRPE) e Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal (PPGBV-UFPE) que permitiram a execução do trabalho.

## **REFERÊNCIAS**

- Alviano, W.S., et al. 2008. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Arch. Oral Biol.* 53, 545–552.
- Alexieva, V., I. Sergiev, S. Mapelli, and E. Karanov. 2001. “The Effect of Drought and Ultraviolet Radiation on Growth and Stress Markers in Pea and Wheat.” *Plant, Cell*



and *Environment* 24(12):1337–44.

- Bläsing, Oliver E., Yves Gibon, Manuela Günther, Melanie Höhne, Rosa Morcuende, Daniel Osuna, Oliver Thimm, Björn Usadel, Wolf Rüdiger Scheible, and Mark Stitt. 2005. “Sugars and Circadian Regulation Make Major Contributions to the Global Regulation of Diurnal Gene Expression in Arabidopsis.” *Plant Cell* 17(12):3257–81.
- Deinlein, Ulrich, Aaron B. Stephan, Tomoaki Horie, Wei Luo, Guohua Xu, and Julian I. Schroeder. 2014. “Plant Salt-Tolerance Mechanisms.” *Trends in Plant Science* 19(6):371–79.
- Duarte, B., D. Santos, J. C. Marques, and I. Caçador. 2013. “Ecophysiological Adaptations of Two Halophytes to Salt Stress: Photosynthesis, PS II Photochemistry and Anti-Oxidant Feedback - Implications for Resilience in Climate Change.” *Plant Physiology and Biochemistry* 67:178–88.
- Dutra, Valquíria F., Maria Cristina Teixeira Braga Messias, and Flávia Cristina P. Garcia. 2005. “Papilionoideae (Leguminosae) Nos Campos Ferruginosos Do Parque Estadual Do Itacolomi , Minas Gerais, Brasil: Florística e Fenologia.” *Revista Brasileira de Botânica* 28(3):493–504.
- FAO and ITPS. 2015. “Global Soil Status, Processes and Trends.” P. 608 in *Status of the World's Soil Resources*, edited by L. Caon, N. Forlano, M. Keene, C4Sala, A. Sorokin, I. Verbeke, and C. Ward. Rome.
- Farmer, Edward E. and Martin J. Mueller. 2013. “ROS-Mediated Lipid Peroxidation and RES-Activated Signaling.” *Annual Review of Plant Biology* 64(February):1–22.
- Foyer, Christine H. and Graham Noctor. 2005. “Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses.” *The Plant Cell* 17(July):1866–75.
- Frosi, G., V. A. Barros, M. T. Oliveira, U. M. T. Cavalcante, L. C. Maia, and M. G. Santos. 2016. “Increase in Biomass of Two Woody Species from a Seasonal Dry Tropical Forest in Association with AMF with Different Phosphorus Levels.” *Applied Soil Ecology* 102:46–52.
- Frosi, Gabriella, Vanessa Andrade Barros, Marciel Teixeira Oliveira, Mariana Santos, Diego Gomes Ramos, Leonor Costa Maia, and Mauro Guida Santos. 2017. “Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Foliar Phosphorus Inorganic Supply Alleviate Salt Stress Effects in Physiological Attributes, but Only Arbuscular Mycorrhizal Fungi Increase Biomass in Woody Species of a Semiarid Environment.” *Tree Physiology* 38(January):25–36.
- Gill, Sarvajeet Singh and Narendra Tuteja. 2010. “Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants.” *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12):909–30.
- Gorji, Taha, Aysegul Tanik, and Elif Serbel. 2015. “Soil Salinity Prediction, Monitoring and Mapping Using Modern Technologies.” *Procedia Earth and Planetary Science* 15:507–12.
- Huang, Chengjian, Gang Wei, Yucheng Jie, Longchang Wang, Hangfei Zhou, Chunyan

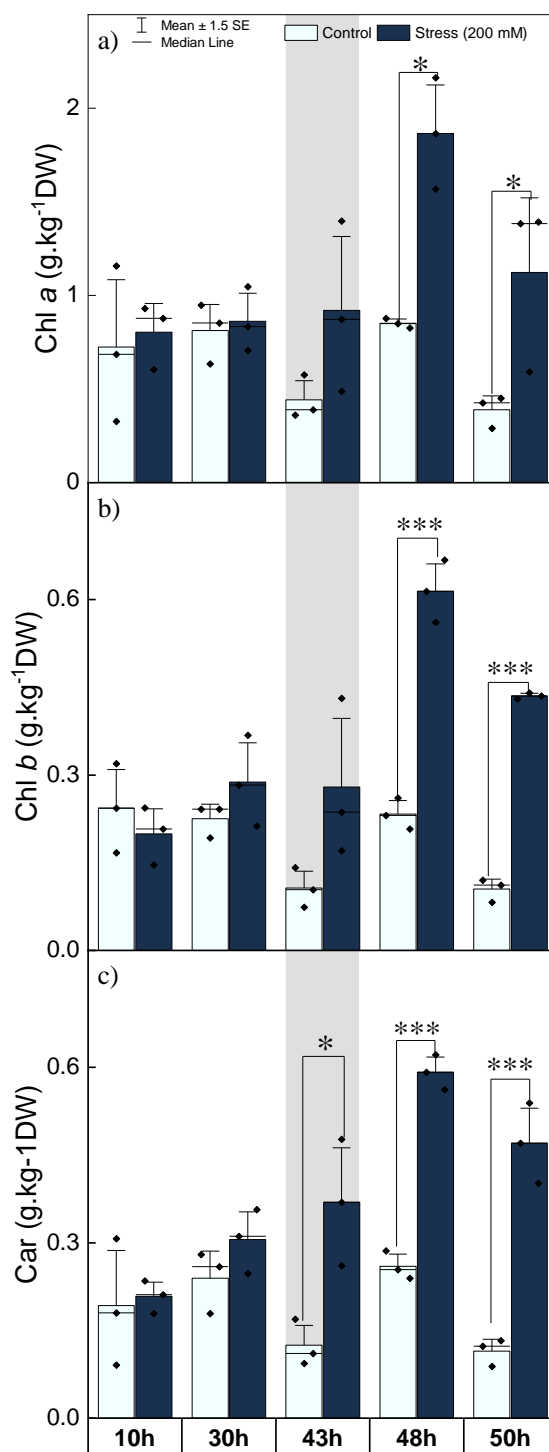
- Ran, Zaocun Huang, Huijuan Jia, and Shakeel Ahmad Anjum. 2014. "Effects of Concentrations of Sodium Chloride on Photosynthesis, Antioxidative Enzymes, Growth and Fiber Yield of Hybrid Ramie." *Plant Physiology and Biochemistry* 76:86–93.
- Jaarsma, Rinse, Rozemarijn S. M. de Vries, and Albertus H. de Boer. 2013. "Effect of Salt Stress on Growth, Na<sup>+</sup> Accumulation and Proline Metabolism in Potato (*Solanum Tuberosum*) Cultivars." *PLoS ONE* 8(3).
- Jorda, M. M. 2004. "Spatial Dynamics of Soil Salinity under Arid and Semi-Arid Conditions: Geological and Environmental Implications." 448–56.
- Kao, Ching Huei. 2015. "Mechanisms of Salt Tolerance in Rice Plants: Compatible Solutes and Aquaporins." *Crop, Environment & Bioinformatics* 12(September):73–82.
- Kim, Sun Ha, Young Ock Ahn, Mi Jeong Ahn, Haeng Soon Lee, and Sang Soo Kwak. 2012. "Down-Regulation of  $\beta$ -Carotene Hydroxylase Increases  $\beta$ -Carotene and Total Carotenoids Enhancing Salt Stress Tolerance in Transgenic Cultured Cells of Sweetpotato." *Phytochemistry* 74:69–78.
- Latowski, Dariusz, Renata Szymanska, and Kazimierz Strzałka. 2013. *Carotenoids Involved in Antioxidant System of Chloroplasts*. Elsevier Inc.
- Lichtenthaler, Hartmut K. and Claus Buschmann. 2005. "Chlorophylls and Carotenoids: Measurement And Characterization by UV-VIS Spectroscopy." *Handbook of Food Analytical Chemistry* 2–2:171–78.
- Miller, G. A. D., Nobuhiro Suzuki, Sultan Ciftci-yilmaz, and R. O. N. Mittler. 2010. "Reactive Oxygen Species Homeostasis and Signalling." *Plant Cell and Environment* 33:453–67.
- Mittal, Shweta, Nilima Kumari, and Vinay Sharma. 2012. "Differential Response of Salt Stress on Brassica Juncea: Photosynthetic Performance, Pigment, Proline, D1 and Antioxidant Enzymes." *Plant Physiology and Biochemistry* 54:17–26.
- Morales, Melanie and Sergi Munné-Bosch. 2019. "Malondialdehyde: Facts and Artifacts." *Plant Physiology* 180(3):1246–50.
- Munns, Rana and Mark Tester. 2008. "Mechanisms of Salinity Tolerance." *Annual Review of Plant Biology* 59(1):651–81.
- Polle, Andrea and Shaoliang Chen. 2015. "On the Salty Side of Life: Molecular, Physiological and Anatomical Adaptation and Acclimation of Trees to Extreme Habitats." *Plant, Cell and Environment* 38(9):1794–1816.
- Porcel, Rosa, Ricardo Aroca, and Juan Manuel Ruiz-Lozano. 2012. "Salinity Stress Alleviation Using Arbuscular Mycorrhizal Fungi. A Review." *Agronomy for Sustainable Development* 32(1):181–200.
- Ranney, Thomas G., Nina L. Bassuk, and Thomas H. Whitlow. 1991. "Osmotic Adjustment and Solute Constituents in Leaves and Roots of Water-Stressed Cherry (*Prunus*) Trees." *Journal American Society Horticultural Science* 116(4):684–88.

- Rivas, Rebeca, Marciel T. Oliveira, and Mauro G. Santos. 2013. "Three Cycles of Water Deficit from Seed to Young Plants of *Moringa Oleifera* Woody Species Improves Stress Tolerance." *Plant Physiology and Biochemistry* 63:200–208.
- Rolland, Filip, Brandon Moore, and Jen Sheen. 2002. "Sugar Sensing and Signaling in Plants." *The Plant Cell* 14(suppl 1):S185–205.
- Sami, Fareen, Mohammad Yusuf, Mohammad Faizan, Ahmad Faraz, and Shamsul Hayat. 2016. "Role of Sugars under Abiotic Stress." *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Schofield, R. V and M. J. Kirkby. 2003. "Application of Salinization Indicators and Initial Development of Potential Global Soil Salinization Scenario under Climatic Change." *Global Biogeochemical Cycles* 17(3):1–13.
- Shavrukov, Yuri. 2013a. "Salt Stress or Salt Shock: Which Genes Are We Studying?" *Journal of Experimental Botany* 64(1):119–27.
- Shavrukov, Yuri. 2013b. "Salt Stresse or Salt Shock: Which Genes Are We Studing?" *Journal of Experimental Botany* 63(2):695–709.
- Silva, L.B., et al. 2009. Anatomia e densidade básica da madeira de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae), espécie endêmica da caatinga do Nordeste do Brasil. *Acta Bot. Bras.* 23, 436-445.
- Silva, J.M.C., Leal, I.R., Tabarelli, M. 2017. Caatinga The Largest Tropical Dry Forest Region in South America. *Springer International Publishing*, Cahm. p.482.
- Singh, Ajay. 2015. "Soil Salinization and Waterlogging: A Threat to Environment and Agricultural Sustainability." *Ecological Indicators* 57:128–30.
- Slama, Inès, Chedly Abdelly, Alain Bouchereau, Tim Flowers, and Arnould Savoure. 2015. "Diversity, Distribution and Roles of Osmoprotective Compounds Accumulated in Halophytes under Abiotic Stress." *Annals of Botany*.
- Strizhov, Nicolai and Jan Ja. 2008. "Duplicated P5CS Genes of *Arabidopsis* Play Distinct Roles in Stress Regulation and Developmental Control of Proline Biosynthesis." *The Plant Journal* 53:11–28.
- Szabados, László and Arnould Savouré. 2010. "Proline: A Multifunctional Amino Acid." *Trends in Plant Science* 15(2):89–97.
- Verbruggen, Nathalie and Christian Hermans. 2008. "Proline Accumulation in Plants: A Review." *Amino Acids* 35(4):753–59.
- Tabarelli, M., et al. 2018. Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade. *Ciência e Cultura* 70, 25-29.

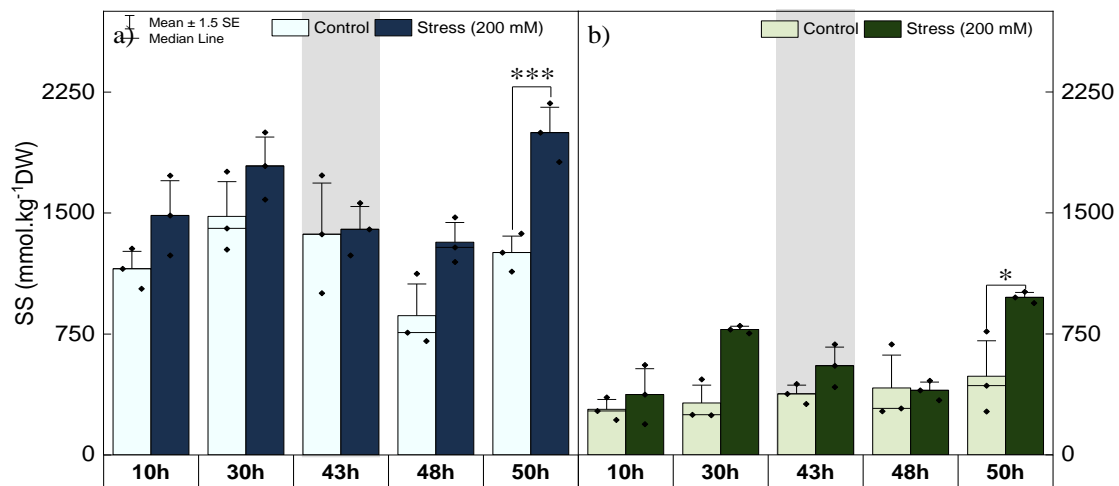
**Tabela 1.** Caracterização do estado fisiológico das plantas de *C. pyramidale* em tratamentos controle e de choque salino em diferentes momentos após a adição de 200 mM de NaCl ao longo do experimento de salinidade; e concentração foliar de NaCl após 72h da imposição do estresse pelo test T a 5% de probabilidade (n=4±D.P). Asteriscos (\*) indicam diferenças entre os tratamentos (\*, p<0,05 e \*\*, p<0,01).

	Parâmetros fisiológicos								Concentração foliar	
	g <sub>s</sub>		A		E		EUA		NaCl	
	Controle	Sal	Controle	Sal	Controle	Sal	Controle	Sal	Controle	Sal
<b>0h</b>	0,03±0,1	0,03±0,1	8,21±0,9	10,15±2,5	1,33±0,5	1,35±0,3	6,70±2,0	7,52±0,4	-	-
<b>24h</b>	0,02±0,0**	0,01±0,0**	6,48±0,7**	2,77±1,3**	0,86±0,1**	0,42±0,2**	7,51±1,1	6,48±0,9	3,16±0,2	4,98±0,3
<b>48h</b>	0,06±0,1**	0,02±0,0**	8,18±1,2**	4,15±2,7**	1,33±0,2**	0,52±0,3**	6,14±0,4	7,84±1,4	2,00±0,1	6,10±0,5

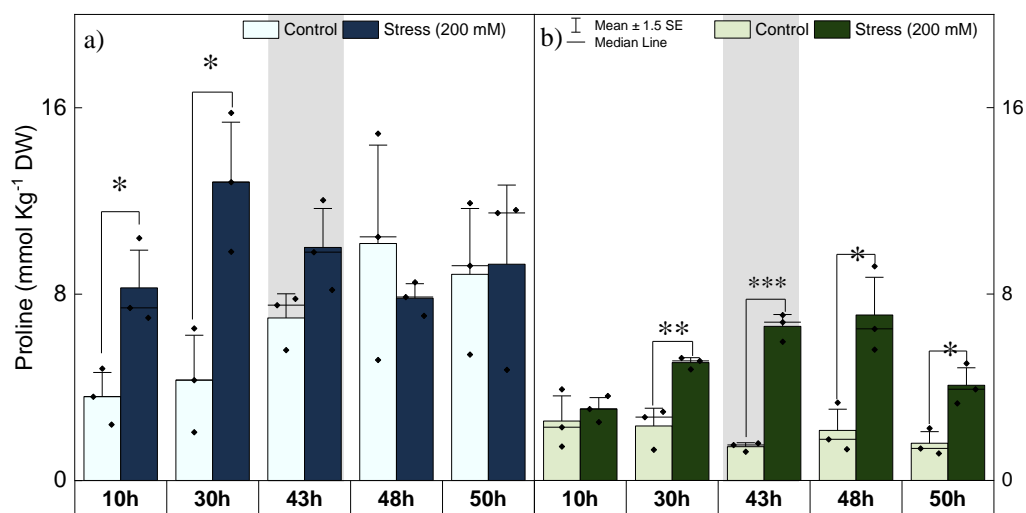
**Figura 1.** (a) Clorofila *a* (Chl *a*), (b) clorofila *b* (Chl *b*) e (c) carotenóides (Car) em plantas jovens de *C. pyramidale* em sob condições de choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação (n=3±E.P). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 indicam diferenças pelo teste T ou teste Mann-Whitney.



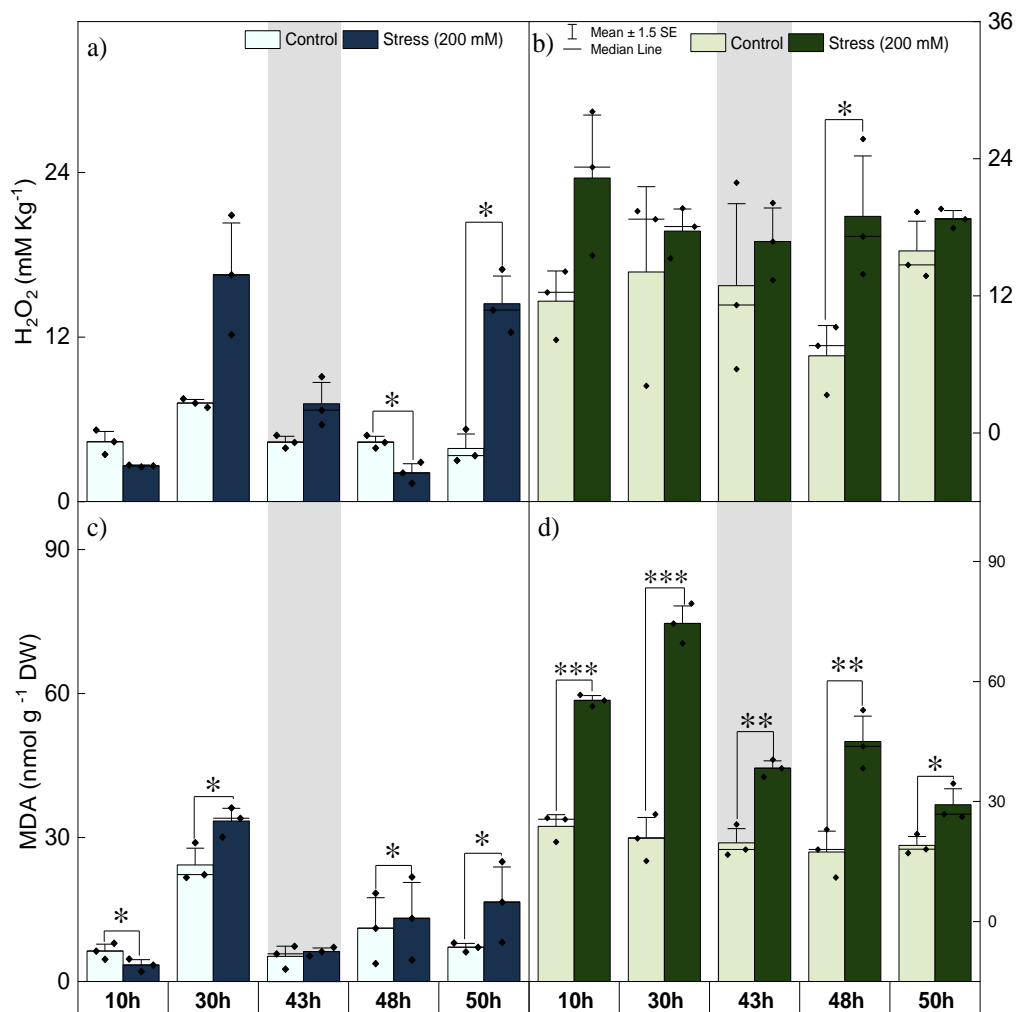
**Figura 2.** Carboidratos solúveis totais (SS) em folhas (a) e raiz (b) em plantas jovens de *C. pyramidale* sob condições de choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação (n=3±E.P). \*P<0.05, \*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001 indicam diferenças pelo teste T ou teste Mann-Whitney.



**Figura 3.** Prolina em folhas (a) e raiz (b) em plantas jovens de *C. pyramidale* sob condições de choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação (n=3±E.P). \*P<0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P<0.001 indicam diferenças pelo teste T ou teste Mann-Whitney.

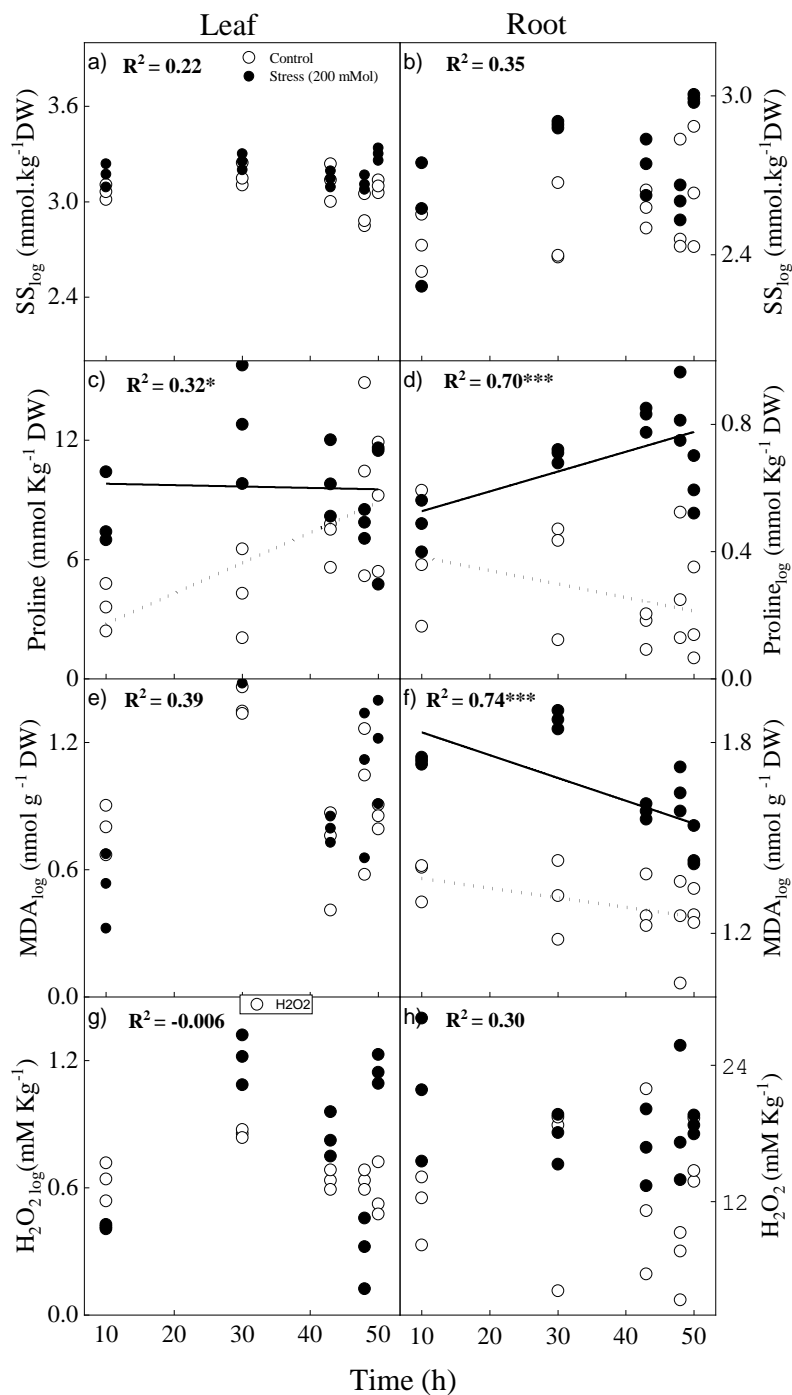


**Figura 4.** Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e dialdeído malônico em folhas (a-c) e raiz (b-d) em plantas jovens de *C. pyramidale* sob condições de choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação ( $n=3\pm E.P.$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$  indicam diferenças pelo teste T ou teste Mann-Whitney.

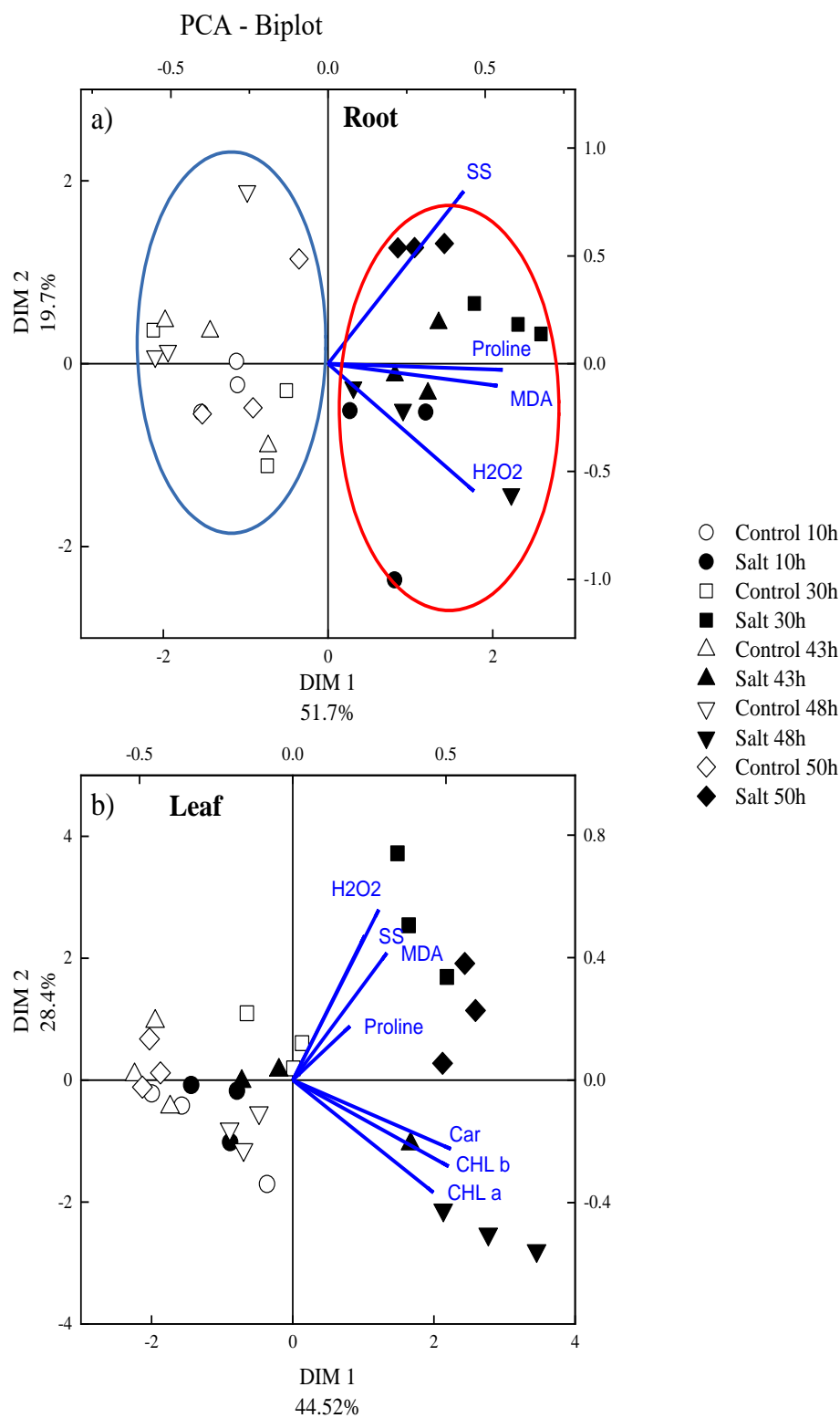




**Figura 5.** Variáveis bioquímicas de folhas e raízes de plantas jovens de *C. pyramidale* sob condições de choque salino (200 mM de NaCl) em casa de vegetação (n=3±E.P) em cinco momentos de coleta (10 h, 30 h, 43 h, 48 h e 50 h) após aplicação do estresse. As variáveis são: a, b—açúcares solúveis totais (SS); c, d—Prolina; e, f— Dialdeído Malônico (MDA); g, h— Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (indicam diferenças entre as inclinações).



**Figura 6.** Análise multivariada de componentes principais baseados nos parâmetros bioquímicos de *C. pyramidale* em diferentes tempos de coleta após choque salino (200 mMol) (n=3).



**5 ARTIGO 3**

---

**ESTRESSE SALINO ALTERA A EXPRESSÃO DE GENES DO RELÓGIO CIRCADIANO DM *CENOSTIGMA PYRAMIDALE* (FABACEAE), UMA ESPÉCIE LENHOSA DE AMBIENTES SEMI-ÁRIDOS)**

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO:

*Plant Physiology and Biochemistry*

**Estresse salino altera a expressão de genes do relógio circadiano em *Cenostigma pyramidale* (Fabaceae), uma espécie lenhosa de ambientes semi-áridos)**

Laís Luana de Lima<sup>a</sup>, Gabriella Frosi<sup>b</sup>, Ana Maria Benko-Iseppona<sup>c</sup>, Mauro Guida dos Santos<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Botânica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

<sup>b</sup> Université de Sherbrooke

<sup>c</sup>Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

\*Autor de correspondência: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Av. Prof. Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil; Tel: +55-81-2126-8569; E-mail: [mauroguida@gmail.com](mailto:mauroguida@gmail.com)

## **Resumo**

*Cenostigma pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis é uma espécie lenhosa de grande importância para florestas tropicais sazonalmente secas brasileiras. Essas regiões se encontram em processo de desertificação, devido ao aumento das concentrações de sais no solo. Resultado de projetos de irrigação inadequados e mau uso do solo. Os genes do relógio circadiano são “marca-passos” endógenos que regulam diversos processos metabólicos e conseqüentemente o desenvolvimento da planta. No entanto, pouco se sabe sobre os genes do relógio circadiano em espécies lenhosas nativas. No presente trabalho, identificamos quatro genes candidatos do relógio circadiano em *C. pyramidale*. Análise fenética e motivos conservados revelaram as relações existentes entre os genes candidatos do relógio em *C. pyramidale* e outras espécies. Também examinamos a expressão desses genes em resposta a salinidade e três deles apresentaram expressão diferencial, confirmados por RT-qPCR. Curiosamente *CpELF4* apresentou uma expressão diferencial pela manhã, mesmo sendo um gene considerado de expressão noturna em outras espécies. Sendo um forte indicio que alterações no tempo de floração dessa espécie é alterada pela salinidade. Nosso estudo é o primeiro a revelar a presença de componentes primários do relógio circadiano em uma espécie lenhosa de ambientes semi-áridos e sua modulação frente ao estresse salino. Assim nossos dados se tornam a base para estudos que desejam investigar os padrões de expressão de genes do relógio circadiano ao longo do dia, em espécies não cultivadas, e suas conexões com genes de tolerância a salinidade.

**Palavras-chave:** Ritmo circadiano; lenhosa; bioinformática; RT-qPCR; floração.

**Abreviações:** BLAST, ferramenta básica de busca de alinhamento local; MEGA, Análise Genética Evolutiva Molecular; NCBI, Centro Nacional de Informação Biotecnológica; RNA-Seq, sequenciação de RNA.

## 1. Introdução

As plantas devido sua natureza sésstil, por muitas vezes estão submetidas a múltiplos estresses ambientais (Jacob et al., 2016). Logo, a capacidade de memorizar e antecipar as mudanças diárias previsíveis torna-se uma vantagem ecológica (Green et al., 2002). Nesse contexto, o ritmo circadiano é classificado como um subconjunto dos ritmos biológicos, que leva aproximadamente 24 h para completar um ciclo (Sweeney 1962; McClung, 2006b; Greenham and McClung, 2015). Estes ritmos são gerados endogenamente e se auto-sustentam (Covington et al. 2008; Montesinos-Navarro et al. 2012). Estudos mais recentes propuseram um modelo para em plantas, composto por três —circuitos de retorno que são interligados. Dois fatores de transcrição de domínio MYB únicos, CIRCADIAN AND CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) e LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY) parecem desempenhar papéis fundamentais em cada *loop*, sendo propostos como o oscilador central do relógio (Caluwé et al., 2016). O funcionamento do relógio se inicia pela manhã com expressão de dois fatores de transcrição LHY e CCA1, os quais reprimem a expressão de um componente noturno TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1), um membro da família das PRR (PSEUDORESPONSE REGULATOR) (McWatters and Devlin 2011). Por sua vez, CCA1 e LHY são reprimidos pela a expressão de PRR 7, 9 e 5. Durante a madrugada um complexo noturno, formado por três proteínas (ELF3, ELF4 e LUX) inibe a expressão das PRR. Assim a expressão de LHY e CCA sobe novamente pela manhã. Proteínas nucleares também estão envolvidas nas atividades do relógio circadiano, como a proteína GIGANTEA (GI), que regula a expressão FLAVIN-BINDING, KELCHREPEAT, F BOX 1 (FKF1) (um fotorreceptor da luz azul) (Doroquez et al., 2003) e parece ser um forte candidato no controle da compensação de temperatura (Edwards et al., 2005; Mishra and Panigrahi 2015b).

Estudos da função do relógio e suas conexões com outras vias, dentre elas às relacionadas com tolerância aos estresses abióticos, estão restritos a plantas modelos, como *Arabidopsis thaliana* ou espécies de importância agrônômica, como arroz, soja e tabaco (Marcolino-Gomes et al., 2014a; Liu et al., 2016; Chen et al., 2018; Moraes et al.,

2019). E trabalhos recentes investigaram as relações entre estresse abióticos como seca, frio, pouca luminosidade e CO<sub>2</sub> e a regulação circadiana (Espinoza et al., 2010; Nakamichi, 2011; Yon et al., 2012; Marcolino-Gomes et al., 2015; Marcolino-Gomes et al., 2017; Annunziata et al., 2018), no entanto, poucos estudos investigaram a relação entre o relógio circadiano e o estresse salino (Park et al., 2016). E levando em consideração que o aumento das concentrações de sais no solo são uma das ameaças mais crescentes para a produção agrícola em todo planeta (Fao and Itps, 2015), investigar os impactos do aumento da salinidade no solo em todos os aspectos relacionados a fisiologia das plantas se torna imperativo.

Para aumentar nossa compreensão da função do relógio nas interações abióticas, identificamos quatro componentes principais do relógio (LHY, PRR53, ELF4 e *Gigantea*) em uma espécie lenhosa da Caatinga, *Cenostigma pyramidale* (Fabaceae) e examinamos o efeito do tratamento salino na expressão de genes do relógio. Nossos resultados fornecem mais evidências sobre a conservação do relógio circadiano em espécies nativas e do subsídio para investigar como alterações abióticas, como a salinidade, impactam na expressão desses componentes. Entender as conexões existentes entre os genes do relógio circadiano e a tolerância à salinidade pode contribuir para um futuro melhoramento dessa espécie, visando aumentos de produtividade, tolerância e sucesso na recuperação de áreas degradadas.

## **2. Matérias e Métodos**

### *2.1 Material biológico e condições de estresse*

#### 2.1.1 Coleta do material radicular

Para análise da expressão dos genes do relógio circadiano foram realizadas coletas do tecido radicular após 30 min, 2h e 11 dias imposição da salinidade. As coletas foram realizadas as 8:00, 8:30 e 8:00, respectivamente. Todas as amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o isolamento do RNA total.

#### 2.1.2 Isolamento de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi isolado usando o método de cloreto de lítio (Chang et al., 1993). Para remoção do DNA foi utilizada a DNase (Promega, Fitchburg WI, EUA). A qualidade do RNA total extraído foram avaliadas pelo gel Agarose (1,5%), corado com *blue-green loading dye I* (LGC Biotechnology, SP, Brasil) a fim de verificar a 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 0.5 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.

## 2.2 Caracterização *in silico* de genes candidatos a genes do relógio circadiano em *Cenostigama pyramildale* e análise de Neighbor-Joining (nj)

Para identificar os genes do relógio circadiano homólogos de *A. thaliana* no transcriptoma de *C. pyramidale*. As sequências correspondentes de aminoácidos dessa espécie foram obtida em banco de dados como o Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) e Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) utilizando palavras chaves e são representadas pelos respectivos número de identificação. Foi realizado um BLAST (tBLASTn) contra o transcriptoma de *C. pyramidale*. As sequências nucleotídicas de *C. pyramidale* mais semelhantes foram selecionadas com base nos valores de *e-values* menores que 0,05.

Os conjuntos de sequências foram submetidos à análise de domínio conservado utilizando o batch CD-search (Marchler-Bauer et al., 2011), buscando as assinaturas de conservação presentes no CDD (conserved Domain Database). Dado que os domínios funcionais tem importância para a função e classificação das proteínas, estes foram analisadas usando ferramentas de descoberta de motivos MEME, versão 5.1.1 (Bailey and Elkan, 1994). Para o alinhamento e construção das árvores foram consideradas as isoformas que apresentavam alguma alteração ao nível proteico. Após essa análise, as sequências foram submetidas a uma curadoria manual, em que foram comparadas ao banco TAIR (*A. thaliana*) a fim de observar quais de *C. pyramidale* apresentam maior similaridade com *A. thaliana* (p-value: <math>10^{-30}</math>). Por fim, os quatro conjuntos de sequências que não apresentaram divergências significativas, PRR (3,5,7 e 9), ELF4, LHY e GI, foram submetidas as análises fenéticas. Estas foram performadas utilizando o pacote MEGA 7 (Kumar, Stecher and Tamura, 2018), alinhando-se as sequências de *C.*

*pyramidale*, recuperadas via BLAST com as sondas. Assim, os fenogramas foram gerados através do método Neighbour-Joining com *Bootstrap* de 2000 repetições e o número de diferenças como modelo de substituição de aminoácidos. Para a geração dos fenogramas foram consideradas apenas as sequências que divergiam em sequência de aminoácidos, uma vez que foi percebido que muitas isoformas diferiam apenas ao nível de nucleotídeos e não gerava nada informativo nas árvores, gerando apenas politomias.

### 2.3 Expressão dos genes do relógio em bibliotecas de RNA-seq

A identificação de transcritos induzidos ou reprimidos foi realizada com base na alteração de  $\log_2$  *fold change* ( $\log_2$ FC) e valor de p. Foi considerado induzido ou reprimido quando os valores de  $\log_2$ FC foram superiores a +1 ou inferiores a -1, respectivamente, associados a um valor de  $p < 0,05$ . A análise de expressão foi realizada pelo edgeR um pacote do Bioconductor para examinar a expressão diferencial de dados de contagem replicados (Robinson et al., 2009).

### 2.4 Seleção de genes alvos e desenho de primers

Para seleção de alvos dos genes do relógio circadiano e desenho de primers foi utilizado o transcriptoma radicular de *C. pyramidale* exposta à salinidade. As sequências sondas foram obtidas no banco de dados revisado do UNIPROT (*Universal Protein*) e NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e Phytozome (*The plant Genomics Resource*). Posteriormente foi realizado BLAST local (tBLASTn) contra o transcriptoma de *C. pyramidale* (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 completo. Para determinação da nomenclatura dos genes do relógio circadiano foi realizado um alinhamento (programa MEGA 7) com sequências de outras espécies para construção de uma árvore fenética (método Neighbor Joining, Bootstrap 2000 replicações). A nomenclatura foi baseada na homologia de sequências. O alinhamento também foi utilizado para a confirmação da presença e integridade do motivo funcional.

Os *primers* foram desenhados usando a ferramenta *online* 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 1).

## 2.5 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 ddH<sub>2</sub>O. 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). A eficiência de amplificação (E) foi determinada a partir de uma curva padrão gerada por diluições seriadas de cDNA 196 (1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000) para cada primer, em triplicata, e calculada usando a equação:  $E = 10^{(-1/\text{slope of the standard curve})}$ .

Por meio do pacote de *software* Rest2009 (modo REST Standard) a expressão relativa dos genes foi calculada utilizando dados de Cq (Ciclo de quantificação) por meio da fórmula:  $E (\Delta Cq \text{ alvo}) / E (\Delta Cq \text{ normalizador})$  onde: *E* representa a eficiência média para cada gene,  $\Delta Cq$  a diferença entre o Cq da amostra controle e da amostra tratada. O teste de hipóteses ( $p < 0,05$ ) foi utilizado para determinar se as diferenças na expressão dos transcritos alvo entre as condições de controle e tratamento foram significativas. Os dados da expressão foram normalizados pela média geométrica do nível de expressão de três genes de referência *SAC1* (*Phosphoinositide phosphatase*), *RSH1* (*Putative GTP 204 diphosphokinase*) e *HAG2* (*Histone acetyltransferase type B catalytic subunit*) (Frosi et al., 2019 – dados não publicados).

## 3 Resultados

### 3.1 Identificação e caracterização dos genes do relógio circadiano em *C. pyramidale*

Nesse estudo, os genes candidatos foram identificados usando sequências de *A. thaliana*, *Glicine max* e *Medicago truncatula* para pesquisa *in silico* no transcriptoma de

*C. pyramidale*. Para estabelecer as relações entre os candidatos a genes do relógio em *C. pyramidale* e as proteínas de *A. thaliana* e outras plantas, realizamos alinhamentos globais, seguidos por análises filogenéticas e construção de árvores filogenéticas.

Para ELF4 foram recuperadas 27 sequências de transcritos codificados pelo provável candidato de *CpELF4* e apenas uma delas não apresentou domínio completo na região C-terminal. Uma árvore NJ foi gerada incluindo 12 sequências de *C. pyramidale* contendo o domínio conservado DUF1313, além de 61 sequências de outras espécies de plantas e algas. As sequências das algas emergiram no dendograma na posição basal, com um valor de bootstrap de 98. Três grupos foram formados com auto-valor de suporte. As sequências de *C. pyramidale* surgiram dentro do grupo IRRV (*bootstrap* de 98) agrupadas com outras leguminosas, com um *bootstrap* que variaram de 80 à 99, indicando uma similaridade estrutural entre as ELF4 envolvidas. Três sequências também se agruparam ao tipo tipo I (S/T/F) (K/R) V, com um valor de *bootstrap* de 98, também se agrupando com leguminosas (*Medicago truncatula*, *Glicine max* e *Phaseolus vulgaris*) (Figura 1). Considerando a importância do domínio funcional para a classificação e a função dos candidatos do ELF4 em *C. pyramidale*, realizamos uma análise de motivo das proteínas *ELF4* em *C. pyramilade*. Nossa análise revelou a presença de um motivo DUF1313 conservado em todas as proteínas. Os membros da família DUF1313 são divididos em três tipos principais, de acordo com a substituição de quatro resíduos de aminoácidos tipo IARV, tipo I (S/T/F) (K/R) V e tipo IRRV, onde o tipo IRRV é o maior (158 genes). Nossas análises mostraram que os genes putativos de *CpELF4* contêm resíduos pertencentes aos genes do tipo IRRV e tipo ISKV (Figura 2).

Para análise dos PRRs inicialmente consideramos TOC1 (PRR1), PRR 3,5, 7 e 9 que participam do sistema circadiano. No entanto, para TOC1, as sequências obtidas através do tBLASn resgataram sequências que possuíam apenas o domínio CCT na região terminal. Devido ao domínio pseudo-receptor altamente conservado, retiramos essas informações obtidas para TOC1. Mas antes foi construída uma árvore para verificar se alguma sequência das PRRs ficaria no clado das sequências de TOC1 de outras espécies vegetais, o que não ocorreu. Foram regastadas inicialmente, 448 transcritos com as sequências sondas, no entanto, apenas 18 apresentavam os domínios conservados completos. Devido seu alto grau de similaridade a diferenciação entre as PRR3/7 e 9/5 é difícil. Na árvore foram encontrados três nós, na região basal ficaram as sequências de PRR5 em monocotiledôneas (*Oriza sativa* e *Zea mays*) (Figura 3-a). No segundo nó foram agrupadas as sequências PRR3/7 e no terceiro nó agrupadas todas as sequências de

PRR9/5 onde as sequências de *CpPRR* foram agrupadas. Os três nós apresentaram altos valores de *bootstrap*. Todas as sequências apresentaram domínios completos. O domínio pseudo-receptor autêntico compartilha o motivo DDK (ácido aspártico-ácido aspártico-lisina), que é essencial para a atividade fosfotransferência. No entanto, os dois primeiros resíduos são divergentes nas proteínas das angiospermas. Nas sequências de *CpPRR* apenas uma sequência (*Cp101947|c1\_g2\_i1.p1*) apresentou o segundo ácido aspártico conservado, exibindo portanto um motivo DDK completo. As outras mantiveram o primeiro resíduo de ácido aspártico e substituíram o segundo por um ácido glutâmico (Figura 3-b). O domínio CCT é bem conservado em todas as proteínas (Figura 3-c).

Para LHY, as sondas recuperaram 36 sequências, dessas 29 apresentavam o domínio conservado completo. No entanto apenas 16 sequências apresentaram alta similaridade com *AtLHY*. O fenograma mostrou as *CpLHY* compartilham um maior grau de similaridade com três leguminosas (*Medicago truncatula*, *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris*) do que com *AtLHY*. As LHY em monocotiledôneas (*Oriza sativa* e *Brachypodium distachyon*) ficaram na região basal. Isso pode indicar que os LHY em angiospermas evoluíram independentemente em dicotiledôneas e monocotiledôneas, embora possam compartilhar o mesmo ancestral (Figura 4-a). O domínio domínio Myb\_DNA\_binding se mostrou bastantes conservados nas sequências de *C. pyramidale* (Figura 4-b).

GIGANTEA é uma proteína que até o momento não tem domínios conservados reconhecidos (Mishra and Panigrahi, 2015a). Com as sondas foram recuperadas 16 sequências. As sequências de candidatas a *CpGI*, apresentaram um alto grau de similaridade com outras espécies. Com *AtGI* as sequências de *CpGI* apresentaram similaridade entre 67-77%. Os transcritos codificados por *CpGI* foram agrupadas dentro do subclado das leguminosas juntamente com os homólogos de *Medicago truncatula*, *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris* (Figura 5). Sua região intermediária apresentou um alto grau de conservação com outras espécies, indicando que regiões que caracterizem suas funções, provavelmente está dentro dessa região. Além disso, as proteínas *CpGI* continham múltiplos domínios transmembranas e sinais de localização nuclear em posições semelhantes às dos GI de *Arabidopsis* e soja (Figura 6).

### 3.2 Impacto da salinidade nos genes do relógio circadiano

Para investigar como a salinidade afeta a expressão dos genes do relógio circadiano, investigamos a expressão diferencial desses genes, no tecido radicular de *C. pyramidale* em três momentos distintos após aplicação de uma solução salina (100 mM). Inicialmente verificamos na tabela de expressão diferencial quais transcritos pertenciam ao grupo de genes que compõem o relógio circadiano. Em seguida foi verificado os níveis de expressão e FDR para cada um deles (Tabela 2). A seleção dos transcritos alvos foi baseada em sua expressão nas bibliotecas de RNA-seq de *C. pyramidale* sob salinidade. Considerando os pares de *primers* funcionais, todos apresentaram eficiência aceitáveis (90-110%) (Tabela 1). A análise expressão relativa mostrou que *CpLHY* e *CpGI* foram induzidos nos tempos de 30 min e 2h. Já *CpELF4* e *CpGI* foram reprimidos a 11 dias, confirmando os dados do RNA-seq. Apenas a expressão de *CpPRR95* que se mostrava induzida aos 11 dias de exposição a salinidade não foi confirmada pela RT-qPCR (Tabela 3).

#### 4. Discussão

Utilizando sequências sondas dos genes do relógio circadiano de *A. thaliana* e outras espécies modelo, os candidatos em *C. pyramidale* foram pesquisados nas bibliotecas de RNA-seq. Tais condições foram escolhidas para verificar os impactos do estresse abiótico (e.g., salinidade), uma vez que essas informações ainda são escassas, principalmente se tratando de espécies lenhosas e nativas de ambientes de florestas tropicais sazonalmente secas.

ELF4 é um gene do relógio circadiano essencial para a manutenção dos ritmos circadianos e controle da floração, cuja expressão atinge o pico à noite. Juntamente com ELF3 e LUX, formam um complexo noturno para regular o relógio circadiano e o alongamento do hipocólito (Nusinow et al., 2011). A perda de função do ELF4 leva a disfunção circadiana (imprecisão e arritmicidade) e amplitude baixa dos genes do relógio que são induzidos pela luz, como CCA1 (Kolmos and Davis, 2007). Para *A. thaliana* foram identificados cinco genes ELF4 (Khanna et al., 2003). Em soja foram identificados nove, no entanto todos apresentam um motivo DUF1313 (tipo IRRV) (Marcolino-Gomes et al., 2017). No entanto, em *C. pyramidale* foram identificados sete genes. A maior parte deles pertencem ao tipo IRRV e alguns ao tipo I (S / T / F) (K / R) V.

A repressão de *CpELF4* sob salinidade não é totalmente inesperada, uma vez que Marcolino et al. (2014) verificou que a imposição severa do estresse hídrico reprimiu

fortemente a expressão de ELF4 em soja. Levando em consideração que alguns efeitos do estresse hídrico são comuns ao estresse salino, como (Mishra et al., 2016), a alteração em seu padrão de expressão é indicativo que ELF4 contribui para respostas fisiológicas importantes, além do controle da floração (Marcolino-Gomes et al., 2017) e regulação circadiana (McWatters et al. 2007). Dois estudos recentes (Marcolino-Gomes et al. 2017; Chen et al., 2016) demonstraram que a superexpressão de GmELF4 e DhELF4 em *A. thaliana* atrasaram a floração das plantas transgênicas em relação as plantas selvagens. Se do ponto de vista econômico a repressão da floração pode ser vantajosa em leguminosas de interesse econômico, onde o acúmulo de biomassa é o mais importante, do ponto de vista ecológico isso é preocupante. Se a função de ELF4 for bem conservada como parece (Kolmos et al., 2009), em regiões suscetíveis a secas irregulares ou em processo de desertificação a alteração nos níveis de expressão de ELF4 por seca (Marcolino-gomes et al., 2017) ou salinidade, como nossos resultados demonstram, pode resultar em antecipação ou retardo floração em várias espécies da comunidade. Essa mudança pode alterar significativamente a rede ecológica nesse ecossistema (Visser and Gienapp, 2019).

As PRRs são proteínas que apresentam dois domínios conservados (Farré and Liu, 2013), na região N-terminal é observado o domínio pseudo-receptor e o domínio CCT na região C-terminal, sendo este último um domínio específico das plantas (Strayer et al., 2000; Li and Xu, 2017). Análises filogenéticas indicaram que existem três grupos de genes PRR nas plantas terrestres, os grupos TOC1, PRR73 e PRR95 (Satbhai et al., 2011). Todos os PRRs são expressos de maneira circadiana e cada um tem efeitos distintos no sistema circadiano (Hanano and Davis, 2018). As proteínas PRR9, PRR7 e PRR5 são as principais repressoras transcricionais de CCA1 e LHY e portanto, são essenciais para o funcionamento adequado do relógio. Isso foi observado devido aos padrões de associação PRR9, PRR7 e PRR5 com as regiões promotoras de CCA1 e LHY em *A. thaliana*, onde essa associação é inversamente correlacionada a expressão de CCA1 e LHY (Nakamichi et al., 2010). Estudos já demonstraram que PRR9, 5 e 7 são importantes na adaptação ao frio, em que estes genes fazem a intermediação da expressão de DREB1 (Nakamichi et al., 2009). A presença de motivos dos genes do relógio circadiano nos promotores de genes de resposta ao estresse é um forte indicativo o que o relógio controla a expressão de genes de resposta ao estresse, existindo um mecanismo de *feedback* recíproco entre o relógio e a resposta ao estresse (Habte et al., 2014; Grundy et al., 2015). Logo, a identificação desses regiões promotoras a partir de um genoma é fundamental para

elucidar as conexões existentes entre os genes responsivos ao estresse salino e do relógio circadiano.

CCA1 e LHY são fundamentais na fase matinal do ritmo circadiano. As sondas de *AtCCA1*, através do tBLASTn, identificou *CpLHY* em vez de *CpCCA1* (essa informação foi obtida após as sequências resgatadas pela sonda de *AtCCA1* no transcriptoma de *C. pyramidale* terem apresentados altos valores de *escore* e baixos *e-value* com *AtLHY*). Sugerindo que *C. pyramidale* apresentava ortólogos verdadeiros para de *AtLHY*, mas nenhum ortólogo para *AtCCA1*. Foi proposto que algumas espécies, como cevada e morango, tem apenas LHY e que a duplicação desse gene ocorreu de forma independente em *A. thaliana*, dando origem a *AtCCA1* (Calixto et al., 2015; Chen et al., 2018). Em nosso ensaio, o *CpLHY* se mostrou induzido após 30 min e 2h após aplicação salina, sendo confirmada pela qPCR. Estudos já apontaram o envolvimento do LHY/CCA1 na regulação a estresse abióticos (Huang et al., 2012; Grundy et al., 2015). Em soja e cevada, a indução do DREB (Elemento de Ligação Responsivo a Desidratação) foi associada a um aumento na expressão de LHY/CCA1 em soja sob estresse hídrico (Habte et al., 2014; Marcolino-Gomes et al., 2014b). No entanto em nosso ensaio, não foram encontrados elementos DREB com expressão diferencial, nos momentos em que LHY estavam induzidos. Isso pode indicar que LHY esteja modulando outras vias de resposta.

A análise do perfil do transcriptoma de *C. pyramidale* revelou que o gene GI foi regulado em resposta a salinidade, estando reprimido, sendo os dados confirmados pela qPCR. É sabido que GI desempenha múltiplos papéis nas plantas e já foi vista sua participação em resposta a vários tipos de estresse abióticos, como frio (Cao et al., 2005) e salinidade (Kim et al., 2013). Além de participação no controle do relógio circadiano (Hibberd et al., 2005; McClung, 2006a) e regulação do tempo de floração (Fowler et al., 1999). E embora suas funções bioquímicas precisas não tenham sido definidas, ela parece fazer parte de uma rede que recebe informações ambientais e as transmite para modular o ritmo circadiano de crescimento e desenvolvimento (Laflamme, 2015; Mora-García et al., 2017).

Foi proposto que a degradação de GI permite a formação de um complexo SOS2-SOS3 que leva a fosforilação da via SOS1, em uma rede de interação proteína-proteína. A fosforilação de SOS1 promove a exportação de íons sódio das células, levando a uma maior tolerância ao sal (Qiu et al., 2002; Kim et al., 2013), devido ao reestabelecimento da homeostase iônica. É provável que essa rede interação, entre GI-via SOS, tenha

ocorrido em *C. pyramidale*, uma vez que SOS3 e outras SOS2 (CIPKN\_ARATH, CIPK5\_ARATH e CIPK4\_ARATH) estavam induzidas (Tabela 1). Em *A. thaliana* foi observado que mutantes *gi* exibiram uma excepcional tolerância ao sal (Kim et al., 2013). Estes indivíduos apresentaram um maior acúmulo de amido, alterações no metabolismo de sacarose (Kurepa et al., 1998b) e maior sensibilidade ao estresse luminoso e oxidativo (Kurepa et al., 1998a). Xie et al. (2015) demonstraram, em um elegante experimento, que os efeitos de GI no tempo de floração é independente de seu papel na resistência ao estresse abiótico e que essas funções podem ser separadas por polimorfismos de nucleotídeos que resulta em uma substituição de aminoácidos entre duas proteínas GI.

## 5. Considerações finais

Nossos resultados sugerem que os genes do relógio circadiano (*CpLHY*, *CpGI*, *CpELF4* e *CpPRR95*) podem estar envolvidos na coordenação de respostas em *C. pyramidale* sob salinidade. Um estudo mais detalhado sobre o padrão de expressão desse genes ao longo do dia, juntamente com as principais vias de respostas induzidas e reprimidas no transcriptoma podem ajudar elucidar quais correlações existentes são significativas. Uma vez que a existência de interações entre a expressão de genes de defesa ao estresse osmótico/iônico e os genes do relógio circadiano pode ser fundamental para aumentar a sobrevivência e a eficiência reprodutiva. A compreensão desses mecanismos poderá fornecer importantes *insights* sobre os impactos do aumento da concentração de sal no solo, um dos fatores abióticos mais limitantes para a produtividade vegetal no planeta.

## Referências

- Annunziata MG, Apelt F, Carillo P, et al (2018) Response of Arabidopsis primary metabolism and circadian clock to low night temperature in a natural light environment. *J Exp Bot* 69:4881–4895. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery276>
- Bailey T, Elkan C (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. In: Park M (ed) AAAI Press. California, pp 28–36
- Calixto CPG, Waugh R, Brown JWS (2015) Evolutionary Relationships Among Barley and Arabidopsis Core Circadian Clock and Clock-Associated Genes. *J Mol Evol* 80:108–119. <https://doi.org/10.1007/s00239-015-9665-0>
- Caluwé J De, Xiao Q, Hermans C, Verbruggen N (2016) A Compact Model for the Complex Plant Circadian Clock. *Front Plant Sci* 7:1–15.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00074>

- Cao S, Ye M, Jiang S (2005) Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in Arabidopsis. *Plant Cell Rep* 24:683–690. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0061-x>
- Chen W, Qin Q, Zheng Y, et al (2016) Overexpression of *Doritaenopsis Hybrid EARLY FLOWERING 4-like4 Gene*, *DhEFL4*, Postpones Flowering in Transgenic Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 34:103–117. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0899-1>
- Chen XD, Wang J, Zhao MZ, Zhao F (2018) Characterization and expression analysis of circadian clock genes in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*. *Biol Plant* 62:451–461. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0793-4>
- Covington MF, Maloof JN, Straume M, et al (2008) Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol* 9:. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-r130>
- Doroquez D, Doyon L, Flynn J, et al (2003) FKF1 is essential for light signalling in Arabidopsis. *Nature* 426:. <https://doi.org/10.1038/nature02097.1>
- Edwards KD, Lynn JR, Gyula P, et al (2005) Natural allelic variation in the temperature-compensation mechanisms of the Arabidopsis thaliana circadian clock. *Genetics* 170:387–400. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.035238>
- Espinoza C, Degenkolbe T, Caldana C, et al (2010) Interaction with diurnal and circadian regulation results in dynamic metabolic and transcriptional changes during cold acclimation in Arabidopsis. *PLoS One* 5:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014101>
- FAO and ITPS (2015) Global soil status, processes and trends. In: Caon L, Forlano N, Keene, C4Sala M, et al. (eds) *Status of the World's Soil Resources*. Rome, p 608
- Farré EM, Liu T (2013) The PRR family of transcriptional regulators reflects the complexity and evolution of plant circadian clocks. *Curr Opin Plant Biol* 16:621–629. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.015>
- Fowler S, Lee K, Onouchi H, et al (1999) GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J* 18:4679–4688
- Green RM, Tingay S, Wang Z-Y, Tobin EM (2002) Circadian rhythms confer a higher level of fitness to Arabidopsis plants. *Plant Physiol* 129:576–584. <https://doi.org/10.1104/pp.004374>
- Greenham K, McClung CR (2015) Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nat. Rev. Genet.* 16:598–610
- Grundy J, Stoker C, Carré IA (2015) Circadian regulation of abiotic stress tolerance in plants. *Front Plants Sci* 6:151–169. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00648>
- Habte E, Müller LM, Shtaya M, et al (2014) Osmotic stress at the barley root affects expression of circadian clock genes in the shoot. *Plant, Cell Environ* 37:1321–1337. <https://doi.org/10.1111/pce.12242>
- Hanano S, Davis SJ (2018) Pseudo-response regulator genes ‘tell’ the time of day:



## multiple feedbacks in the circadian system of higher plants

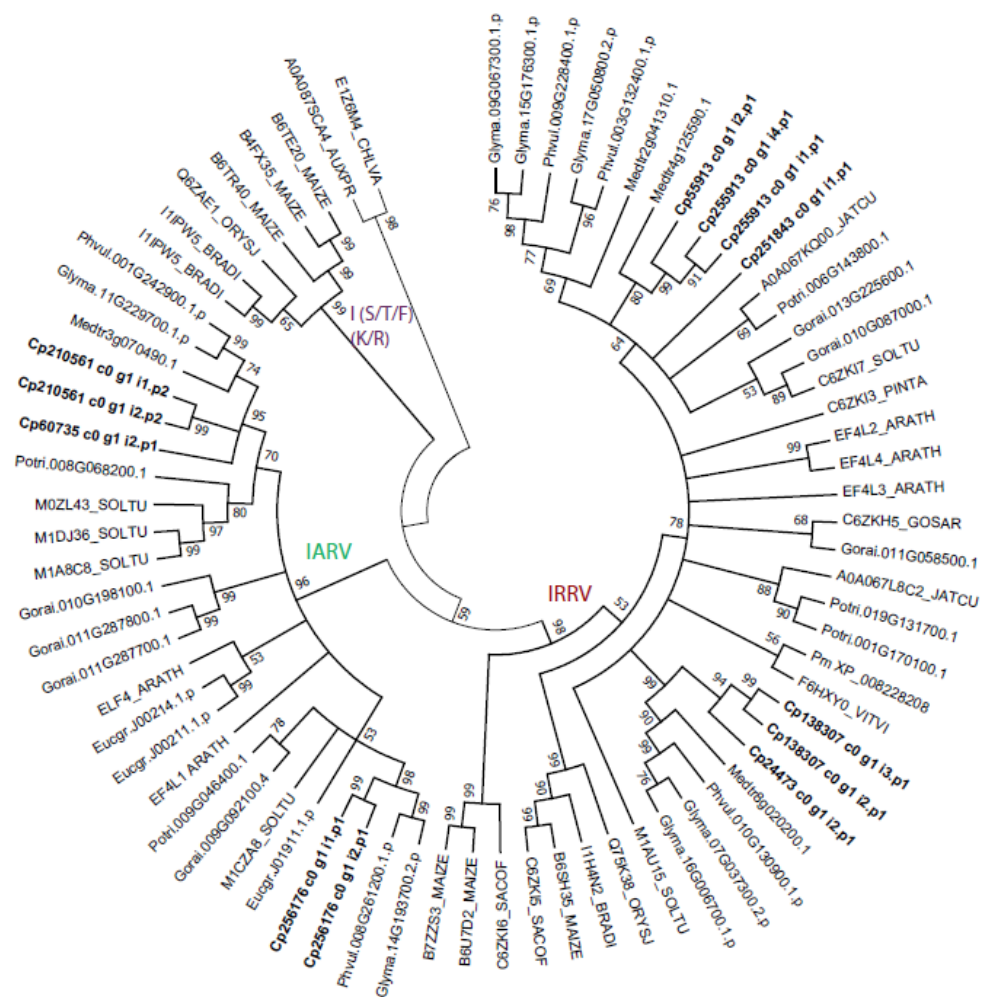
- Havir E a, McHale N a (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84:450–455. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- Hibberd V, Brown PE, Turner MS, et al (2005) Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. *Mol Syst Biol* 1:1–9. <https://doi.org/10.1038/msb4100018>
- Huang W, Pérez-García P, Pokhilko A, et al (2012) Mapping the core of the Arabidopsis circadian clock defines the network structure of the oscillator. *Science* (80- ) 335:75–79. <https://doi.org/10.1126/science.1219075>
- Kim WY, Ali Z, Park HJ, et al (2013) Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in Arabidopsis. *Nat Commun* 4:. <https://doi.org/10.1038/ncomms2357>
- Kolmos E, Davis S (2007) ELF4 as a Central Gene in the Circadian Clock. *Plant Signal Behav* 2:370–372. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096206>
- Kolmos E, Nowak M, Werner M, et al (2009) Integrating ELF4 into the circadian system through combined structural and functional studies. *HFSP J* 3:350–366. <https://doi.org/10.2976/1.3218766>
- Kurepa J, Smalle J, Montagu M Van (1998a) Oxidative stress tolerance and longevity in Arabidopsis: the late-flowering mutant gigantea is tolerant to paraquat. *Plant J* 14:759–764
- Kurepa J, Smalle J, Montagu M Van, Inz D (1998b) Effects of sucrose supply on growth and paraquat tolerance of the late-flowering gi-3 mutant. *Plant Growth Regul* 26:91–96
- Laflamme B (2015) The two sides of GIGANTEA. *Nat Publ Gr* 47:311. <https://doi.org/10.1038/ng.3264>
- Li Y, Xu M (2017) CCT family genes in cereal crops: A current overview. *Crop J* 5:449–458. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.07.001>
- Liu A, Hu Z, Bi A, et al (2016) Photosynthesis, antioxidant system and gene expression of bermudagrass in response to low temperature and salt stress. *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1696-9>
- Marcolino-gomes J, Nakayama TJ, Molinari HBC, et al (2017) Functional Characterization of a Putative Glycine max ELF4 in Transgenic Arabidopsis and Its Role during Flowering Control. *Front Plant Sci* 8:1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00618>
- Marcolino-Gomes J, Nakayama TJ, Molinari HBC, et al (2017) Functional characterization of a putative glycine max ELF4 in transgenic arabidopsis and its role during flowering control. *Front Plant Sci* 8:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00618>
- Marcolino-Gomes J, Rodrigues FA, Fuganti-Pagliarini R, et al (2014a) Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086402>

- Marcolino-Gomes J, Rodrigues FA, Fuganti-Pagliarini R, et al (2014b) Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086402>
- McClung CR (2006a) Plant Circadian Rhythms. *Plant Cell Online* 18:792–803. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.040980>
- McClung CR (2006b) Plant Circadian Rhythms. *Plant Cell* 18:792–803. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- McWatters HG, Devlin PF (2011) Timing in plants - A rhythmic arrangement. *FEBS Lett* 585:1474–1484. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.051>
- McWatters HG, Kolmos E, Hall A, et al (2007) ELF4 is required for oscillatory properties of the circadian clock. *Plant Physiol* 144:391–401. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096206>
- Mishra P, Panigrahi KC (2015a) GIGANTEA - an emerging story. *Front Plant Sci* 6:1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00008>
- Mishra P, Panigrahi KC (2015b) GIGANTEA – an emerging story. *Front Plant Sci* 6:1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00008>
- Mishra S, Kumar S, Saha B, et al (2016) Crosstalk between Salt, Drought, and Cold Stress in Plants: Toward Genetic Engineering for Stress Tolerance
- Montesinos-Navarro a, Segarra-Moragues JG, Valiente-Banuet a, Verdú M (2012) Plant facilitation occurs between species differing in their associated arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 196:835–44. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04290.x>
- Mora-García S, de Leone MJ, Yanovsky M (2017) Time to grow: circadian regulation of growth and metabolism in photosynthetic organisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 35:84–90
- Moraes TA, Mengin V, Annunziata MG, et al (2019) Response of the Circadian Clock and Diel Starch Turnover to One Day of Low Light or Low CO<sub>2</sub> [ OPEN ]. 179:1457–1478. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01418>
- Nakamichi N (2011) Molecular mechanisms underlying the arabidopsis circadian clock. *Plant Cell Physiol* 52:1709–1718. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr118>
- Nakamichi N, Kiba T, Henriques R, et al (2010) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 Are Transcriptional Repressors in the Arabidopsis Circadian Clock. *Plant Cell* 22:594–605. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072892>
- Nakamichi N, Kusano M, Fukushima A, et al (2009) Transcript Profiling of an Arabidopsis PSEUDO RESPONSE REGULATOR Arrhythmic Triple Mutant Reveals a Role for the Circadian Clock in Cold Stress Response. *Plant Cell Physiol* 50:447–462. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp004>
- Nusinow DA, Helfer A, Hamilton EE, et al (2011) The ELF4-ELF3-"LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475:398–404. <https://doi.org/10.1038/nature10182>
- Park HJ, Qiang Z, Kim WY, Yun DJ (2016) Diurnal and circadian regulation of salt tolerance in Arabidopsis. *J Plant Biol* 59:569–578. <https://doi.org/10.1007/s12374->

016-0317-8

- Qiu Q, Guo Y, Dietrich MA, et al (2002) Regulation of SOS1 , a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *PNAS* 99:8436–8441
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2009) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Satbhai SB, Yamashino T, Okada R, et al (2011) Pseudo-response regulator (PRR) homologues of the moss *Physcomitrella patens*: Insights into the evolution of the prr family in land plants. *DNA Res* 18:39–52. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsq033>
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, et al (2000) Cloning of the *Arabidopsis* *Arabidopsis* Clock Gene *TOC1*, an Autoregulatory Reponse Regulator Homolog. *Science* (80-) 289:22–25
- Sweeney BM (1962) Biological Clocks in Plants. *Annu Rev Plant Physiol* 14:411-440
- Visser ME, Gienapp P (2019) Evolutionary and demographic consequences of phenological mismatches. *Nat Ecol Evol* 12:. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0880-8>
- Xie Q, Lou P, Hermand V, et al (2015) Allelic polymorphism of *GIGANTEA* is responsible for naturally occurring variation in circadian period in *Brassica rapa*. *PNAS* 112:3829–3834. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421803112>
- Yon F, Seo P-J, Ryu JY, et al (2012) Identification and characterization of circadian clock genes in a native tobacco, *Nicotiana attenuata*. *BMC Plant Biol* 12:172. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-172>

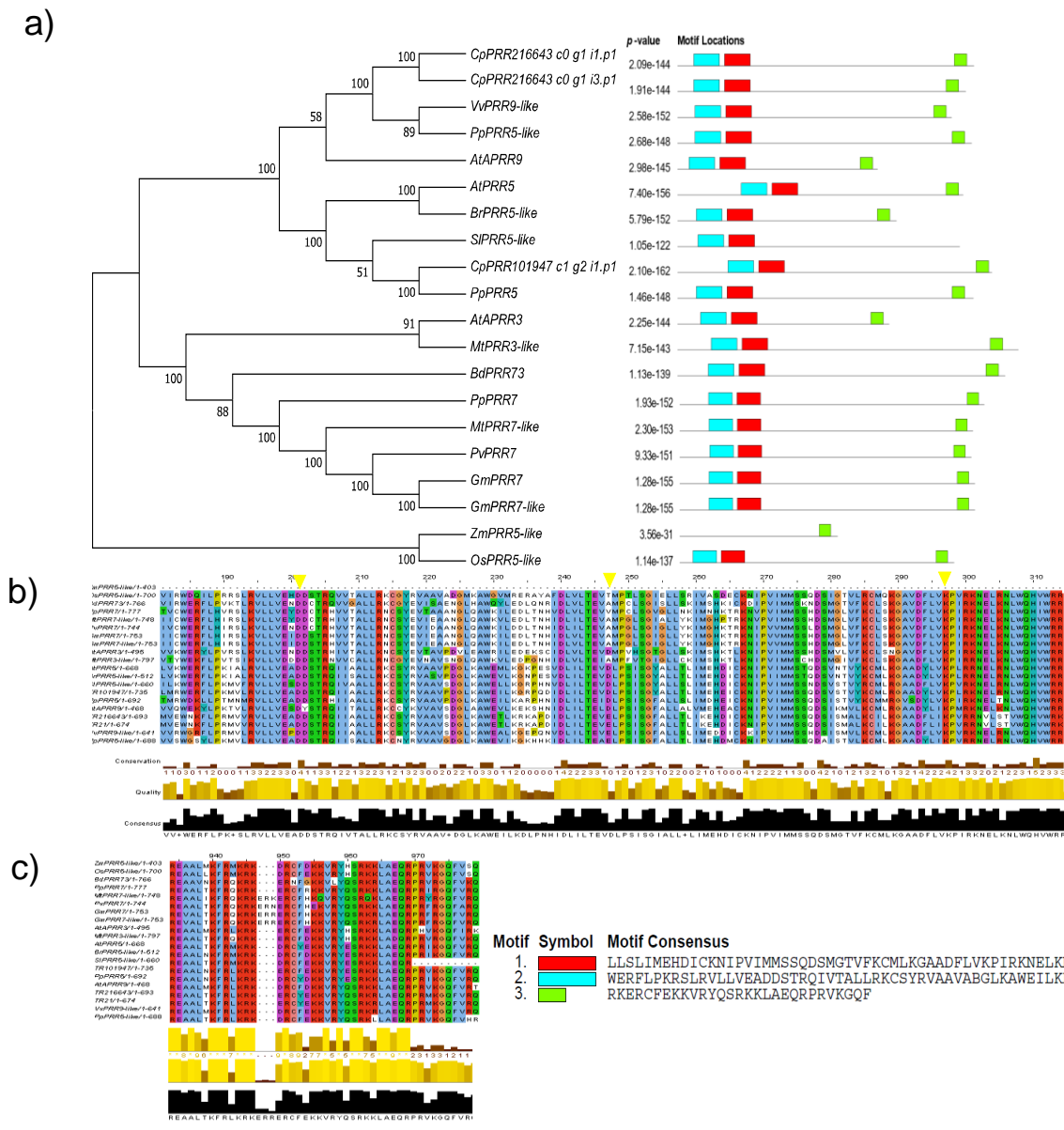
## Figuras, tabelas e legendas



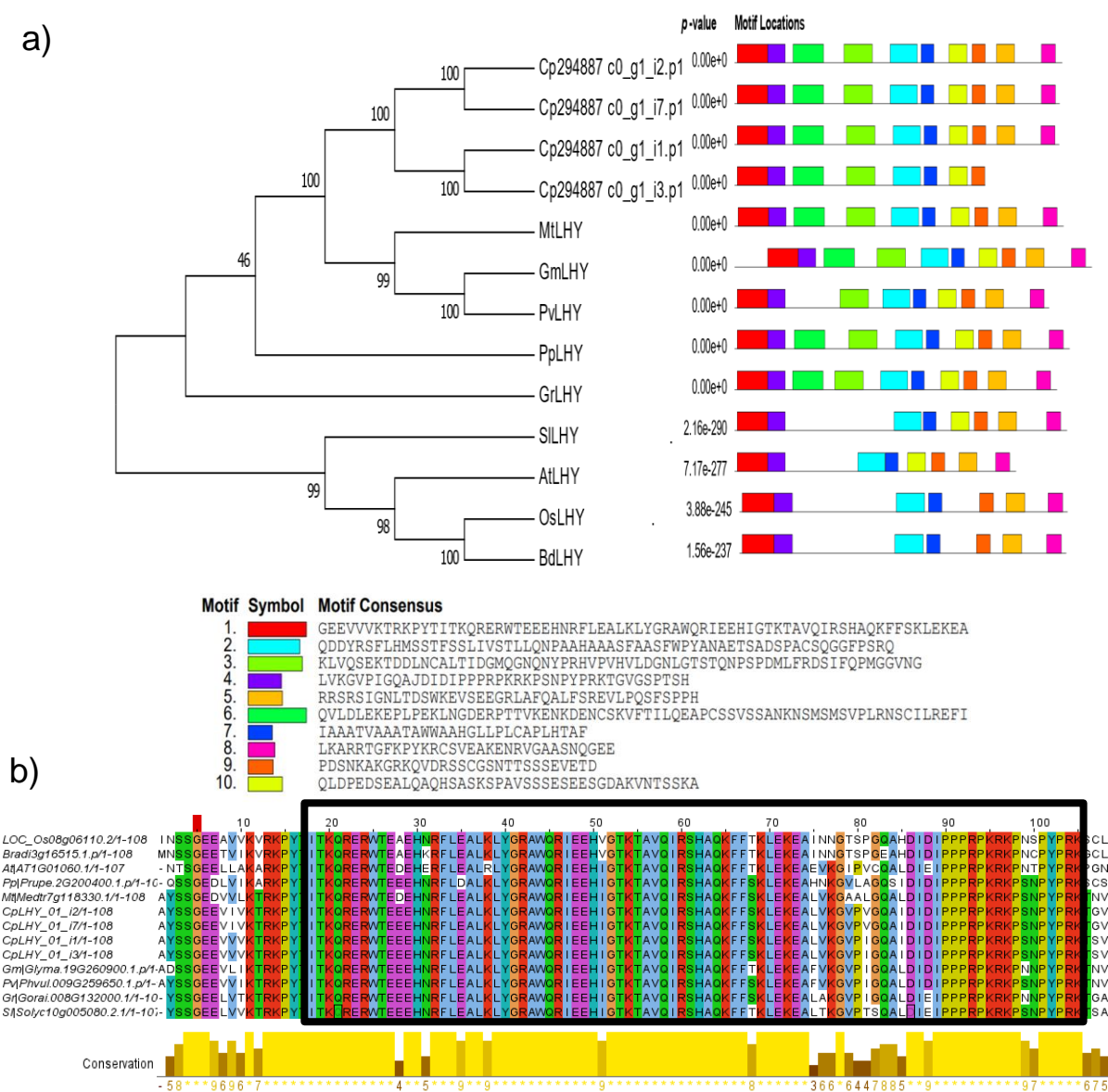
**Figura 1.** Árvore Neighbor-joining (matriz de distância) gerada a partir de seqüências candidatas de *C. pyramidale* ELF4 e seqüências ELF4 de outras plantas. Fenogram foi construído com o software MEGA 7. As seqüências completas de aminoácidos foram alinhadas e a análise Bootstrap foi realizada com base em 2000 repetições. A identificação das seqüências está no material suplementar (Tab S1).



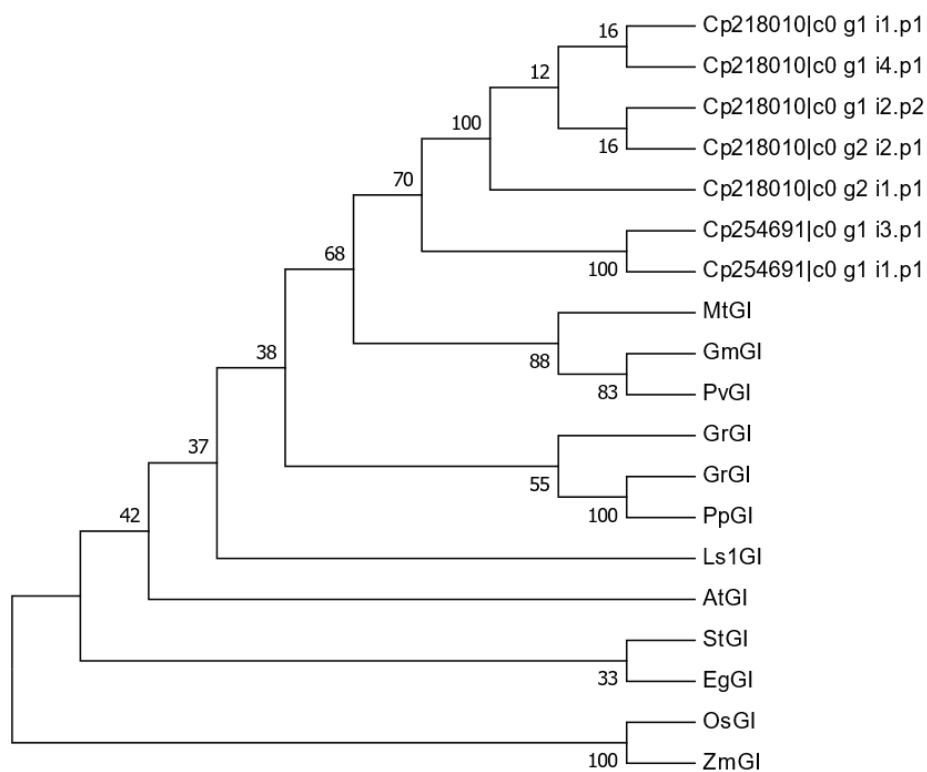
**Figura 2.** Motivos de aminoácidos conservados do domínio DUF1313 nas isoformas de ELF4 de *C. pyramidale*. A abscissa indica o número de resíduos de aminoácidos e o eixo vertical indica a altura do resíduo, conforme descrito pela porcentagem de resíduos no tipo. A caixa indica os quatro resíduos de aminoácidos conservados das proteínas do tipo IRRV e ISKV da família DUF1313.



**Figura 3.** a) Análise fenética e de motivos conservados das proteínas PRR (3, 5, 7 e 9) de *C. pyramidale* com onze diferentes espécies. Fenograma foi construído com o software MEGA 7. As seqüências completas de aminoácidos foram alinhadas e a análise Bootstrap foi realizada com base em 2000 repetições. Os motivos protéicos são mostrados abaixo do alinhamento; alinhamento de seqüências de aminoácidos das proteínas PRRs. A comparação de seqüências foi realizada com o software Clustal Omega com parâmetros padrão. As barras coloridas na seqüência mostram resíduos e motivos conservados; b) Região do domínio pseudo-receptor, os triângulos amarelos indicam a posição do motivo DDK; c) Região do domínio CCT. A identificação das seqüências está no material suplementar (Tab S4).

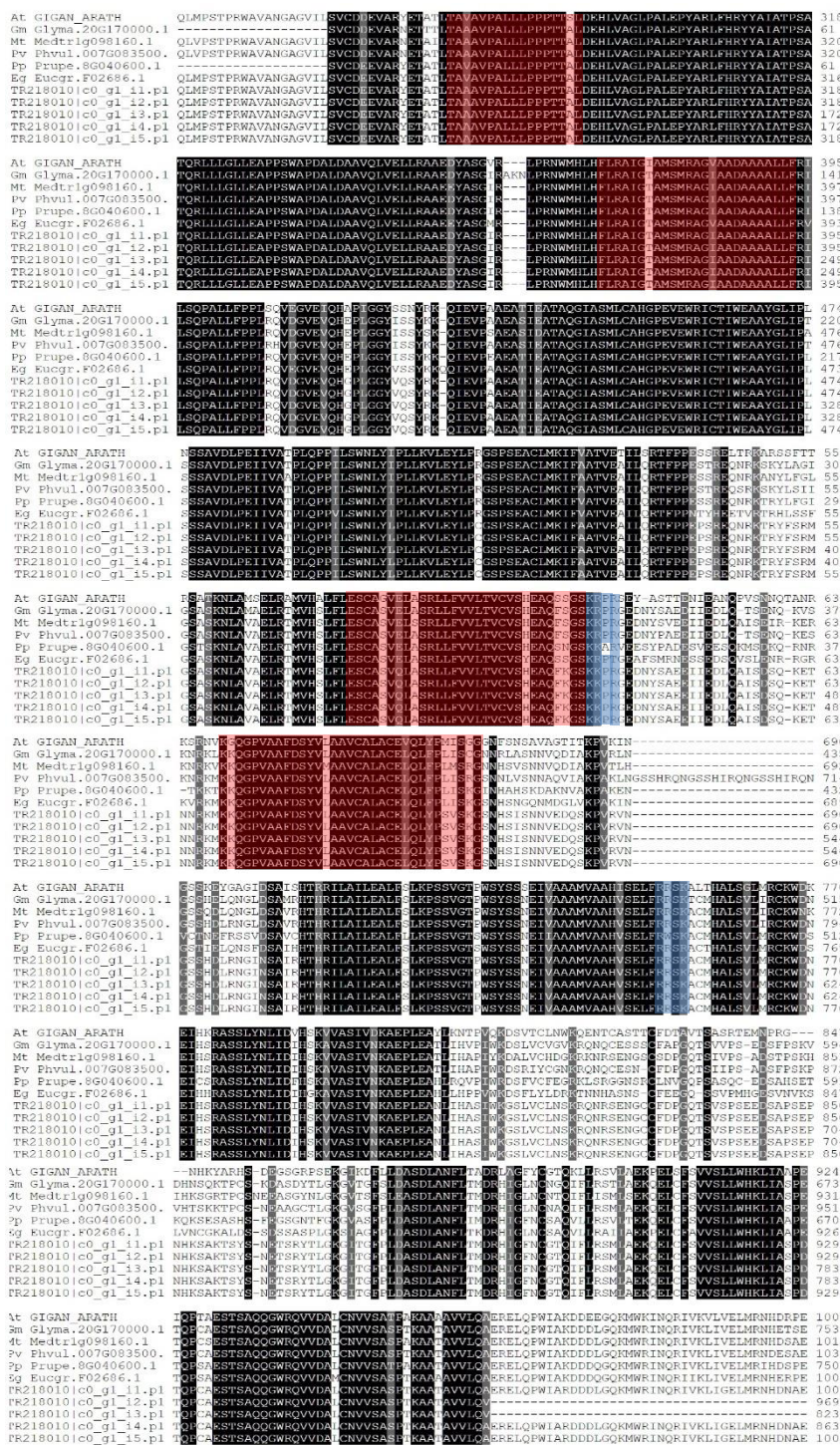


**Figura 4 a)** Análise fenética e de motivos conservados das proteínas LHY candidata em *C. pyramidale* com outras espécies. Os motivos protéicos são mostrados ao lado; **b)** alinhamento de seqüências de aminoácidos das proteínas LHY. A comparação de seqüências foi realizada com o software Clustal Omega com parâmetros padrão. As barras coloridas na seqüência mostram resíduos e motivos conservados. A caixa preta indica o domínio Myb\_DNA\_binding. A identificação das seqüências está no material suplementar (Tab S3).



**Figura 5.** Análise fenética das proteínas GI candidata em *C. pyramidale* com outras espécies. Fenogram foi construído com o software MEGA 7. As sequências completas de aminoácidos foram alinhadas e a análise Bootstrap foi realizada com base em 2000 repetições. A identificação das sequências está no material suplementar (Tab S2).





**Figura 6.** Alinhamento de genes candidatos de *Gigantea* em *C. pyramidale* entre *Arabidopsis thaliana* (At), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt), *Phaseolus vulgaris* (Pv), *Prunus persica* (Pp) e *Eucalyptus grandis* (Eg). As regiões sombreadas representam 100% de similaridade (preto), 80-99% de similaridade (cinza escuro com fonte branca) e 60-79% de similaridade (cinza claro com fonte preta). Regiões vermelhas indicam domínios transmembranas e regiões azuis representa sinalização de localização nuclear.

**Tabela 1.** Par de *primers* dos genes do relógio circadiano e referência utilizados na RT-qPCR do tecido radicular de *C. pyramidale*

Descrição do Primer	Gene	Sequência (5' – 3')	Tamanho (pb)	Tm (°C)	GC (%)	Tamanho do produto (bp)	<i>Slope</i>	E (%)	R <sup>2</sup>
<i>LHY</i>	<i>CpLHY</i>	F: GATGAACTCACCACCCTTCAA R: GGTCCATTTCTTCAGCTTCT	21 21	60.0 59.8	47.6 57.1	244	3.27	101.82	0.99
ELF4	<i>CpELF4</i>	F: CCAGACGCAACAAATAGAACC R: GAGAGGACGATTCCTTGCTTT	21 21	59.7	47.6	175	3.21	102.34	0.98
GIGANTEA	<i>CpGI</i>	F: GCTAGAGCAGTTCAGCCTGTG R: GGATACCATTGATTCGTGGTG	21 21	60.3 60.1	47.6 47.6	190	3.44	95.30	1
Regulador de Pseudo-resposta 95	<i>CpPRR95</i>	F: TCCGAACACTCTGACTCTGCT R: CATCCTCATGTGCTTCTGGTT	21 21	60.2 60.1	52.4 47.6	162	3.22	104.35	0.99
Phosphoinositide phosphatase	<i>SAC1</i>	F:CCAGTCCAGGTCCTTACATA R:TGAAGAGAATGGTTGGTACGG	21 21	60 60	52.4 47.6	101	3.18	101.14	0.99
Putative GTP diphosphokinase	<i>RSH1</i>	F:TGACCTCAGCCATGATACCTC R:ATGTTGCGAAGATGATCCAAG	21 21	60.1 60.1	52.4 42.9	168	3.51	92.64	0.99
Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	<i>HAG2</i>	F:GCATGAGACGAGGAGAGTTTG R:CACTTCGCCTGCTTAATTTTG	21 21	60 59.9	52.4 42.9	108	3.25	102.96	0.99

Tm, Temperatura de *Melting*; E, RT-qPCR eficiência de amplificação; R<sup>2</sup>, coeficiente de regressão

**Tabela 2.** Valores de expressão ( $\log_2FC$ ) e análise estatística (p-value) de quatro genes putativos do relógio circadiano (TG) e três genes de referência (GR) do transcriptoma radicular de *C. pyramidale* sob estresse salino. Coletas realizadas pela manhã (8, 8:30 e 8h, respectivamente).

Categoria	Genes candidatos	Controle x Sal 30min			Controle x Sal 2h			Controle x Sal 11d		
		$\log_2FC$	p-value	FDR	$\log_2FC$	p-value	FDR	$\log_2FC$	p-value	FDR
TG	<i>CpLHY</i> <i>Cp294887 c0_g1_i7</i>	11.06	4.40E-11	4.40E-07	9.498	1.70E-05	0.0047	0.536	0.3	0.67
TG	<i>CpELF4</i> <i>Cp24473 c0_g1_i2</i>	-8.074	0.002	0.11	-8.067	0.00065	0.056	-7.21	0.00024	0.011
TG	<i>CpGI</i> <i>Cp254691 c0_g1_i1</i>	9.853	2.20E-07	3.50E-04	11.188	6.50E-15	6.90E-11	-5.067	3.40E-12	1.80E-09
TG	<i>CpPRR95</i> <i>Cp101947 c1_g2_i1</i>	-0.117	0.89	1	0.683	0.27	0.89	1.48	0.00079	0.025
GR	<i>CpRSH1</i>	0.042	0.99	1	0.594	0.48	1	-0.694	0.24	0.60
GR	<i>CpHAG2</i>	0.299	0.71	1	0.129	0.84	1	-0.012	0.99	1
GR	<i>CpSAC1</i>	-0.015	0.99	1	-0.087	0.89	1	0.323	0.47	0.84

**Tabela 3.** Expressão relativa calculada pelo software REST de quatro genes putativos do relógio circadiano para Sal 30min, 2h, 11d e nas raízes de *C. pyramidale*.

<b>Sal 30min</b>						
Gene	Eficiência da reação	Expressão	Desvio padrão	95% C.I	P(H1)	Resultado
<i>CpLHY</i>	0.99	4.976	1.659-3.221	0.466-27.376	0.039	UR
<i>CpELF4</i>	0.98	1.645	0.811-2.459	2.099-5.129	0.09	ns
<i>CpGI</i>	1	6.274	3.743-9.241	3.345-10.494	0.012	UR
<i>CpPRR95</i>	0.99	0.895	0.288-5.678	0.175-4.863	0.982	ns
<b>Sal 2h</b>						
<i>CpLHY</i>	0.99	5.457	2.995-6.751	4.221-10.321	0.01	UR
<i>CpELF4</i>	0.98	0.967	0.674-2.765	0.196-5.897	0.91	ns
<i>CpGI</i>	1	6.995	4.897-2.865	3.443-11.233	0.02	UR
<i>CpPRR95</i>	0.99	0.943	0.367-0.590	0.235-5.917	0.985	ns
<b>Sal 11d</b>						
<i>CpLHY</i>	0.99	1.154	0,285-1,951	0,176 - 8,921	0,977	ns
<i>CpELF4</i>	0.98	0.389	0.326-1.183	0.178 – 0.389	0.04	DR
<i>CpGI</i>	1	0.328	0.129-0.455	0.224-0.680	0.04	DR
<i>CpPRR95</i>	0.99	0.846	0.111-0.487	0.230-3.178	0.741	ns

95% C.I. (95% Intervalo de confiança); P(H1) (Teste de hipótese); UR (induzido a  $p < 0.05$ ); DR (reprimido a  $p < 0.05$ ); ns (diferença não significativa  $p \leq 0.05$ )

## 6 CONCLUSÃO GERAL

O estudo da fisiologia de *C. pyramidale* permitiu verificar as respostas dessa espécie após a exposição ao choque salino (200 mM). Esse desencadeou respostas rápidas em seus parâmetros fisiológicos e bioquímicos, tanto na parte aérea como no tecido radicular. Sendo a raiz o tecido a demonstrar alterações mais rápidas em seu metabolismo para alterar essa nova condição ambiental. A aplicação do choque salino em diferentes momentos do dia permitiu demonstrar que as respostas a elevadas concentrações de NaCl é um processo dinâmico em que alterações não são condições constantes. Essas podem ser observados em alguns momentos do dia e em outros não, ou seja, flutuações diárias também são uma fonte de variação em experimentos. Esse ensaio experimental permitiu verificar a interferência do ritmo circadiano nas respostas fisiológicas.

A análise do transcriptoma do tecido radicular de *C. pyramidale* permitiu a identificação de genes putativos do relógio circadiano (ELF4, LHY, *Gigantea* e PRR95). Foi possível verificar que a salinidade afetou o nível de expressão desses candidatos, sugerindo que eles possam estar modulando vias de saída de resposta a salinidade. Nesse contexto, este trabalho permitiu melhorar o entendimento das respostas fisiológicas e moleculares de *C. pyramidale* sob situações de aumento de concentrações de NaCl na zona radicular, verificando as influências do ritmo circadiano em suas respostas bioquímicas e o impacto do aumento da salinidade na expressão dos genes do relógio circadiano.

## REFERÊNCIAS

- ALABADÍ, D.; OYAMA, T.; YANOVSKY, M. J.; HARMON, F. G.; MÁŠ, P.; KAY, S. A. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock. **Science**, v. 293, n. 5531, p. 880-883, 2001. doi:10.1126/science.1061320
- ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R.; SOUZA, M. M. G.; BOLOGNESE, A. M. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of oral biology**, v. 53, n. 6, p. 545-552, 2008. doi:10.1016/j.archoralbio.2007.12.001
- ATKINS, K. A.; DODD, A. N. Circadian regulation of chloroplasts. **Current opinion in plant biology**, v. 21, p. 43-50, 2014. doi:10.1016/j.pbi.2014.06.008
- BAHIA, M. V.; SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6, p. 1402-1405, 2005. doi:10.1590/S0103-50532005000800017
- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 403, p. 1607-1621, 2004. doi:10.1093/jxb/erh196
- BATOOL, N.; SHAHZAD, A.; ILYAS, N. Plants and Salt stress. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 7, n. 14, p. 1439-1446, 2014.
- BENDIX, C.; MARSHALL, C. M.; HARMON, F. G. Circadian Clock Genes Universally Control Key Agricultural Traits. **Molecular plant**, v. 8, n. 8, p. 1135-1152, 2015. doi:10.1016/j.molp.2015.03.003
- CALIXTO, C. P. G.; WAUGH, R.; BROWN, J. W. S. Evolutionary relationships among barley and *Arabidopsis* core circadian clock and clock-associated genes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 80, n. 2, p. 108-119, 2015. doi:10.1007/s00239-015-9665-0
- CAMPOS, M.; HSIE, B. Photosynthesis and antioxidant activity in *Jatropha curcas* L. under salt stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 55-67, 2012. doi:10.1590/S1677-04202012000100008
- 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, 2008. doi:10.1093/aob/mcn125
- COVINGTON, M. F.; MALOOF, J. N.; STRAUME, M.; KAY, S. A. Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. **Genome biology**, v. 9, n. 8, p. 130-148, 2008. doi:10.1186/gb-2008-9-8-r130
- CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P. O.; BARBOSA, A. M.; MÉLO, D. L. F. M.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of**

**ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 409-412, 2007. doi:10.1016/j.jep.2006.12.005

DIOS, V. R.; GESSLER, A.; FERRIO, J. P.; ALDAY, J. G.; BAHN, M.; DEL CASTILLO, J.; DEVIDAL, S.; GARCÍA-MUÑOZ, S.; KAYLER, Z.; LANDAIS, D.; MARTÍN-GÓMEZ, P.; MILCU, A.; PIEL, C.; PIRHOFER-WALZL, K.; RAVEL, O.; SALEKIN, S.; TISSUE, D. T.; TJOELKER, M. G.; VOLTAS, J.; ROY, J. Circadian rhythms have significant effects on leaf-to-canopy scale gas exchange under field conditions. **Gigascience**, v. 5, n. 1, p. s13742-016-0149-y, 2016. doi:10.1186/s13742-016-0149-y

DIOS, V. R.; GESSLER, A.; FERRIO, J. P.; ALDAY, J.; BAHN, M.; DEL CASTILLO, J.; DEVIDAL, S.; GARCÍA-MUÑOZ, S.; KAYLER, Z.; LANDAIS, D.; MARTÍN-GÓMEZ, P.; MILCU, A.; PIEL, C.; PIRHOFER-WALZL, K.; RAVEL, O.; SALEKIN, S.; TISSUE, D.; TJOELKER, M.; VOLTAS, J.; ROY, J. Circadian rhythms regulate the environmental responses of net CO<sub>2</sub> exchange in bean and cotton canopies. **Agricultural and forest meteorology**, v. 239, p. 185-191, 2017. doi:10.1016/j.agrformet.2017.03.014

DODD, A. N.; SALATHIA, N.; HALL, A.; KÉVEI, E.; TÓTH, R.; NAGY, F.; HIBBERD, J. M.; MILLAR, A. J.; WEBB, A. A. R. Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival and competitive advantage. **Science**, v. 309, n. 5734, p. 630-633, 2005. doi:10.1126/science.1115581

DODD, A. N.; BELBIN, F. E.; FRANK, A.; WEBB, A. A. R. Interactions between circadian clocks and photosynthesis for the temporal and spatial coordination of metabolism. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 245, 2015. doi:10.3389/fpls.2015.00245

DUARTE, B.; SANTOS, D.; MARQUES, J. C.; CAÇADOR, I. Ecophysiological adaptations of two halophytes to salt stress: Photosynthesis, PS II photochemistry and anti-oxidant feedback - Implications for resilience in climate change. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 67, p. 178-188, 2013. doi:10.1016/j.plaphy.2013.03.004

ESTEVEES, B. S.; SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 4, p. 6, 2008. doi:10.4257/oeco.2008.1204.06

FABRICANTE, J. R.; ANDRADE, L. A.; MARQUES, F. J. Caracterização populacional de *Melocactus zehntneri* (Britton & Rose) Luetzelburg (Cactaceae) ocorrente em um inselbergue da Caatinga paraibana. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 61-67, 2010.

FALCÃO, H. M.; MEDEIROS, C. D.; SILVA, B. L. R.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ALMEIDA-CORTEZ, J. S.; SANTOS, M. G. 2015. Phenotypic plasticity and ecophysiological strategies in a tropical dry forest chronosequence: A study case with *Poincianella pyramidalis*. **Forest Ecology and Management**, v. 340, p. 62-69, 2015. doi:10.1016/j.foreco.2014.12.029

FAO; ITPS. Global soil status, processes and trends. In: CAON, L., FORLANO, N., KEENE, C4SALA, M., SOROKIN, A., VERBEKE, I., WARD, C. (Eds.), **Status of the World's Soil Resources (SWSR) - Main Report**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Intergovernmental Technical Panel on Soils, Rome, Italy, 2015, p. 100-146. doi:ISBN 978-92-5-109004-6

FERNANDES, P. D.; GHEYI, H. R.; ANDRADE, E. P.; MEDEIROS, S. S. Biossalinidade e produção agrícola. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. S.; LACERDA, C. F. **Manejo da salinidade na agricultura**: estudos básicos e aplicados. Fortaleza, INCT Sal, 2010, p. 303-317.

FLOWERS, T. J.; HAJIBAGHERI, M. A.; CLIPSON, N. J. W. Halophytes. **The quarterly review of biology**, v. 61, n. 3, p. 313-337, 1986.

FOWLER, S. G.; COOK, D.; THOMASHOW, M. F. Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. **Plant physiology**, v. 137, n. 3, p. 961-968, 2005. doi:10.1104/pp.104.058354

FROSI, G.; BARROS, V. A.; OLIVEIRA, M. T.; CAVALCANTE, U. M. T.; MAIA, L. C.; SANTOS, M. G. Increase in biomass of two woody species from a seasonal dry tropical forest in association with AMF with different phosphorus levels. **Applied soil ecology**, v. 102, p. 46-52, 2016. doi:10.1016/j.apsoil.2016.02.009

FUKUDA, H.; NAKAMICHI, N.; HISATSUNE, M.; MURASE, H.; MIZUNO, T. Synchronization of plant circadian oscillators with a phase delay effect of the vein network. **Physical Review Letters**, v. 99, n. 9, p. 098102, 2007. doi:10.1103/PhysRevLett.99.098102

GARDNER, M. J.; HUBBARD, K. E.; HOTTA, C. T.; DODD, A. N.; WEBB, A. A. R. 2006. How plants tell the time. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 1, p. 15-24, 2006. doi:10.1042/BJ20060484

GARNER, W. W.; ALLARD, H. A. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. **Monthly Weather Review**, v. 48, n. 7, p. 415-415, 1920.

GESSLER, A.; ROY, J.; KAYLER, Z.; FERRIO, J. P.; ALDAY, J. G.; BAHN, M.; DEL CASTILLO, J.; DEVIDAL, S.; GARCÍA-MUÑOZ, S.; LANDAIS, D.; MARTÍN-GOMEZ, P.; MILCU, A.; PIEL, C.; PIRHOFER-WALZL, K.; GALIANO, L.; SCHAUB, M.; HAENI, M.; RAVEL, O.; SALEKIN, S.; TISSUE, D. T.; TJOELKER, M. G.; VOLTAS, J.; HOCH, G.; DIOS, V. R. Night and day – Circadian regulation of night-time dark respiration and light-enhanced dark respiration in plant leaves and canopies. **Environmental and experimental botany**, v. 137, p. 14-25, 2017. doi:10.1016/j.envexpbot.2017.01.014

GHEYI, H. R. Problemas de salinidade na agricultura irrigada, in: OLIVEIRA, T.S., ASSIS JR, R.N., ROMERO, R.E., SILVA, J.R.C. (Eds.), **Agricultura, Sustentabilidade e o Semiárido**. Viçosa, MG, 2000, p. 329–349.

GIRI, B.; MUKERJI, K. G. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: Evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. **Mycorrhiza**, v. 14, n. 5, p. 307-312, 2004. doi:10.1007/s00572-003-0274-1

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; BARBOSA, M. R. V.; BOCAGE NETA, A. L.; FIGUEIREDO, M. A. Plantas endêmicas da caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.;



VIRGÍNIO, J.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L. ( ed.). **Vegetação e flora das caatingas**. APNE / CNIP, Recife, PE. 2002, p.103-115.

GREEN, R. M.; TINGAY, S.; WANG, Z. Y.; TOBIN, E. M. Circadian rhythms confer a higher level of fitness to *Arabidopsis* plants. **Plant physiology**, v. 129, n. 2, p. 576-584, 2002. doi:10.1104/pp.004374

GREENHAM, K.; MCCLUNG, C. R. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 10, p. 598, 2015. doi:10.1038/nrg3976

GRUNDY, J.; STOKER, C.; CARRÉ, I. A. Circadian regulation of abiotic stress tolerance in plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 648, 2015. doi:10.3389/fpls.2015.00648

GUPTA, B.; HUANG, B.; GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. **International journal of genomics**, v. 2014, p. 1–18, 2014. doi:10.1155/2014/701596

HARMER, S. L. The Circadian system in higher plants. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 357-377, 2009. doi:10.1146/annurev.arplant.043008.092054

HERRERO, E.; KOLMOS, E.; BUJDOSO, N.; YUAN, Y.; WANG, M.; BERNS, M. C.; UHLWORM, H.; COUPLAND, G.; SAINI, R.; JASKOLSKI, M.; WEBB, A.; GONCALVES, J.; DAVIS, S. J. EARLY FLOWERING4 Recruitment of EARLY FLOWERING3 in the nucleus sustains the *Arabidopsis* circadian clock. **The Plant Cell**, v. 24, n. 2, p. 428-443, 2012. doi:10.1105/tpc.111.093807

HSU, P. Y.; HARMER, S. L. Wheels within wheels: the plant circadian system. **Trends in plant science**, v. 19, n. 4, p. 240-249, 2014. doi:10.1016/j.tplants.2013.11.007

HUANG, W.; PÉREZ-GARCÍA, P.; POKHILKO, A.; MILLAR, A. J.; ANTOSHECHKIN, I.; RIECHMANN, J. L.; MAS, P. Mapping the core of the *Arabidopsis* circadian clock defines the network structure of the oscillator. **Science**, v. 336, n. 6077, p. 75-79, 2012. doi:10.1126/science.1219075

HUANG, C.; WEI, G.; JIE, Y.; WANG, L.; ZHOU, H.; RAN, C.; HUANG, Z.; JIA, H.; AHMAD, S. Plant physiology and biochemistry effects of concentrations of sodium chloride on photosynthesis , antioxidative enzymes , growth and fi ber yield of hybrid ramie. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 76, p. 86-93, 2014. doi:10.1016/j.plaphy.2013.12.021

KIM, W. Y.; SALOMÉ, P. A.; FUJIWARA, S.; SOMERS, D. E.; MCCLUNG, C. R.; Characterization of pseudo-response regulators in plants. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2010, p. 357–78. doi:10.1016/S0076-6879(10)71019-3

KOORNNEEF, M.; MEINKE, D. The development of *Arabidopsis* as a model plant. **The Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 909-921, 2010. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04086.x

LATEF, A. A. H. A.; MIRANSARI, M. The Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress. In: **Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses**.

Springer, New York, NY, 2014, p. 23–39. doi:10.1007/978-1-4939-0721-2

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e Conservação da Caatinga. In: **Ecologia e Conservação da Caatinga**. 2. ed. Editora Universitária da UFPE, Recife. 2003, p. 822.

LEIGH, R. A.; WYN JONES, R. G. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell. **New Phytologist**, v. 97, n. 1, p. 1-13, 1984. doi:10.1111/j.1469-8137.1984.tb04103.x

LEITE, A. V.; MACHADO, I. C. Biologia reprodutiva da “catingueira”( *Caesalpinia pyramidalis* Tul., Leguminosae-Caesalpinioideae), uma espécie endêmica da Caatinga. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 1, p. 79-88, 2009.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; LOCK, M.. **Legume of the Word**. Kew: Royal Botanic Garden. 2005.

LIMA, C. R.; BRUNO, R. D. L. A.; SILVA, K. D. R. G.; PACHECO, M. V.; ALVES, E. U.; ANDRADE, A. P. Physiological maturity of fruits and seeds of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, p. 231-240, 2012. doi:10.1590/S0101-31222012000200007

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139-158, 2005. doi:10.1016/j.abb.2005.10.018

MAIA, G. N. **Caatinga, árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D & Z ComputaçãoGráfica e Editora. 2004, p. 413.

MANSUR, R. J. C. N.; BARBOSA, D. C. A. Physiological behavior in young plants of four trees species of Caatinga submitted the two cycles of water stress. **Phyton**, v. 68, p. 97-106, 2000.

MARCOLINO-GOMES, J.; RODRIGUES, F. A.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; BENDIX, C.; NAKAYAMA, T. J.; CELAYA, B.; MOLINARI, H. B. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; HARMON, F. G.; NEPOMUCENO, A. Diurnal oscillations of soybean circadian clock and drought responsive genes. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86402, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0086402

MARTINO-CATT, S.; ORT, D. R. Low temperature interrupts circadian regulation of transcriptional activity in chilling-sensitive plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 9, p. 3731-3735, 1992. doi:10.1073/pnas.89.9.3731

MÁS, P.; KIM, W. Y.; SOMERS, D. E.; KAY, S. A. Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 426, n. 6966, p. 567-570, 2003.

MÁS, P.; YANOVSKY, M. J. Time for circadian rhythms: plants get synchronized. **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 5, p. 574-579, 2009. doi:10.1016/j.pbi.2009.07.010

MCCLUNG, C. R. Plant circadian rhythms. **The Plant Cell**, v. 18, n. 4, p. 792-803, 2006.

MCWATTERS, H. G.; DEVLIN, P. F. Timing in plants - A rhythmic arrangement. **FEBS letters**, v. 585, n. 10, p. 1474-1484, 2011. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.051

MEDEIROS, C. D.; FERREIRA NETO, J. R. C.; OLIVEIRA, M. T.; RIVAS, R.; PANDOLFI, V.; KIDO, É. A.; BALDANI, J. I.; SANTOS, M. G. Photosynthesis, antioxidant activities and transcriptional responses in two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars under salt stress. **Acta physiologiae plantarum**, v. 36, n. 2, p. 447-459, 2014. doi:10.1007/s11738-013-1425-4

MITSUI, A.; KUMAZAWA, S.; TAKAHASHI, A.; IKEMOTO, H.; CAO, S.; ARAI, T. Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. **Nature**, v. 323, n. 6090, p. 720, 1986.

MIZUNO, T.; NAKAMICHI, N. Pseudo-response regulators (PRRs) or true oscillator components (TOCs). **Plant and cell physiology**, v. 46, n. 5, p. 677-685, 2005. doi:10.1093/pcp/pci087

MIZUNO, T.; YAMASHINO, T. Comparative transcriptome of diurnally oscillating genes and hormone-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*: Insight into circadian clock-controlled daily responses to common ambient stresses in plants. **Plant and cell physiology**, v. 49, n. 3, p. 481-487, 2008. doi:10.1093/pcp/pcn008

MONTAIGU, A.; COUPLAND, G. The timing of GIGANTEA expression during day/night cycles varies with the geographical origin of *Arabidopsis* accessions. **Plant signaling & behavior**, v. 12, n. 7, p. e1342026-7, 2017. doi:10.1080/15592324.2017.1342026

MORALES, F. Thermal Energy Dissipation in Plants Under Unfavorable Soil Conditions. In: DEMMING-ADAMS, B. (Ed.), **Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria, Advances in Photosynthesis and Respiration**. Dordrecht: Springer Science Business Media, v. 40, 2014, p. 531-550. DOI 10.1007/978-94-017-9032-1

MÜHLING, K. H.; LÄUCHLI, A. Effect of salt stress on growth and cation compartmentation in leaves of two plant species differing in salt tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, n. 2, p. 137-146, 2002. doi:10.1078/0176-1617-00701

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 651-681, 2008. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911

NAKAMICHI, N.; KITA, M.; ITO, S.; YAMASHINO, T.; MIZUNO, T. Pseudo-Response Regulators, PRR9, PRR7 and PRR5, Together play essential roles close to the circadian clock of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n. 5, p. 686-698, 2005. doi:10.1093/pcp/pci086

NAKAMICHI, N. Molecular Mechanisms Underlying the *Arabidopsis* Circadian Clock. **Plant and Cell Physiology**, v. 52, n. 10, p. 1709-1718, 2011. doi:10.1093/pcp/pcr118

NAKAMICHI, N.; KIBA, T.; KAMIOKA, M.; SUZUKI, T.; YAMASHINO, T.; HIGASHIYAMA, T.; SAKAKIBARA, H.; MIZUNO, T. Transcriptional repressor PRR5 directly regulates clock-output pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 42, p. 17123-17128, 2012. doi:10.1073/pnas.1205156109

NOVAKOVA, M.; MOTYKA, V.; DOBREV, P. I.; MALBECK, J.; GAUDINOVA, A.; VANKOVÁ, R. Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 421, p. 2877-2883, 2005. doi:10.1093/jxb/eri282

NUSINOW, D. A.; HELFER, A.; HAMILTON, E. E.; KING, J. J.; IMAIZUMI, T.; SCHULTZ, T. F.; FARRÉ, E. M.; KAY, S. A. The ELF4-ELF3-"LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 398, 2011. doi:10.1038/nature10182

PARA, A.; FARRE, E. M.; IMAIZUMI, T.; PRUNEDA-PAZ, J. L.; HARMON, F. G.; KAY, S. A. PRR3 Is a Vascular Regulator of TOC1 Stability in the *Arabidopsis* Circadian Clock. **The Plant Cell**, v. 19, n. 11, p. 3462-3473, 2007. doi:10.1105/tpc.107.054775

PARK, H. J.; QIANG, Z.; KIM, W. Y.; YUN, D. J. Diurnal and circadian regulation of salt tolerance in *Arabidopsis*. **Journal of plant biology**, v. 59, n. 6, p. 569-578, 2016. doi:10.1007/s12374-016-0317-8

PASCALE, S.; RUGGIERO, C.; BARBIERI, G. Physiological Responses of Pepper to Salinity and Drought. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 1, p. 48-54, 2003.

PEDROTTI, A.; CHAGAS, R. M.; RAMOS, V. C.; PRATA, A. P. N.; LUCAS, A. A. T.; SANTOS, P. B. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 1308-1324, 2015. doi:10.5902/2236117016544

PITTENDRIGH, C. S. Temporal organization: Reflections of a Darwinian Clock - Watcher. **Annual review of physiology**, v. 55, n. 1, p. 17-54, 1993.

POLLE, A.; CHEN, S. On the salty side of life: Molecular, physiological and anatomical adaptation and acclimation of trees to extreme habitats. **Plant, cell & environment**, v. 38, n. 9, p. 1794-1816, 2015. doi:10.1111/pce.12440

PORCEL, R.; AROCA, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 1, p. 181-200, 2012. doi:10.1007/s13593-011-0029-x

QIAN, H.; HU, B.; YU, S.; PAN, X.; WU, T.; FU, Z. The effects of hydrogen peroxide on the circadian rhythms of *Microcystis aeruginosa*. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33347, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0033347

QUEIROZ, L. P. **Leguminosas da Caatinga**. Feira de Santana: UEFS, 2009. 467 p.

- RICHARDS, L. A. **Diagnosis and Improvement of Saline and Alkaline Soils**. U.S. Department of Agriculture Handbook No. 60. Washington, DC: U.S. Government Printing Office. 1954, p. 160. doi:10.2136/sssaj1954.03615995001800030032x
- RIVAS, R.; OLIVEIRA, M. T.; SANTOS, M. G. Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 200-208, 2013. doi:10.1016/j.plaphy.2012.11.026
- ROENNEBERG, T.; WIRZ-JUSTICE, A.; MERROW, M. Life between clocks: Daily temporal patterns of human chronotypes. **Journal of biological rhythms**, v. 18, n. 1, p. 80-90, 2003. doi:10.1177/0748730402239679
- SEO, P. J.; MAS, P. Multiple Layers of Posttranslational Regulation Refine Circadian Clock Activity in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 26, n. 1, p. 79-87, 2014. doi:10.1105/tpc.113.119842
- SILVA, L. B.; SANTOS, F. A. R. S.; GASSON, P.; CUTLER, D. Anatomia e densidade básica da madeira de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae), espécie endêmica da caatinga do Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 436-445, 2009. doi:10.1590/S0102-33062009000200015
- SIMON, N. M. L.; DODD, A. N. A new link between plant metabolism and circadian rhythms?. **Plant, cell & environment**, v. 40, n. 7, p. 995-996, 2017. doi:10.1111/pce.12939
- SOMERVILLE, C.; KOORNNEEF, M. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 11, p. 883, 2002. doi:10.1038/nrg927
- SWEENEY, B. M. Biological Clocks in Plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 14, n. 1, p. 411-440, 1962.
- SYED, N. H.; PRINCE, S. J.; MUTAVA, R. N.; PATIL, G.; LI, S.; CHEN, W.; BABU, V.; JOSHI, T.; KHAN, S.; NGUYEN, H. T. Core clock, SUB1, and ABAR genes mediate flooding and drought responses via alternative splicing in soybean. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 22, p. 7129-7149, 2015. doi:10.1093/jxb/erv407
- SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in plant science**, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010. doi:10.1016/j.tplants.2009.11.009
- TUTEJA, N. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2007. p. 419-438. doi:10.1016/S0076-6879(07)28024-3
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: A review. **Amino acids**, v. 35, n. 4, p. 753-759, 2008. doi:10.1007/s00726-008-0061-6
- VOLKMAR, K. M.; HU, Y.; STEPPUHN, H. Physiological responses of plants to salinity: A review. **Canadian journal of plant science**, v. 78, n. 1, p. 19-27, 1998. doi:10.4141/P97-020

WANG, L.; FUJIWARA, S.; SOMERS, D. E. PRR5 regulates phosphorylation, nuclear import and subnuclear localization of TOC1 in the *Arabidopsis* circadian clock. **The EMBO journal**, v. 29, n. 11, p. 1903-1915, 2010. doi:10.1038/emboj.2010.76

WELLER, J. L.; ORTEGA, R. Genetic control of flowering time in legumes. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 207, 2015. doi:10.3389/fpls.2015.00207

WICKE, B.; SMEETS, E.; DORNBURG, V.; VASHEV, B.; GAISER, T.; TURKENBURG, W.; FAAIJ, A. The global technical and economic potential of bioenergy from salt-affected soils. **Energy & Environmental Science**, v. 4, n. 8, p. 2669-2681, 2011. doi:10.1039/c1ee01029h

WILKINS, O.; WALDRON, L.; NAHAL, H.; PROVART, N. J.; CAMPBELL, M. M. Genotype and time of day shape the *Populus* drought response. **The Plant Journal**, v. 60, n. 4, p. 703-715, 2009. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03993.x

WILKINS, O.; BRÄUTIGAM, K.; CAMPBELL, M. M. Time of day shapes *Arabidopsis* drought transcriptomes. **The Plant Journal**, v. 63, n. 5, p. 715-727, 2010. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04274.x

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

YAMAGUCHI, T.; BLUMWALD, E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. **Trends in plant science**, v. 10, n. 12, p. 615-620, 2005. doi:10.1016/j.tplants.2005.10.002

YENSEN, N. Halophyte uses for the twenty-first century. In: KHAN, M. A.; WEBER, D. (eds). **Ecophysiology of high salinity tolerant plants tasks for vegetation science**. (Springer Netherlands), 2006, p. 367-396.

YON, F.; SEO, P. J.; RYU, J. Y.; PARK, C. M.; BALDWIN, I. T.; KIM, S. G. Identification and characterization of circadian clock genes in a native tobacco, *Nicotiana attenuata*. **BMC plant biology**, v. 12, n. 1, p. 172, 2012. doi:10.1186/1471-2229-12-172

ZHU, J. K. Regulation of ion homeostasis under salt stress. **Current opinion in plant biology**, v. 6, n. 5, p. 441-445, 2003. doi:10.1016/S1369-5266(03)00085-2

# APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA *PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*

Plant Physiology and Biochemistry 158 (2021) 385–395



Contents lists available at ScienceDirect

Plant Physiology and Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/plaphy](http://www.elsevier.com/locate/plaphy)



Research article

## Remobilization of leaf Na<sup>+</sup> content and use of nonstructural carbohydrates vary depending on the time when salt stress begins in woody species

Laís L. Lima<sup>a</sup>, Gabriella Froisi<sup>a,b</sup>, Rafaela Lopes<sup>a</sup>, Mauro Guida Santos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Botany Department, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, 50670-901, Brazil

<sup>b</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Gas exchange  
Proline  
Saline stress  
Sodium recirculation  
Starch  
Sugar metabolism

### ABSTRACT

Basic mechanisms are known to promote salt tolerance in plants: a delay in Na<sup>+</sup> uptake or rapid Na<sup>+</sup> remobilization from leaf tissue. We measured dynamics of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio and components of carbon metabolism during the first 72 h after saline stress (200 mM NaCl) began in *Cenostigma pyramidale*, a woody species, under controlled conditions. Saline stress at two times: one plant group at the beginning of the morning and the other in the evening. Stressed plants had three times more Na<sup>+</sup> in leaves than did control plants in the first 24 h. However, in the next few hours, despite new applications of saline solution, the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio continued to decline. Several samples, including night treatments, provided evidence that this species uses Na<sup>+</sup> recirculation mechanisms to endure salt stress. Effects of salt on the traits evaluated differed depending on the time when stress began. Between the two saline treatments, in the first 24 h after saline stress, gas exchange decreased more strongly in morning-stressed plants, when large amounts of Na<sup>+</sup> reached the leaf and K<sup>+</sup> left this organ. Nevertheless, when stress was applied in the evening, leaf Na<sup>+</sup> remobilization was faster, and the soluble sugar/starch ratio remained greater than did the control. Our data suggested that time of the beginning of salt stress could change the level of damage. Morning-stressed plants synthesized greater amounts of proline, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and malondialdehyde than did night-stressed plants. We recommend that details regarding the time of stress be taken into consideration in physiological studies.

### 1. Introduction

Salinity can lead to biomass loss worldwide, although many questions remain and this problem continues to increase with climate change (Polle and Chen, 2015; Isayenkov and Maathuis, 2019). Salinization promotes a reduction in plant productivity because it causes physiological drought, toxicity caused by the accumulation of ions (mainly Na<sup>+</sup>), and nutritional imbalance (Munns and Tester, 2008; Polle and Chen, 2015). To support this condition, plants have intrinsic tolerance mechanisms to avoid severe damage to their metabolism, such as reduced stomatal conductance and transpiration (Froisi et al., 2017) and ion re-translocation between different tissues (Nemati et al., 2011; Henderson et al., 2015; Fan et al., 2018).

Ion movement throughout the plant is dependent on the sap from conducting tissues, which are regulated by the gas exchange during the day. Thus, traits such as light and temperature could change ion movement through plant tissues. The application of salt stress at different times during the day led to different levels of tolerance to salt

stress in *Arabidopsis* (Park et al., 2016). One of the mechanisms of salinity tolerance is the ability to re-translocate and prevent ion uptake under high salt concentrations in the soil solution (Isayenkov and Maathuis, 2019). This behavior could support the maintenance of carbon metabolism in woody species (Henderson et al., 2015). A previous study on a tree species showed changes in Na<sup>+</sup> leaf content when plants were inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus in a controlled experiment with NaCl application; thus, suggesting that this species was able to achieve Na<sup>+</sup> ion homeostasis in the leaves through more efficient tissue hydration (Froisi et al., 2017).

Under salt stress, those plant species that have a rapid recirculation of salt ions, could be considered more tolerant. However, different effects could occur among species, depending on the amount of salt, the time it comes into contact with the root system (Nemati et al., 2011; Froisi et al., 2017; Fan et al., 2018), and the speed with which the salt reaches the leaves. If the salt ion re-translocation mechanism is regulated by genes (Polle and Chen, 2014; Fan et al., 2018), as well as the K<sup>+</sup> ion uptake regulation (Henderson et al., 2015), the time of day the salt is

\* Corresponding author.

E-mail address: [mauro.g santos@ufpe.br](mailto:mauro.g santos@ufpe.br) (M.G. Santos).

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.026>

Received 17 September 2020; Accepted 17 November 2020

Available online 21 November 2020

0981-9428/© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.



applied could influence tolerance to salt stress. This is particularly true for two reasons. First, the faster salt enters the leaves, the shorter the time for activation of all the genes involved in tolerance. Second, the circadian rhythm strongly influences gene activity and tolerance to saline stress (Park et al., 2016). Thus, the moment of contact with the saline likely plays an important role in plant responses.

Leaf photosynthetic metabolism products could alleviate the effects of salt stress, such as starch (Thalmann and Santelia, 2017) and nonstructural carbohydrates (Liu et al., 2018), performing functions, such as signaling, maintenance of water transport (Secchi et al., 2011), and osmotic regulation (Sani et al., 2016). Such components can undergo a strong change because of the effects of salinity on stomatal conductance and the photosynthetic machinery in tree species (Polle and Chen, 2014; Frosi et al., 2017). Among the sugar molecules, starch (Thalmann and Santelia, 2017), soluble sugars (Nemati et al., 2011), and their relationship play an important role in tolerance to salinity (Frosi et al., 2017; Liu et al., 2018). Thus, under salt stress, the maintenance of metabolism also would depend on the increase in the soluble sugar/starch ratio (Liu et al., 2018).

This study evaluated whether the time of day at the onset of stress influences the dynamics of  $\text{Na}^+$  ions and sugars in the leaf tissue of *Cenostigma pyramidale*, a woody species from a tropical dry forest. Thus, the plants were evaluated during the initial hours after being irrigated with a high concentration of salt close to the root system. We hypothesized that: 1) when the salt solution is applied early in the morning, the  $\text{Na}^+$  concentration in the leaf tissue will be renobilized more quickly compared to that of trees inoculated in the early evening because of a higher rate of transpiration; 2) among stressed plants, those that received salt at night will have a higher soluble sugar/starch ratio because of the slow increase in stress during the night.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material and growth conditions

*Cenostigma pyramidale* (Tul.) E. Gagnon & G. P. Lewis seeds were collected from the semi-arid region of northeastern Brazil. The seeds were disinfected in sodium hypochlorite solution (0.5%) and germinated in washed sand. After 6 d, the production of the first pair of leaves had occurred and plants were transferred to pots containing approximately 5 kg of washed sand. Plants were maintained under ideal hydration (pot capacity - 250 mL) until the application of the saline solution at 6 months of age. Furthermore, Hoagland solution (full strength HS) was added every 15 d to supply all nutrients necessary for the full development of the plants.

### 2.2. Experiment design

The plants were grown under greenhouse conditions in northeastern Brazil (8° 08' 58" S, 34° 56' 55" W) at an average temperature of  $34 \pm 2$  °C, 40–60% relative humidity, and natural lighting (maximum luminous flux:  $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Summer was the collection period for plant material when there was a 13 h/11 h (light/dark) cycle. To address the study questions, an experimental design was implemented with the following treatments: Day\*Control (DC), Day\* Salt (DS) with the application of saline irrigation at 08:00 h and Night\*Control (NC), and Night\*Sal (NS) with the application of saline irrigation at 17:00 h. These two times were chosen due to several plant physiology and molecular biology studies with abiotic stress beginning at different times throughout the day. We want to test whether plants behavior is similar. For each treatment, 48 biological replicates were designed (one plant per pot), for a total of 192 experimental units. At each set time was four biological replicates for each treatment (control and irrigated with NaCl solution) were conducted simultaneously, within the first 72 h after the first saline irrigation, with 200 mM NaCl. Leaves were immediately frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at  $-20$  °C for the

evaluation of biochemical parameters and nutrients.

### 2.3. Foliar relative water content (RWC), soil moisture (SM), and electrical conductivity (EC)

Leaf discs 3 cm in diameter were collected from mature and non-senescent leaves every morning of the experiment (06:00 h) and immediately weighed on a precision scale to obtain fresh weight (FW). Then, the discs were soaked for 24 h in deionized water and weighed again to obtain turgid weight (TW). Later, leaf discs were dried in an oven for 48 h at 60 °C and weighed to obtain dry weight (DW). The leaf RWC was calculated according to Barrs and Weatherley (1962):  $\text{RWC} (\%) = [\text{FW} - \text{DW} / \text{TW} - \text{DW}] \times 100$ . Soil moisture content was obtained using a soil moisture meter (v/v) (HFM 2030 Falker, Porto Alegre, BR).

The sand samples were collected (25 g) and homogenized in 25 mL of deionized water. This solution was stirred three times for 2 min, for a total of 6 min. The solution was held immobile for 24 h and the supernatant was collected to measure electrical conductivity using a conductivity meter (Model CD-4306, Lutron Electronic Enterprise Co., Taipei, Taiwan, China).

### 2.4. Gas exchange

Gas exchange was measured between 08:00 h and 09:00 h every day of the experiment in expanded and non-senescent leaves using an infrared gas analyzer (IRGA, ADC, model LCi-Pro; Hoddesdon, UK) and stomatal conductance ( $g_s$ ) and the net photosynthetic rate ( $A$ ). The water use efficiency ( $\text{WUE} = A/E$ ) was also calculated, where  $E$  is the transpiration rate. The photosynthetic photon flux density (PPFD) was determined according to the global radiation incident at the time of measurements, which was approximately  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  during the experiment. The vapor pressure deficit (VPD) was calculated in parallel with gas exchange measurements using the es-ea formula, where (es) is the saturating vapor pressure and (ea) is the ambient vapor pressure (Campbell and Norman, 1998), using temperature and air humidity obtained by a digital thermo-hygrometer (Thermo-Higro SH 122, J. Prolab, São José dos Pinhais, BR). The VPD ranged from 2.19 to 3.44 during the experiment.

### 2.5. Analyses of sugars, free amino acids (FAA), and total soluble proteins (TSP)

Leaves were used to determine the content of total soluble sugars (SS) (DuBois et al., 1956) using D (+) glucose as a standard and the absorbance was read at 490 nm. The insoluble fraction of the SS extract was used to determine the starch content. The pellet was hydrolyzed for 1 h with 10 units of amyloglucosidase, and the resulting sugars were analyzed (DuBois et al., 1956). Reducing sugars were also quantified (Nelson, 1944; Somogyi, 1951), as well as fructose content (Foreman et al., 1973). Nonstructural carbohydrates (NSCs) were defined as the sum of starch and SS. The SS/starch ratio was also calculated. The FAA, proline, and TSP were determined according to Moore and Stein (1948), Bates et al. (1973), and Bradford (1976), respectively.

### 2.6. Mineral nutrient analyses

For the quantification of potassium ( $\text{K}^+$ ) and sodium ( $\text{Na}^+$ ), 500 mg of leaf dry matter was used. The material was digested in a sulfuric acid solution ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) in a digester block at 350 °C to obtain a sample extract (Thomas et al., 1967).  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  contents were determined by flame photometry (DM-62, Digimed, São Paulo, Brazil) (Silva, 2009). The  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio was calculated using  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  data.

### 2.7. Foliar hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and malondialdehyde (MDA)

The MDA as a product of membrane lipid peroxidation was measured



according to Cakmak and Horst (1991) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as a common reactive oxygen species (ROS), were determined according to Alexieva et al. (2001).

### 2.8. Statistical analyses

Data were subjected to a test of normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variance to determine if the prerequisites for parametric statistic use were met. The dataset that did not meet the requirements was subjected to non-parametric tests. A *t*-test (Wilcoxon) was performed, with a significance level of 5%, to compare the means between treatments (Salt × Control) at each collection point within each experimental set. Principal component analysis (PCA) was performed to determine whether there were trends in the grouping of treatments and which variables were the most influential in the separation of the potential groups. The same variables could have been responsible for the differentiation of groups in both the day and night treatments. For this multivariate analysis, the Factoextra (Kassambara and Mundt, 2017), PCA mixdata, and ggplot2 packages were used. For all analyses, the software R 3.5.1 (R Core Team, 2018) was used.

## 3. Results

### 3.1. Foliar RWC, SM, and soil electrical conductivity (EC)

Treatments were not significantly different in RWC and SM among the three experimental days (Table 1). EC was approximately five times higher at the end of the experiment in the DS and NS treatments compared to their respective controls (Table 1).

### 3.2. Gas exchange

Gas exchange varied in the first 24 h after salt exposure. Overall, plants subjected to saline irrigation experienced reduced gas exchange and water status compared to control plants. Stomatal conductance ( $g_s$ ) decreased in plants subjected to saline irrigation from the second day of the experiment (after 24 h and 15 h in DS and NS, respectively) (Fig. 2a and b). Plants subjected to saline stress in the morning were reduced by 62.5%, 70%, and 53%  $g_s$  in the first 24 h, 48 h, and 72 h, respectively ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2a). Plants irrigated in the evening exhibited a milder reduction in  $g_s$  after the first 15 h of the saline stress (12.5%,  $p < 0.0001$ ). However, gas exchange dropped sharply in the following days of the experiment at 40 h (77.85%) and 63 h (76.4%) after salt stress ( $p$

$< 0.05$ ) (Fig. 2b). The reduction of  $g_s$  is one of the main defense mechanisms against water deficit caused by physiological drought because of high concentrations of salts.

The rate *A* of DS plants decreased by 30% 24 h after the application of saline irrigation ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2c). In the following readings, 48 h and 72 h, we observed a slight recovery with a decrease of 20% and 12%, respectively ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2c). The NS plants showed a 21% reduction in  $g_s$  after 15 h of exposure to salt ( $p < 0.001$ ). At 40 h and 63 h, plants subjected to stress performed 80% and 78.5% poorer than did control plants, respectively ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2d). Regarding WUE, the plants watered in the morning were not statistically different among treatments throughout the experiment (Fig. 2e). In the NS treatment, the control was more efficient in water use after 15 h and 40 h ( $p < 0.05$ ). At 63 h, no statistical differences were observed among treatments (Fig. 2f).

### 3.3. Foliar Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> content

Saline irrigation promoted the rapid accumulation of Na<sup>+</sup> and reduced K<sup>+</sup> in the leaves of *C. pyramidale* (Fig. 1a and b). Approximately 2 h after the application of saline stress to the DS plants and 4 h later for the NS plants, the leaves showed an increase in their concentrations ( $p < 0.05$ ). Surprisingly, after reaching a maximum concentration of Na<sup>+</sup> in relation to the control plants (around 24 h increased by 200% in both experimental sets), we observed successive decreases in the concentration of Na<sup>+</sup>. Despite new saline irrigation, the last sample showed no statistical differences with that of the control treatment. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio confirmed this behavior in both treatments (Fig. 1c and d).

### 3.4. Foliar sugars content

The variables related to carbon metabolism, such as SS and starch, showed different behavior patterns. For starch, plants subjected to saline stress had lower values than those of the controls, both in plants irrigated in the morning and at night. However, we observed significant differences for the DS plants in the first sampling (Fig. 3a). NS plants showed marked statistical differences 12 h after saline irrigation (Fig. 3b). Differences between the control and treatments were more prominent during the light period, particularly after 12 h of the bright period (Fig. 3a and b).

The DS plants triggered a reduction in SS concentrations after 8 h of saline stress. However, there was a tendency for an increase in SS concentration by the end of the experiment (Fig. 3c). In NS plants, such an increase was only observed at the last sampling (118%,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 3d). Regarding fructose, we found differences only between treatments in the night experiment, wherein plants subjected to saline conditions exhibited reduced concentrations of fructose (33%,  $p < 0.01$ ) (data not shown). Reducing sugars also performed differently in relation to the treatments. The DS-plant treatments had lower values for reducing sugars than did the control ( $p < 0.05$ ), and their increased levels were only found in the last samplings of the experiment. In NS plants, we found increased reducing sugars in the first hours after saline stress. This increase lasted for almost the entire experiment ( $p < 0.01$ ). In both experiments, the most prominent differences occurred during the light period (data not shown).

The SS/starch ratio exhibited different behaviors between the two treatments. The DS plants prioritized only SS production after the third application of the saline solution. However, NS plants had already prioritized SS production over starch since the end of the first saline application (Fig. 4a and b). Both treatments under salt stress produced either NSC or less than did the control plants, with the greatest reduction for the NS plants (Fig. 5a and b).

### 3.5. Foliar FAA and TSP content

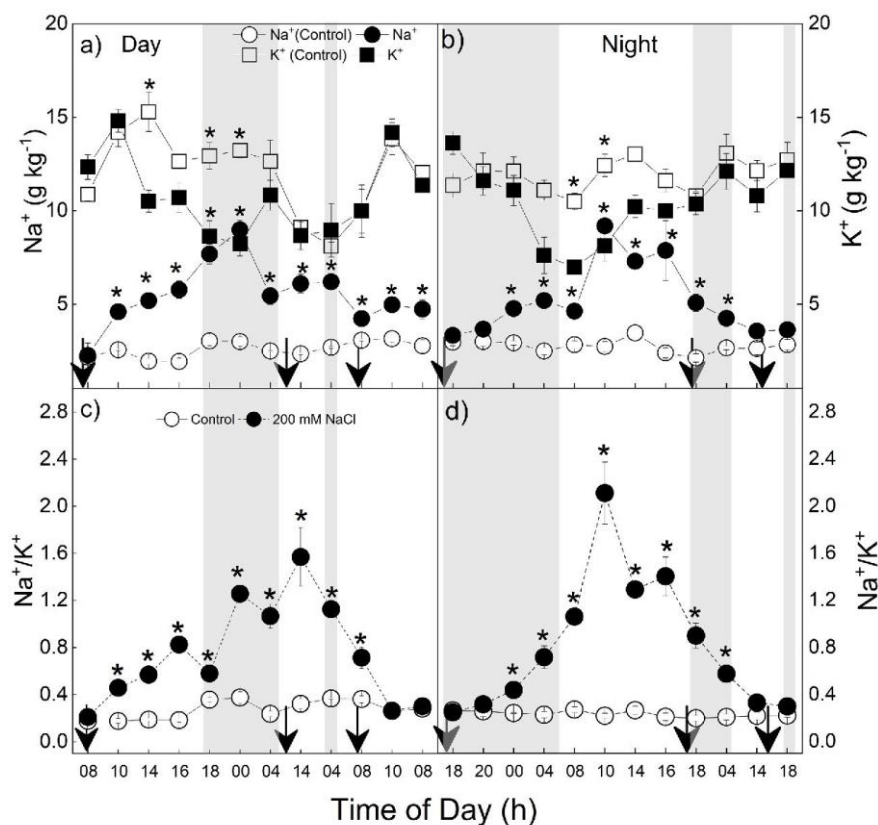
Only one moment of sampling showed statistical differences between

**Table 1**

Attributes measurements (RWC—relative water content; SM—soil moisture; EC—electrical conductivity) in young plants of *C. pyramidale* under control and salinity conditions (NaCl 200 mmol) under greenhouse conditions.

Parameters	Control			Stress (200 mM NaCl)		
	24h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>Day</b>						
SM (%)	14.1 ± 0.81	13.9 ± 0.59	14.3 ± 0.74	14.3 ± 0.63	14.01 ± 0.71	14.5 ± 0.46
EC (mS cm <sup>-1</sup> )	0.41 ± 0.03	0.52 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.48 ± 0.05	0.93 ± 0.23 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.8 <sup>a</sup>
RWC (%)	86.7 ± 9.5	82.3 ± 7.6	82.6 ± 9.4	89.4 ± 8.69	77.6 ± 9.6	73.1 ± 6.4
	15 h	40 h	63 h	15 h	40 h	63 h
<b>Night</b>						
SM (%)	14.5 ± 0.97	14.3 ± 0.55	14.6 ± 0.30	14.2 ± 0.89	14.72 ± 0.76	14.9 ± 0.92
EC (mS cm <sup>-1</sup> )	0.45 ± 0.04	0.47 ± 0.05	0.46 ± 0.04	0.47 ± 0.03	0.81 ± 0.31 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.4 <sup>a</sup>
RWC (%)	84.6 ± 7.5	89.4 ± 8.8	80.5 ± 7.6	88.5 ± 6.2	84.3 ± 9.7	79.2 ± 8.2

<sup>a</sup> Indicate statistically significant difference (*t*-test at 5%).



**Fig. 1.** (a–b) Concentrations of sodium ( $\text{Na}^+$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ) and (c–d)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio in young plants of *C. pyramidale* subjected to saline treatment (200 mM NaCl) at different times of the day (Day–8:00 and Night–17:00 h). Shaded area represents night time. Arrows indicate saline application timing ( $n = 3 \pm \text{SE}$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

the control and treatment groups for TSP. However, we found a tendency for increased concentrations in the last samplings for NS treatment plants with a statistical increase of 140% in relation to that of the control in the last sample ( $p < 0.01$ ) (Fig. 6a and b). For the FAA, we found differences only in the night treatment. Initially, there was an increase of 50% 2 h after saline irrigation ( $p < 0.01$ ). In the following samplings, we found differences wherein stressed plants showed lower FAA concentrations, with the last sampling having approximately 40% lower concentration than did the control plants (Fig. 6c and d). The treatments subjected to saline stress showed higher concentrations of proline throughout the experiment (Fig. 6e and f). Differing from the results for starch and reducing sugars, the most important differences for this amino acid occurred at night (between 14 and 24 h) for both DS and NS plants. The main difference between treatments subjected to saline stress was during the last samplings, when DS plants had a high leaf proline content, whereas this pattern was not observed in NS plants.

### 3.6. Foliar $\text{H}_2\text{O}_2$ and MDA content

As for the  $\text{H}_2\text{O}_2$  content, we found differences in both experimental

sets. However, only the  $\text{H}_2\text{O}_2$  content of DS plants sharply increased, with a peak three times higher in the last sample compared to that of the control plants (Fig. 7a and b). The DS plants had increased MDA concentrations in various samples. The greatest difference was approximately 400% more than that of the control plants, and this occurred in the last sampling (Fig. 7c). On the other hand, NS plants initially had reduced MDA levels that increased approximately 24 h after application of the saline stress. However, statistical differences were not significant until the end of the experiment (Fig. 7d).

### 3.7. PCA

We run PCA routines for each treatment set (Day and Night) using the biochemical and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  data. The ordination covering all variables accounted for 49% of the total data variation in day treatments. DIM1 accounted for 30% and DIM2 accounted for 19%. Concerning night treatments, the variables explained 42% of the total data variation. DIM1 accounted for 26% and DIM2 accounted for 16%. The PCA confirmed that the application of saline stress at different times during the day led to different metabolic behaviors (Fig. 8).

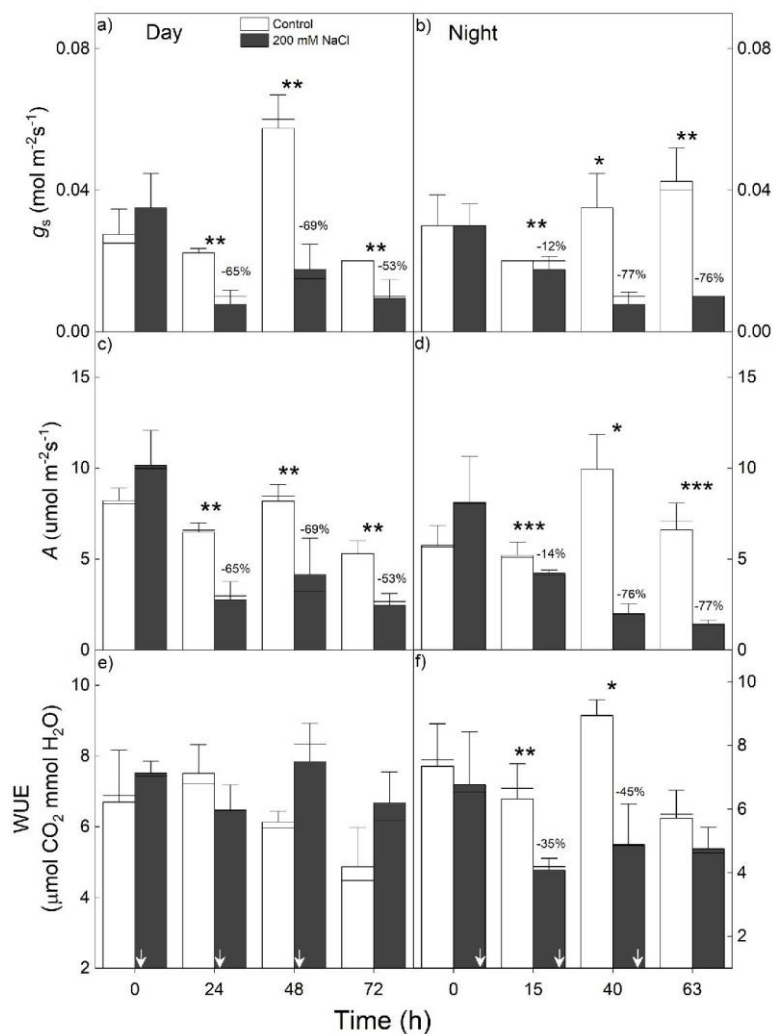


Fig. 2. (a–b) Stomatal conductance ( $g_s$ ); (c–d) net photosynthetic rate ( $A$ ) and (e–f) water use efficiency (WUE) in young plants of *C. pyramidale* subjected to saline treatment (200 mM NaCl) at different times of the day (Day–8:00 and Night–17:00 h). The percentage (a,b,c,d,f) represents the reduction when under salt stress in relation to the control for each moment of the day. Arrows indicate saline application timing ( $n = 3 \pm \text{SE}$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

#### 4. Discussion

Our results suggest that plants of the same species respond differently depending on the time of day when stress is applied. This difference in sensitivity to salt stress was expected, because the rate of transpiration, which facilitates the transport of  $\text{Na}^+$  from roots to shoots, is much higher during the day than at night. During the night,  $\text{Na}^+$  uptake occurs slowly at the beginning because of the low rate of transpiration, which allows the activation of salinity tolerance mechanisms.

Moreover, the present study shows that the daily dynamics of nonstructural carbohydrates depend on the time when salt stress begins.

Two basic mechanisms are known to promote salt tolerance: those that delay  $\text{Na}^+$  uptake into the plant and those that minimize the concentration of salts in the cytoplasm (Munns, 2002; Munns and Tester, 2008; Henderson et al., 2015). This strategy can play an important role in protecting shoot tissues against  $\text{Na}^+$  accumulation. Indeed, *C. pyramidale* showed low  $\text{Na}^+$  foliar levels after reaching a content three

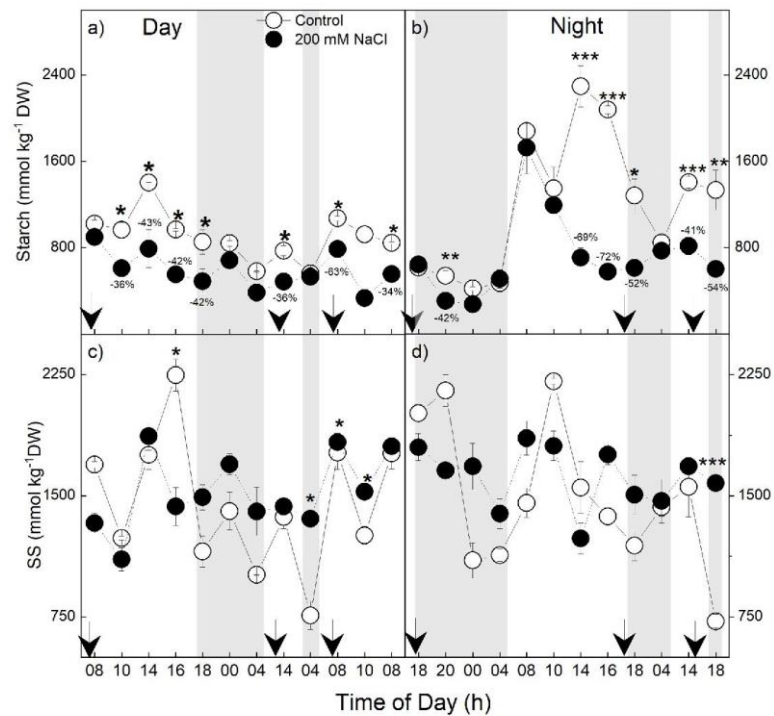


Fig. 3. (a–b) Starch, (c–d) and soluble sugars (SS) in young plants of *C. pyramidale* subjected to saline treatment (200 mM NaCl) at different times of the day (Day–8:00 and Night–17:00 h). The percentage (a–b) represents the reduction of the starch content in relation to the control for each moment of the day. Shaded area represents night time. Arrows indicate saline application timing ( $n = 3 \pm SE$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

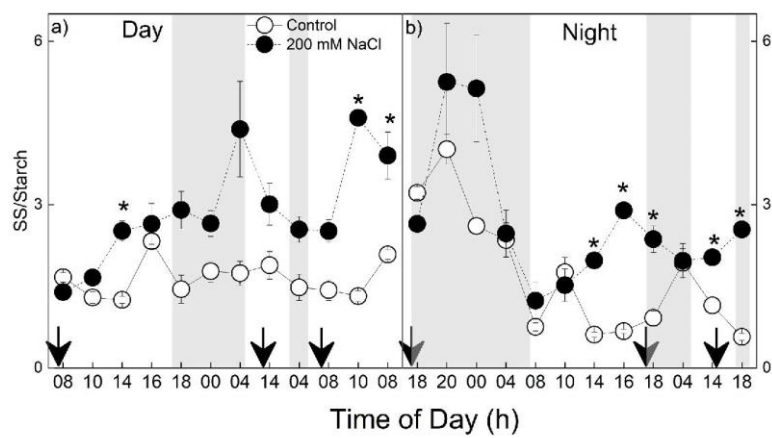


Fig. 4. (a–b) SS/Starch in young plants of *C. pyramidale* subjected to saline treatment (200 mM NaCl) at different times of the day (Day–8:00 and Night–17:00 h). Shaded area represents night time. Arrows indicate saline application timing ( $n = 3 \pm SE$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



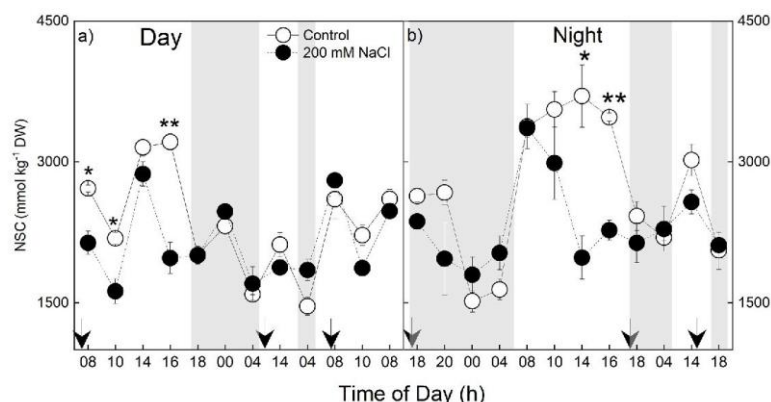


Fig. 5. (a–b) Non-structural carbohydrates (NSC) in young plants of *C. pyramidale* subjected to saline treatment (200 mM NaCl) at different times of the day (Day–8:00 and Night–17:00 h). Shaded area represents night time. Sample collected at night. Arrows indicate saline application timing ( $n = 3 \pm SE$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

times greater than that of the controls. Several samples, including that of nighttime treatments, provided strong evidence that this species uses  $\text{Na}^+$  recirculation mechanisms to face salt stress and to protect its photosystems. Even after the two new applications of saline solution, the  $\text{Na}^+$  content did not increase in the leaf tissue. This behavior reinforces what has already been found in *C. pyramidale* plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi and salt stress (Frosi et al., 2017). Therefore, our first hypothesis was not supported by our results.  $\text{Na}^+$  arrival in the leaves was fast only in the early stages after the first application of the saline solution. The  $\text{Na}^+$  ions always decreased faster in the NS plants, and there was no significant difference in  $\text{Na}^+$  content between treatments at the end of the evaluation.

These results suggest that night-stressed plants were able to use some mechanism of  $\text{Na}^+$  remobilization. A specific group of cotransporters, cation-chloride cotransporters (CCCs), have been shown to act on homeostasis among  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , and  $\text{Cl}^-$  in *Vitis vinifera* and *Arabidopsis* under salinity (Henderson et al., 2015; Wei et al., 2018). In our study, we did not evaluate  $\text{Cl}^-$  because of its limited structural laboratory conditions, unlike the previous study of the same group with this species (Frosi et al., 2017). However, the most sensitive part of salt stress is the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratio. This relationship had the same behavior between treatments, even after new salt applications, the tendency has always been to reduce  $\text{Na}^+$  or restore leaf  $\text{K}^+$  levels similar to that of the control.

Under high salinity and reduced  $g_s$ , the net  $\text{CO}_2$  assimilation rate decreased because of increased gas exchange resistance. This strategy is an acclimatization response of plants to saline stress, favoring water savings (Chaves et al., 2008). A photosynthetic decline was also found in the same species under less severe conditions of salt stress (100 mmol) (Frosi et al., 2017). Therefore, regardless of the timing of the application of stress, reductions in photosynthetic rates were expected in both experimental sets, as these responses have been widely described in glycophyte plants (Silva et al., 2010; Ben Ahmed et al., 2012; Huang et al., 2014; Frosi et al., 2017; Marriboina et al., 2017). The plants stressed in the early morning had a strongly decreased  $g_s$  in the first moments after saline stress because of the intense transpiration and rapid foliar salt increase. This changed the carbon partition in different sugars when compared to plants stressed at night. Thus, our second hypothesis was partially corroborated, because plants stressed at night showed a higher SS/starch ratio for longer after the applied stress. Only after the third application of saline solution in the morning-stressed plants did this relationship become strongly distanced from that of the

control plants.

Plant growth is the result of fine carbon management because even short periods of scarcity can lead to growth inhibition (Stitt et al., 2007; Sami et al., 2016; Liu et al., 2018). In the present study, foliar starch increased during the light period in control plants in both experimental sets, whereas it decreased in stressed plants. The higher starch content in the presence of light and its degradation in the dark occurred almost linearly (Webb and Satake, 2015; Mora-García et al., 2017), and patterns of accumulation and degradation were observed even when environmental variables, such as irradiance and concentrations of  $\text{CO}_2$  and nutrients, were altered (Gibon et al., 2009; Tschoep et al., 2009; Hummel et al., 2010). On the other hand, under saline stress, reduced  $g_s$  leads to less  $\text{CO}_2$  assimilation, limiting sugar synthesis. Our results showed changes in the pattern of starch synthesis between stress treatments. Under water deficit or osmotic stress, starch degradation appears to be mediated by hydrolytic enzymes; thus, suggesting that a complex network of enzymatic regulation is activated, resulting in plasticity in starch turnover (Thalmann et al., 2016). Although it is well documented that daylight and the circadian clock are key regulatory agents for starch metabolism, the final impact on starch enzyme activity under abiotic stress is not entirely clear (Thalmann and Santelia, 2017).

The difference in starch content in stressed plants as compared to that of the controls was greater in night-stressed plants, as shown in the SS/Starch ratio. These plants synthesized less starch on the first day after the application of salt than those stressed in the early morning. The focus on soluble sugar synthesis is because of the maintenance of water uptake by tissues. Additionally, it would lead to  $\text{Na}^+$  recirculation, whereas stimulating  $\text{K}^+$  increases from the root tissues to the leaves (Nemati et al., 2011). Thus, maintaining a high SS/Starch ratio could support the metabolism of *C. pyramidale*, avoid senescence, and aid in water transport. Foliar water content was maintained. In previous studies, different species showed NSC decrease under stress promoted by drought (Liu et al., 2018) or salinity (Nemati et al., 2011) because of the non-accumulation of starch. In the present study, NSC decreased between saline treatments in the first hours after NaCl application in the morning; however, this only occurred the next day in NS plants. In both treatments, this differed from that of the control plants was momentary, only after the first salt application. This shows the ability for metabolism adjustment in this species.

The maintenance of carbon metabolism also plays an important role in nitrogen metabolism; thus, both can act in species tolerance

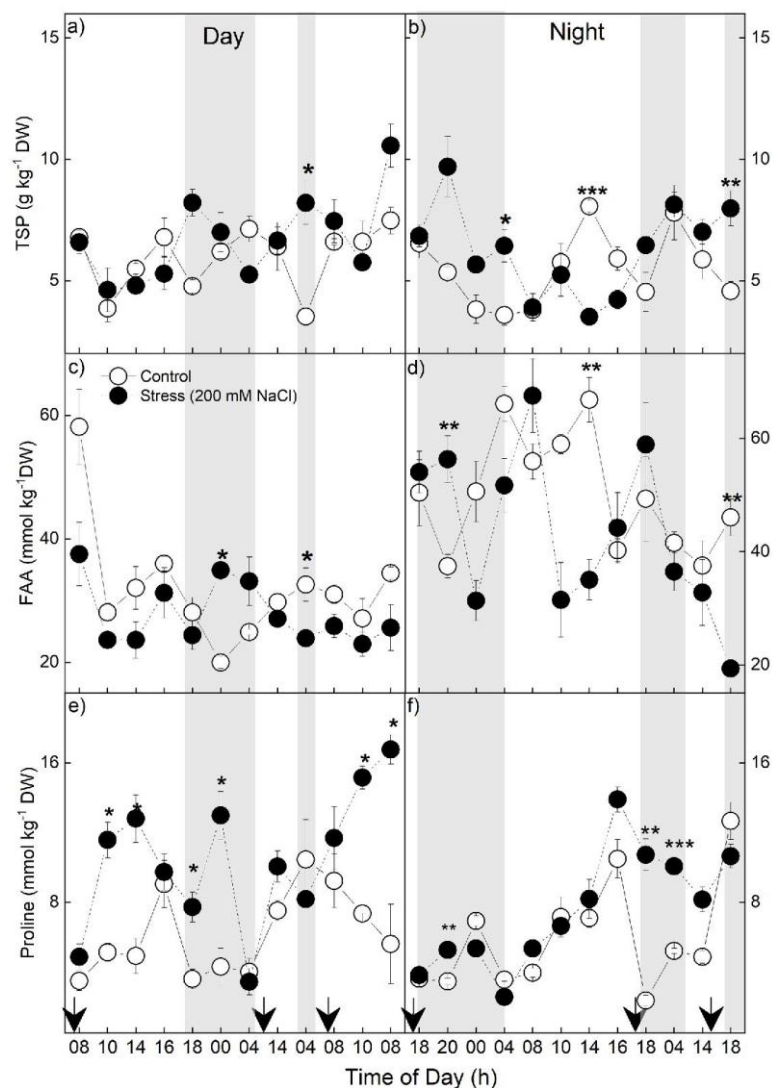


Fig. 6. (a–b) Total soluble proteins (TSP), (c–d) amino acids (FAA) and (e–f) proline in young plants of *C. pyramidalis* subjected to saline treatment (200 mM NaCl) at different times of the day (Day–8:00 and Night–17:00 h). Shaded area represents night time. Arrows indicate saline application timing ( $n = 3 \pm SE$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

(Hellmann et al., 2000). Soluble sugars and proline accumulated during stress can lead to the regulation of different aspects of metabolism, including mitigation of effects promoted by ROS (Sami et al., 2016). Indeed, leaves of stressed plants showed high content of SS and proline at times of high  $H_2O_2$  concentration in both saline treatments. However, plants that received a saline solution in the early morning behaved differently from those that received saline stress at night. Plants stressed

in sunlight always showed less of a difference in starch content compared to that of the control plants, without increasing the SS/Starch ratio, except after the third application of NaCl. Thus, the greatest accumulation of proline and  $H_2O_2$  was observed in the leaves of morning-stressed plants as compared with that of the night-stressed plants. This resulted in strong MDA production and suggested damage to the membranes induced by salinization. The increase in leaf  $H_2O_2$

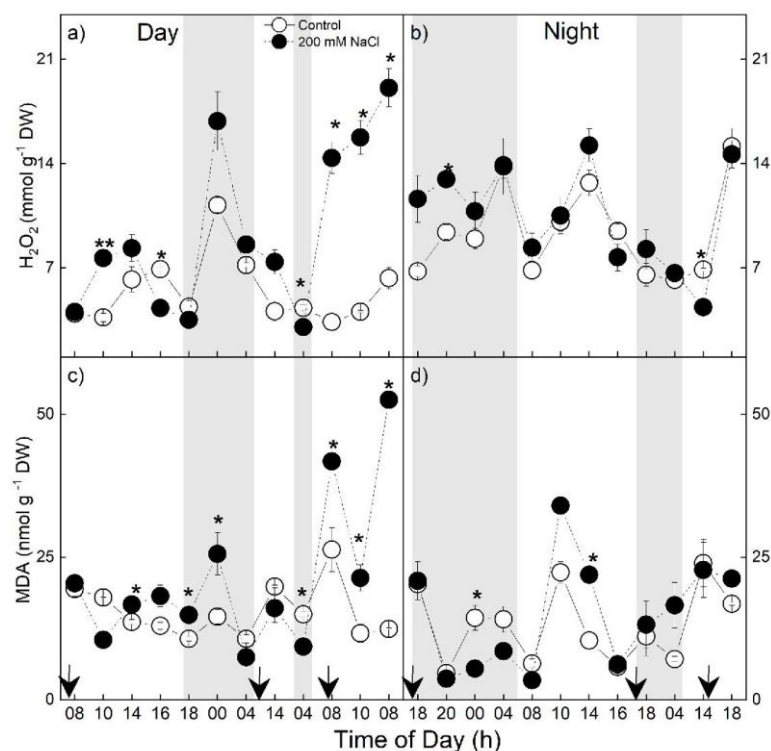


Fig. 7. (a–b) Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and (c–d) malonic dialdehyde (MDA) in young plants of *C. pyramidale* subjected to saline treatment (200 mM NaCl) at different times of the day (Day–8:00 and Night–17:00 h). Shaded area represents night time. Arrows indicate saline application timing (n = 3 ± SE). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

content could damage the membrane by producing substances involved in lipid peroxidation, resulting in MDA production (Polle and Chen, 2015; Sami et al., 2016). Such a response has been common in previous studies investigating responses to salt stress (Mittal et al., 2012; Huang et al., 2014). On the other hand, the greater H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content in morning-stressed plants may indicate other metabolic functions, as a potent inhibitor of hydraulic conductivity under saline conditions because of a reduction in the abundance of PIP aquaporins (Boursiac et al., 2008). Furthermore, ROS act as stress signaling molecules (Foyer and Noctor, 2005; Miller et al., 2010), but are also for growth (Mangano et al., 2016) and development (Mhamdi and Breusegen, 2018). Thus, high H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations should not be seen only as harmful events that must be avoided or alleviated and can be seen as prerequisites for plants to respond adequately and induce better acclimatization mechanisms (Miller et al., 2010).

Rapid reduction of CO<sub>2</sub> assimilation and increased proline levels not only provides tolerance to stress because of its role in protecting membranes, proteins, and DNA (Liang et al., 2013) but also acts as a nitrogen reserve during recovery from stress (Hare and Cress, 1997). Our results showed a natural accumulation of proline in the control plants because of the longer exposure to light, whereas it declined during the dark period. Therefore, in the salt changed foliar proline dynamics, it was maintained high during the night, and this change was observed in both

salt treatments. Thus, the ability to increase proline content, when a reduction is expected, reinforces the role of this amino acid in stress tolerance (Verbruggen and Hemmans, 2008; Miller et al., 2010).

## 5. Conclusion

The salinity treatments triggered different rapid responses in physiological traits. The treatments modified the net photosynthesis rate in the first 24 h but did not affect the leaf water status. The present study showed that the time of the day that salt stress begins changes the behavior of stressed plants. *C. pyramidale* plants, despite receiving three applications with high saline concentration, showed the ability to quickly remobilize Na<sup>+</sup> content from leaf tissue and recover K<sup>+</sup> concentration hours after the onset of saline stress. Despite new applications of saline solution, stressed plants continued to avoid the increase of Na<sup>+</sup> in leaves and maintained the K<sup>+</sup> content in the same organ, with this behavior faster in night-stressed plants than in morning-stressed plants. A previous study conducted by our group (Frosi et al., 2017) documented the tolerance of this species to salinity. In this study, one tolerance factor was elucidated, which was the ability to maintain the ionic balance in the main photosynthetic tissue. Furthermore, this study reinforced the importance of reporting the times when biological material was collected and when stress was applied.



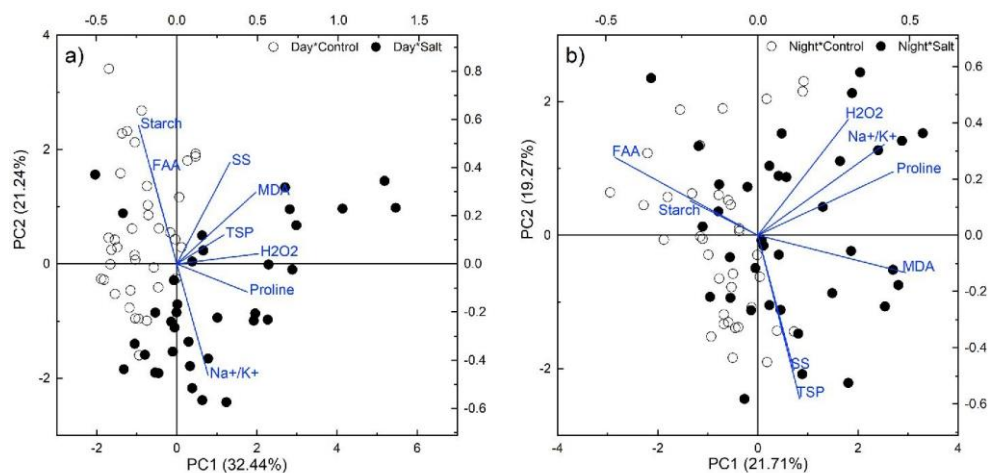


Fig. 8. Principal component analysis (PCA) based on the biochemical and nutrient parameters of *C. pyramidale* young plants subjected to saline treatment (200 mM NaCl) at different times of the day (Day–8:00 and Night–17:00).

#### Author contribution

L. Lima, G. Froisi and R. Lopes conducted the experiment and also performed the measurements. L. Lima and G. Froisi analyzed the data and wrote the first version of the manuscript. M. Santos is an advisor of L. Lima and participated in the planning of the study, data analysis and writing of the final manuscript.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgment

This work was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (APQ/PRONEM-FACEPE - 0336–2.03/14), and scholarship for L. Lima. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001. The authors thanks Soil Chemistry Laboratory from (UFRPE) for the facilities to carry out part of the chemical analysis. M.G.S. acknowledge to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the fellowship granted.

#### References

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.* 24, 1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>.
- Barrs, H.D., Weatherley, P.E., 1962. A Re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 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* 29, 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.
- Ben Ahmed, C., Magdich, S., Ben Rouina, B., Boukhris, M., Ben Abdullah, F., 2012. Saline water irrigation effects on soil salinity distribution and some physiological responses of field grown Chemlali olive. *J. Environ. Manag.* 113, 538–544. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.016>.
- Boursiac, Y., Boudet, J., Postaire, O., Liu, D.T., Tournaire-Roux, C., Maurel, C., 2008. Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen

- species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant J.* 56, 207–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2008.03594.x>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Calnak, I., Horst, W.J., Nutrition, P., 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plantarum* 83, 463–468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>.
- Campbell, G.S., Norman, J.M., 1998. *An Introduction to Environmental Biophysics*, Second. Springer-Verlag, New York. <https://doi.org/10.2134/jeq1977.00472425000600040036x>.
- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2008. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551–560. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>.
- Core, T.R., 2018. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Fan, C., Qiu, Z., Zeng, B., Li, X., Xu, S.H., 2018. Physiological adaptation and gene expression analysis of *Casuarina equisetifolia* under salt stress. *Biol. Plant. (Prague)* 62, 489–500. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0799-y>.
- Foreman, D., Gaylor, L., Evans, E., Trella, C., 1973. A modification of the Roe procedure for determination of fructose in tissues with increased specificity. *Anal. Biochem.* 56, 584–590. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90225-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90225-X).
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866–1875. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033589>.
- Froisi, G., Barros, V.A., Oliveira, M.T., Santos, M., Ramos, D.G., Maia, L.C., Santos, M.G., 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi and foliar phosphorus inorganic supply alleviate salt stress effects in physiological attributes, but only arbuscular mycorrhizal fungi increase biomass in woody species of a semiarid environment. *Tree Physiol.* 38, 25–36. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx105>.
- Gibon, Y., Pyl, E., Sulpicie, R., Lunn, J.E., Höhne, M., Günther, M., Stitt, M., 2009. Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant Cell Environ.* 32, 859–874. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01965.x>.
- Hare, P.D., Cress, W.A., 1997. *Metabolic Implications of Stress-Induced Proline Accumulation in Plants*, Plant Growth Regulation. Kluwer Academic Publishers.
- Hellmann, H., Funck, D., Reintsch, D., Frommer, W.B., 2000. Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application I. *Plant Physiol.* 123, 779–790. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.779>.
- Henderson, S.W., Wege, S., Qin, J., Blackmore, D.H., Walker, A.R., Tyerman, S.D., Walker, R.R., Gilliam, M., 2015. Grapevine and *Arabidopsis* cation-chloride cotransporters localize to the golgi and trans-golgi network and indirectly in fl uence long-distance ion transport and plant salt tolerance 1 [OPEN]. *Plant Physiol.* 169, 2215–2229. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00499>.
- Huang, C., Wei, G., Jie, Y., Wang, L., Zhou, H., Ran, C., Huang, Z., Jia, H., Anjum, S.A., 2014. Effects of concentrations of sodium chloride on photosynthesis, antioxidative



- enzymes, growth and fiber yield of hybrid ramie. *Plant Physiol. Biochem.* 76, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.12.021>.
- Hummel, I., Pantin, F., Sulpice, R., Piques, M., Rolland, G., Dauzat, M., Christophe, A., Pervent, M., Bouteillé, M., Stitt, M., Gibon, Y., Muller, B., 2010. Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme and. *Plant Physiol.* 154, 357–372. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157008>.
- Isayenkov, S.V., Maathuis, F.J.M., 2019. Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Front. Plant Sci.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>.
- Kassambara, A., Mundt, F., 2017. Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., Becker, D.F., 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants Redox Signal.* <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>.
- Liu, W., Su, J., Li, S., Lang, X., Huang, X., 2018. Non-structural carbohydrates regulated by season and species in the subtropical monsoon broad-leaved evergreen forest of Yunnan, China. *Sci. Rep.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19271-8>.
- Margano, S., Juárez, S.P.D., Estevez, J.M., 2016. ROS regulation of polar growth in plant cells. *Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1104/pp.16.00191>.
- Marrubo, S., Sengupta, D., Kumar, S., Reddy, A.R., 2017. Physiological and molecular insights into the high salinity tolerance of *Pongamia pinnata* (L.) pierre, a potential biofuel tree species. *Plant Sci.* 258, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.02.008>.
- Mhandi, A., Breusegan, F. Van, 2018. Reactive oxygen species in plant development. *Primer* 145, 1–12. <https://doi.org/10.1242/dev.164376>.
- Miller, G.A.D., Suzuki, N., Ciftci-yilmaz, S., Mittler, R.O.N., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling. *Plant Cell Environ.* 33, 453–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>.
- Mittal, S., Kumari, N., Sharma, V., 2012. Differential response of salt stress on Brassica juncea: photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiol. Biochem.* 54, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.003>.
- Moore, B.Y.S., Stein, H., 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176, 367–388.
- Mora-García, S., de Leone, M.J., Yanovsky, M., 2017. Time to grow: circadian regulation of growth and metabolism in photosynthetic organisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.copbi.2016.11.009>.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25, 239–250.
- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant.59.032607.092911>.
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375–380.
- Nemati, I., Moradi, F., Gholizadeh, S., Esmaeili, M.A., Bihanta, M.R., 2011. The effect of salinity stress on ions and soluble sugars distribution in leaves, leaf sheaths and roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Soil Environ.* 57, 26–33. <https://doi.org/10.17221/71/2010-PSE>.
- Park, H.J., Qiang, Z., Kim, W.Y., Yun, D.J., 2016. Diurnal and circadian regulation of salt tolerance in Arabidopsis. *J. Plant Biol.* 59, 569–578. <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0317-8>.
- Polle, A., Chen, S., 2015. On the salty side of life: molecular, physiological and anatomical adaptation and acclimation of trees to extreme habitats. *Plant Cell Environ.* 38, 1794–1816. <https://doi.org/10.1111/pce.12440>.
- Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., Hayat, S., 2016. Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiol. Biochem.* 109, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.005>.
- Secchi, F., Gilbert, M.E., Zwieniecki, M.A., 2011. Transcriptome response to embolism formation in stems of *Populus trichocarpa* provides insight into signaling and the biology of refilling. *Plant Physiol.* 157, 1419–1429. <https://doi.org/10.1104/pp.111.185124>.
- Silva, E.N., Ribeiro, R.V., Ferreira-Silva, S.L., Viégas, R.A., Silveira, J.A.G., 2010. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. *J. Arid Environ.* 74, 1130–1137. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2010.05.036>.
- Silva, F.C., 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. In: *Embrapa Informação Tecnológica*. Brasília, DF.
- Somogy, M., 1951. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19–23.
- Stitt, M., Gibon, Y., Lunn, J.E., Piques, M., 2007. Multilevel genomics analysis of carbon signalling during low carbon availability: coordinating the supply and utilisation of carbon in a fluctuating environment. *Funct. Plant Biol.* 34, 526–549. <https://doi.org/10.1071/FP06249>.
- Thalmann, M., Pazmino, D., Seung, D., Horrer, D., Nigro, A., Meier, T., Kölling, K., Pfeilhofer, H.W., Zeeman, S.C., Santelia, D., 2016. Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants. *Plant Cell* 28, 1860–1878. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00143>.
- Thalmann, M., Santelia, D., 2017. Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytol.* 214, 943–951. <https://doi.org/10.1111/nph.14491>.
- 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. *J. Agron. J.* 59, 240–243. <https://doi.org/10.2134/agronj1967.00021962005900030010x>.
- Tschoep, H., Gibon, Y., Carillo, P., Armengaud, P., Szerowka, M., Nunes-Neto, A., Fernie, A.R., Koehl, K., Stitt, M., 2009. Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 32, 300–318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01921.x>.
- Verbruggen, N., Hermans, C., 2008. Proline Accumulation in Plants: A Review. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>.
- Webb, A.A.R., Satake, A., 2015. Understanding circadian regulation of carbohydrate metabolism in Arabidopsis using mathematical models. *Plant Cell Physiol.* 56, 586–593. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv033>.
- Wei, Q., Ma, Q., Ning, S., Su, S., Gu, Q., 2018. Molecular characterization and functional analysis of a cation-chloride cotransporter gene from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L.). *Trees (Berl.)* 32, 165–173. <https://doi.org/10.1007/s00468-017-1621-8>.

## APÊNDICE B – MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Informações sobre as espécies da família DUFF1313 (ELF4).

Espécies	ID*	Banco de dados	Tamanho (aa)	Tipo
<i>Arabidopsis thaliana</i>	EF4L2_ARATH/AT1G72630.1/Q94BS8	UniProtKB/JGI/Pfam	119	IRTV
	EF4L3_ARATH/AT2G06255.1/Q8S8F5	UniProtKB/JGI/Pfam	109	VRRV
	EF4L1_ARATH/AT2G29950.1/O80877	UniProtKB/JGI/Pfam	125	ISQV
	ELF4_ARATH/AT2G40080.1/O04211	JGI/Pfam	111	ISKV
	EF4L4_ARATH/AT1G17455.1/Q570U6	UniProtKB/JGI/Pfam	114	IRRV
<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	A0A087SCA4_AUXPR/A0A087SCA4	UniProtKB	95	ILQI
<i>Brachypodium distachyon</i>	<u>I1H4N2_BRADI/I1H4N2</u>	UniProtKB/Pfam	116	IRRV
	<u>I1IPW5_BRADI/I1IPW5</u>	UniProtKB/Pfam	153	IARV
	<u>A0A0Q3EN91_BRADI/Bradi4g13227</u>	UniProtKB/Pfam	138	IRRV
<i>Chlorella variabilis</i>	E1Z6M4_CHLVA/E1Z6M4	UniProtKB/Pfam	127	IAAV
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.J00211.1/A0A059A9I6	JGI/Pfam	142	ISKV
	Eucgr.J00214.1/A0A059AA17	JGI/Pfam	146	ISKV
	Eucgr.J01911.1/A0A059AFC0	JGI/Pfam	156	ISKV
	Glyma.07G037300.2/I1MJZ6	JGI/Pfam	114	IRRV
	Glyma.11G229700.1/K7MPJ8	JGI/Pfam	123	ISKV
<i>Glycine max</i>	Glyma.09G067300.1/C6SWP2	JGI/Pfam	112	IRRV
	Glyma.14G193700.2/K7M812	JGI/Pfam	168	ISKV
	Glyma.15G176300.1/C6T1H5	JGI/Pfam	112	IRRV
	Glyma.16G006700.1/C6SWF7	JGI/Pfam	114	IRRV
	Glyma.17G050800.2/I1MSC4	JGI/Pfam	114	IRRV
	C6ZKH5_GOSAR/ACK56111/C6ZKH5	UniProtKB/JGI/Pfam	114	IRRV
	Gorai.009G092100.4	JGI	178	ISKV
<i>Gossypium arboreum</i>	Gorai.010G087000.1	JGI	114	IRRV
	Gorai.010G198100.1	JGI	121	IRRV
	Gorai.011G058500.1	JGI	112	ISKV
	Gorai.011G287700.1	JGI	116	IRRV
	Gorai.011G287800.1	JGI	108	ISRV
	Gorai.013G225600.1	JGI	105	ISKV
	A0A067KQ00_JATCU	UniProtKB/Pfam	134	IRRV
<i>Jatropha curcas</i>	A0A067L8C2_JATCU	UniProtKB/Pfam	114	IRRV
	Medtr2g041310.1/I3TAT7	JGI	114	IRRV
	Medtr3g070490.1/I3S8X5	JGI/Pfam	114	IRRV
<i>Medicago truncatula</i>	Medtr8g020200.1/C6ZKI2	JGI	115	IRRV
	<u>Q75K38_ORYSJ/Q75K38 (Japonica)</u>	NCBI	115	IRRV
<i>Oryza sativa subsp. japonica</i>	Phvul.001G242900.1/V7D1X3	JGI	120	IRRV
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phvul.003G132400.1/V7CB61	JGI/Pfam	130	ISKV
	Phvul.008G261200.1/V7B8K0	JGI/Pfam	108	IAKV
	Phvul.009G228400.1/V7AYP2	JGI/Pfam	149	ISKV

	Phvul.010G130900.1/V7AS50	JGI/Pfam	114	IRRV
<i>Pinus radiata</i>	C6ZKI3_PINTA	UniProtKB/Pfam	85	ISRV
	Potri.001G170100.1/B9GKV5	UniProtKB/Pfam	85	ISRV
<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.006G143800.1/B9MSX7	JGI/Pfam	110	ISK-
	Potri.008G068200.1/B9HHP4	JGI/Pfam	114	IRRV
	Potri.009G046400.1/B9HP35	JGI/Pfam	122	ISKV
	Potri.019G131700.1/B9INK1	JGI/Pfam	177	ITKV
<i>Prunus mume</i>	XP_008228208	NCBI	114	IRRV
<i>Saccharum officinarum</i>	<u>C6ZKI6_SACOF/C6ZKI6</u>	JGI/Pfam	114	IRRV
	<u>C6ZKI5_SACOF/C6ZKI5</u>	UniProtKB/Pfam	119	IRRV
	M0ZL43_SOLTU/PGSC0003DMT400003078/M0ZL43	UniProtKB/Pfam	438	IRRV
	M1A8C8_SOLTU/PGSC0003DMT400016935/M1A8C8	JGI/Pfam	119	ISKV
<i>Solanum tuberosum</i>	M1AU15_SOLTU/PGSC0003DMT400030304/M1AU15	UniProtKB/JGI/Pfam	111	ISKV
	C6ZKI5_SACOF/C6ZKI7_SOLTU	UniProtKB/JGI/Pfam	114	IRRV
	M1CZA8_SOLTU/PGSC0003DMT400078042/M1CZA8	UniProtKB/Pfam	109	IRRV
	M1DJ36_SOLTU/PGSC0003DMT400089865/M1DJ36	UniProtKB/JGI/Pfam	134	ISKV
<i>Vitis vinifera</i>	F6HXY0_VITVI/XP_002275459/F6HXY0	JGI/Pfam	114	IRRV
	<u>B6TE20_MAIZE/B6TE20</u>	UniProtKB/Pfam	128	IRRV
	<u>B6TR40_MAIZE/B6TR40</u>	UniProtKB/Pfam	129	IRRV
	<u>B7ZZS3_MAIZE/B7ZZS3</u>	UniProtKB/Pfam	143	IARV
<i>Zea mays</i>	<u>B4FX35_MAIZE/B4FX35</u>	JGI/Pfam	145	ISKV
	<u>B6SH35_MAIZE/B6SH35</u>	NCBI/Pfam/UniProtKB	114	IRRV
	<u>B6U7D2_MAIZE/B6U7D2</u>	UniProtKB/Pfam	143	IARV

**Tabela S2.** Identificação e banco de dados utilizado para construção da árvore fenética da proteína Gigantea.

<b>Espécies</b>	<b>ID*</b>	<b>Banco de dados</b>
<i>Cenostigma pyramidale</i>	Cp218010 c0_g1_i1.p1	Transcriptoma
	Cp218010 c0_g1_i2.p2	
	Cp218010 c0_g1_i4.p1	
	Cp218010 c0_g2_i1.p1	
	Cp218010 c0_g2_i2.p1	
	Cp254691 c0_g1_i1.p1	
	Cp254691 c0_g1_i3.p1	
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.F02686.1	JGI/Pfam
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GIGAN_ARATH	UniProtKB
<i>Glycine max</i>	Glyma.20G170000.1	JGI/Pfam
<i>Gossypium arboreum</i>	Gorai.005G077100.1	JGI/Pfam
<i>Linum usitatissimum</i>	Lus10028693	JGI/Pfam
<i>Medicago truncatula</i>	Medtr1g098160.1	JGI/Pfam
<i>Solanum lycopersicum</i>	PGSC0003DMP400032753	JGI/Pfam
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Phvul.007G083500.1	JGI/Pfam
<i>Prunus persica</i>	Prupe.8G040600.1	JGI/Pfam
<i>Oryza sativa</i>	Q9AWL7 GIGAN_ORYSJ	UniProtKB

**Tabela S3.** Identificação e banco de dados das proteínas utilizadas para construção das árvores fenéticas de LHY.

<b>Espécies</b>	<b>ID*</b>	<b>Banco de dados</b>
<i>Cp - Cenostigma pyramidale</i>	Cp294887 c0_g1_i2.p1	Transcriptoma
	Cp294887 c0_g1_i7.p1	
	Cp294887 c0_g1_i1.p1	
	Cp294887 c0_g1_i3.p1	
<i>At - Arabidopsis thaliana</i>	AT1G01060.1	UniProtKB
<i>Gm - Glycine max</i>	Glyma.19G260900.1.p	JGI/Pfam
<i>Gr - Gossypium arboreum</i>	Gorai.008G132000.1	JGI/Pfam
<i>Mt - Medicago truncatula</i>	Medtr7g118330.1	JGI/Pfam
<i>Sl - Solanum lycopersicum</i>	Solyc10g005080.2.1	JGI/Pfam
<i>Pv - Phaseolus vulgaris</i>	Phvul.009G259650.1.p	JGI/Pfam
<i>Pp - Prunus persica</i>	Prupe.2G200400.1.p	JGI/Pfam
<i>Os - Oryza sativa</i>	LOC_Os08g06110.2	UniProtKB
<i>Bd - Brachypodium distachyon</i>	Bradi3g16515.1.p	JGI/Pfam

**Tabela S4.** Identificação e banco de dados das proteínas utilizadas para construção das árvores fenéticas das PRRs.

<b>Identificação-Fenograma</b>	<b>Espécies</b>	<b>ID*Banco de dados</b>	<b>Banco de dados</b>
CpPRR216643 c0_g1_i1.p1		TR216643 c0_g1_i1.p1	
CpPRR216643 c0_g1_i3.p1	<i>Cenostigma pyramidale</i>	TR216643 c0_g1_i3.p1	Transcriptoma
CpPRR101947 c1_g2_i1.p1		TR101947 c1_g2_i1.p1	
VvPRR9-like	<i>Vitis vinifera</i>	F6I2Y5_VITVI	UniProtKB
AtAPRR3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LVG4 (APRR3_ARATH)	UniProtKB
AtAPRR9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8L500 (APRR9_ARATH)	UniProtKB
AtPRR5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q6LA42 (APRR5_ARATH)	UniProtKB
BdPRR73	<i>Brachypodium distachyon</i>	Bradi1g65910.1	JGI/Pfam
BrPRR5-like	<i>Brassica oleracea capitata</i>	Bol036197	JGI/Pfam
GmPRR7	<i>Glycine max</i>	Glyma.10G048100.1	JGI/Pfam
GmPRR7-like	<i>Glycine max</i>	Glyma.10G048100.2	JGI/Pfam
MtPRR3-like	<i>Medicago truncatula</i>	G7JRK3 (G7JRK3_MEDTR)	UniProtKB
MtPRR7-like	<i>Medicago truncatula</i>	Medtr1g067110.1	JGI/Pfam
OsPRR5-like	<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os11g05930.1	JGI/Pfam
PpPRR5-like	<i>Prunus persica</i>	Prupe.2G198500.1.p	JGI/Pfam
PpPRR5	<i>Prunus persica</i>	Prupe.2G318900.1.p	JGI/Pfam
PpPRR7	<i>Prunus persica</i>	Prupe.6G244200.1	JGI/Pfam
PvPRR7	<i>phaseolus vulgaris</i>	Phvul.007G162500.1	JGI/Pfam
SIPRR5-like	<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc03g081240.2.1	JGI/Pfam
ZmPRR59-like	<i>Zea mays</i>	A0A096S8S6_MAIZE	UniProtKB