

MARTHA KATHARINNE SILVA SOUZA PAULINO

FUNÇÃO DOS TRICOMAS VESICULARES NA TOLERÂNCIA À SALINIDADE  
EM *Atriplex nummularia*

**Recife – PE**  
**2020**

MARTHA KATHARINNE SILVA SOUZA PAULINO

FUNÇÃO DOS TRICOMAS VESICULARES NA TOLERÂNCIA À SALINIDADE  
EM *Atriplex nummularia*

Dissertação apresentada a Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos do Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.

**Orientador:**

Prof. Dr. Edivan Rodrigues de Souza

**Co-Orientadoras:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva

Dr<sup>a</sup>. Cintia Maria Teixeira Lins

**Recife – PE  
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

P328f Paulino, Martha Katharinne Silva Souza  
Função dos tricomas vesiculares na tolerância à salinidade em *Atriplex nummularia* / Martha Katharinne Silva Souza Paulino. - 2020.  
87 f. : il.

Orientador: Edivan Rodrigues de Souza.  
Coorientadora: Claudia Ulisses de Carvalho.  
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Recife, 2020.

1. Tricomas vesiculares. 2. Erva sal. 3. Salinidade. 4. Curva Pressão-Volume. 5. Trocas gasosas.  
I. Souza, Edivan Rodrigues de, orient. II. , Claudia Ulisses de Carvalho, coorient. III. Título

CDD 630

---

MARTHA KATHARINNE SILVA SOUZA PAULINO

FUNÇÃO DOS TRICOMAS VESICULARES NA TOLERÂNCIA À SALINIDADE  
EM *Atriplex nummularia*

Dissertação defendida e aprovada em 28 de fevereiro de 2020 pela banca examinadora:

Orientador:

---

Edivan Rodrigues de Souza, Prof. Dr.  
DEPA – UFRPE

---

Examinadores:

---

Ênio Farias de França e Silva, Prof. Dr.  
DEAGRI - UFRPE

---

Natália Maria Corte Real de Castro Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
UNIBRA

À Deus, por sempre ser força e sustento;  
Ao meu porto seguro, meus pais:  
Geilza Paulino e Edimilson Paulino;  
As minhas amadas irmãs: Martha Karolyne,  
Martha Karinne e Martha Kamylla  
pelo carinho e incondicional apoio;  
A meu noivo Filipe Cardoso por ser  
meu colo, incentivo e persistência;  
E a todos que fizeram parte deste trabalho.

**Dedico**

*"A providência divina é que mantém, que toma conta, que dirige.  
A gente aqui é somente um instrumento bem fraco nas mãos de Deus."  
(Santa Dulce dos Pobres)*

## **Agradecimentos**

À Deus minha eterna gratidão pelo sustento nos momentos difíceis e por sua providência divina sempre presente em todas as fases da minha vida.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola. A equipe docente, técnicos, estrutura e todo apoio e suporte a pesquisa desenvolvida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por tornar possível a realização desta e de tantas outras pesquisas em todo o Brasil.

A minha amada família: Geilza Silva Souza Paulino, Edimilson Paulino da Silva, Martha Karolyne, Martha Karinne e Martha Kamylla pelo apoio incondicional, por sempre acreditar e me motivar a fazer e ser melhor. A vocês dedico tudo que sei e quem eu sou hoje.

Ao meu noivo Filipe Cardoso, que me acompanhou nos momentos bons e ruins durante essa caminhada, me incentivou, deu forças e sempre me fez acreditar que era possível.

Aos meus grandes amigos e irmãos: Cintia Lins, Danilo Monteiro, Lucas Yago, Hidelblandi Farias, Hugo Bentzen e Pablo Dourado que acompanharam meu crescimento e enfrentaram de perto, comigo, toda essa trajetória. Também pelo cuidado, incentivo, dedicação e por tantos ensinamentos. Muito obrigada!

Aos presentes que o mestrado me deu: Martiliana Freire, Lais Franco, Alan Silva, Andrey Cardoso por toda força, apoio e conhecimento.

Ao meu orientador, Edivan Rodrigues de Souza, pelo incentivo, por me acompanhar todos esses anos e proporcionar a carreira acadêmica, pelo conhecimento passado, disponibilidade e dedicação.

À minha co-orientadora: Cintia Lins pela idealização da pesquisa, amizade, companhia, incentivo e por todo aprendizado durante minha trajetória acadêmica.

À minha co-orientadora: Claudia Ulisses, por todo apoio a pesquisa, disponibilidade, ensinamentos e a toda sua equipe do Laboratório de Fisiologia e Cultivo in vitro de Plantas, em especial: Prof<sup>ª</sup>. Emília Arruda, Prof. Marcus Sperandio, Natalia

Corte, Leonardo Silva, Luís Palhares, Henarmmany de Oliveira, Francisco Wellington, que me apoiaram e ajudaram incansavelmente durante essa pesquisa.

Ao grupo de pesquisa Relação Solo-Água-Planta, o qual faço parte, em especial aos alunos de Iniciação Científica: Francisco Ernesto, Juliana Molina, José George, Robson Santos, Ana Catarina, Vitor Santos, Lucas Tenório, Taciana Simas, Kauê Paulo, por todo auxílio para a realização desse trabalho.

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

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURA .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO GERAL.....</b>	<b>12</b>
<b>GENERAL ABSTRACT.....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I : REFERENCIAL TEÓRICO</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>2 HIPÓTESES.....</b>	<b>17</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>17</b>
<b>5 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
5.1 Salinização do solo .....	18
5.2 Efeito da salinidade.....	19
5.3 Mecanismos de tolerância nas plantas .....	20
5.4 Glândulas de Sal .....	22
5.5 Estresse Oxidativo .....	23
5.6 <i>Atriplex nummularia</i> .....	24
<b>6 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO II: RELAÇÕES HÍDRICAS DE <i>Atriplex nummularia</i> SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO COM REMOÇÃO PARCIAL DOS TRICOMAS VESICULARES</b>	
<b>RESUMO .....</b>	<b>32</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>33</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>34</b>
<b>2 METODOLOGIA .....</b>	<b>35</b>
2.1 Material Vegetal e Local do Experimento .....	35
2.2 Elaboração e manejo da água de irrigação.....	35
2.3 Remoção dos tricomas .....	36
2.4 Confeção de lâminas e densidade de tricomas .....	37
2.5 Potencial Hídrico ( $\Psi_w$ ).....	38
2.6 Potencial osmótico ( $\Psi_o$ ) .....	39

2.7 Potencial de Pressão ( $\Psi_p$ ) .....	39
2.8 Ajustamento Osmótico (AO) .....	39
2.9 Teor Relativo de Água (TRA) .....	40
2.10 Suculência foliar (SF) .....	40
2.11 Curva Pressão Volume.....	40
2.12 Análise de Dados .....	42
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
3.1 Remoção dos Tricomas .....	42
3.2 Teor Relativo de Água e Suculência Foliar .....	43
3.3 Potencial Hídrico .....	43
3.4 Potencial Osmótico .....	44
3.4 Potencial de pressão.....	46
3.5 Parâmetros Curva Pressão-Volume .....	46
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>CAPÍTULO III: INFLUÊNCIA DOS TRICOMAS VESICULARES NO METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO E ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE <i>Atriplex nummularia</i> SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO</b>	
<b>RESUMO .....</b>	<b>58</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>59</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
2.1 Material Vegetal e Local do Experimento .....	61
2.2 Elaboração e manejo da água de irrigação.....	61
2.3 Remoção dos tricomas .....	62
2.4 Confeção de lâminas e densidade de tricomas .....	62
2.5 Metabolismo fotossintético.....	64
2.5.1 Trocas Gasosas.....	64
2.5.2 Fluorescência da Clorofila .....	64
2.6 Metabolismo antioxidante.....	65
2.6.1 Extravasamento de eletrólitos .....	65
2.6.2 Extração para avaliação da concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e determinação de peroxidação lipídica (MDA).....	65
2.6.2.1 Conteúdo de Peróxido de Hidrogênio.....	66
2.6.2.2 Peroxidação Lipídica.....	66
2.6.3 Extração para avaliação da atividade enzimática.....	66

2.6.3.1 Atividade da Superóxido dismutase (SOD) .....	66
2.6.3.2 Ascorbato Peroxidase (APX) .....	67
2.6.3.3 Atividade da Catalase (CAT) .....	67
2.7 Análise de Dados .....	67
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
3.1 Remoção dos Tricomas .....	68
3.2 Metabolismo fotossintético .....	68
3.3 Metabolismo antioxidante .....	76
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE FIGURA

### CAPÍTULO I

---

**Figura 1** – A - Esquema do tricoma anexado a epiderme da folha de *Atriplex* (De Esaú, 1977.) e B - corte transversal de folha de *Atriplex nummularia* destacando o tricoma vesicular..... 22

### CAPÍTULO II

---

**Figura 1** – Folhas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs)..... 36

**Figura 2** – Cortes transversais de *Atriplex nummularia* submetida a escovação, destacando o mesófilo foliar (A) e nervura central (B)..... 37

**Figura 3** – Lâmina da epiderme foliar de *Atriplex nummularia* não escovada face adaxial (A) e face abaxial (B), escovada face adaxial (C) e face abaxial (D), detalhes da estrutura dos tricomas vesiculares: cabeça “Cb”, pedúnculo “Pd”, estômato “Est”..... 38

**Figura 4** – Modelo Hipotético de curva Pressão-Volume (Lins et al., 2018) ..... 41

**Figura 5** – Densidade dos tricomas vesiculares de *Atriplex nummularia* após a segunda remoção aos 25 dias de tratamento salino. Em destaque a porcentagem de remoção dos tricomas obtida com a escovação..... 42

**Figura 6** – Teor relativo de água (TRA) e Suculência Foliar (SF) de folhas de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 43

**Figura 7** - Potencial Hídrico ( $\Psi_w$ ) em ramo de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais entre potenciais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 43

**Figura 8** - Potencial Osmótico ( $\Psi_o$ ) de folhas de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais entre potenciais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 45

**Figura 9** - Potencial de Pressão ( $\Psi_p$ ) de folhas de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais entre potenciais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 46

**Figura 10** – Curva pressão Volume de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) submetidas a estresse salino de -0,1 MPa (A), -1,4 MPa (B) e -2,7 MPa (C) aos 30 dias do início do tratamento..... 47

**Figura 10** – Potencial osmótico a pleno turgor (A) e a zero turgor (B) de folhas de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 48

**Figura 12** –Módulo de elasticidade ( $\epsilon$ ) em ramo de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 51

### CAPÍTULO III

---

- Figura 1** – Ramo de *Atriplex nummularia* escovados (Es) e não escovados (NEs) e em destaque imagem da epiderme de folhas..... 62
- Figura 2** – Cortes transversais de *Atriplex nummularia* submetida a escovação, destacando o mesófilo foliar (A) e mesófilo próximo a nervura central (B)..... 63
- Figura 3** – Lâmina da epiderme foliar de *Atriplex nummularia* não escovada face adaxial (A) e face abaxial (C), escovada face adaxial (B) e face abaxial (D), detalhes da estrutura dos tricomas vesiculares: cabeça “Cb”, pedúnculo “Pd”, estômato “Est”..... 63
- Figura 4** – Aclimatação das folhas ao escuro para determinação de fluorescência da clorofila *a* com auxílio de fluorômetro portátil..... 65
- Figura 5** – Densidade dos tricomas vesiculares de *Atriplex nummularia* após a segunda remoção aos 25 dias de tratamento salino. Em destaque a porcentagem de remoção dos tricomas obtida com a escovação..... 68
- Figura 6** – A - Condutância Estomática (*g<sub>s</sub>*), B - Transpiração (*E*) e C - Assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> (*A*) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 7 e 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 69
- Figura 7** – A - Concentração interna de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*) e B - eficiência do uso da água (*EUA*) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 7 e 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 71
- Figura 8** – Fluorescência inicial (*F<sub>o</sub>*), Máxima (*F<sub>m</sub>*), Variável (*F<sub>v</sub>*) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 7 e 30 dias de estresse salino. Letras iguais, minúsculas ao longo do tempo e maiúsculas entre os potenciais, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 73
- Figura 9** –Rendimento Quântico Máximo (*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 7 e 30 dias de estresse salino. Letras iguais, minúsculas ao longo do tempo e maiúsculas entre os potenciais, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 75
- Figura 10** - Extravasamento de eletrólitos (EE) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 76
- Figura 11** – Concentração de malondialdeído (MDA) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 77
- Figura 12** – Concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 30 dias de estresse salino. Letras

iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 77

**Figura 12** – Atividade da superóxido dismutase (SOD) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 78

**Figura 13** – Atividade da catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade..... 79

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

---

**Tabela 1** – Classificação de solos afetados por sais segundo Richards, (1954)..... 18

### CAPÍTULO II

---

**Tabela 1** - Valores de potencial osmótico a máxima turgescência ( $\Psi_o^{100}$ ), o potencial osmótico a turgescência zero ( $\Psi_o^0$ ) e ajuste osmótico de plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) encontrados na metodologia de Curva P-V e osmometria..... 49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**IPA** - Instituto Agronômico de Pernambuco  
**TRA** – Teor Relativo de Água  
**SF** – Suculência Foliar  
**AO** – Ajustamento Osmótico  
**P-V** – Pressão-Volume  
**CE** – Condutividade Elétrica  
**A** – Taxa de Assimilação Líquida de CO<sub>2</sub>  
**gs** – Condutância Estomática  
**E** – Transpiração  
**EUA** – Eficiência do Uso de Água  
**VE** – Vesículas Epidérmicas  
**NEs** – Plantas não escovadas  
**Es** – Plantas escovadas  
**EE** – Extravasamento de eletrólitos  
**SOD** - Superóxido dismutase  
**APX** - Ascorbato peroxidase  
**CAT** – Catalase  
**POD** - Peroxidase  
**MDA** - Malondialdeído  
**Ψ<sub>m</sub>** – Potencial mátrico  
**Ψ<sub>o</sub>** – Potencial osmótico  
**Ψ<sub>p</sub>** – Potencial de pressão  
**Ψ<sup>100</sup>** – Potencial Osmótico a Completo Turgor  
**Ψ<sup>0</sup>** – Potencial Osmótico a Turgor Zero  
**AO<sub>total</sub>** – Ajustamento Osmótico Total  
**Ψ<sub>ne</sub><sup>100</sup>** - Potencial Osmótico Das Plantas Não Estressadas  
**Ψ<sub>e</sub><sup>100</sup>** - Potencial Osmótico Das Plantas Estressadas  
**ε** - Módulo de elasticidade  
**BMF** - Biomassa Fresca  
**BMT** - Biomassa Túrgida  
**RFA** - Radiação Fotossinteticamente Ativa  
**EROs** - Espécies Reativas De Oxigênio

PAULINO, MARTHA KATHARINNE SILVA SOUZA. MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Fevereiro de 2020 **Função dos tricomas vesiculares na tolerância a salinidade em *Atriplex nummularia*.**

Orientador: Prof. Dr. Edivan Rodrigues de Souza  
Co-orientadoras: Dr<sup>a</sup>. Cintia Maria Teixeira Lins  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva

## RESUMO GERAL

Os tricomas vesiculares desempenham um papel fundamental na exclusão de íons tóxicos em algumas espécies halófitas. Para entender melhor o papel destas estruturas na tolerância a salinidade foi realizado um experimento com plantas de *Atriplex nummularia* irrigadas com águas de três níveis de potencial osmótico (-0,1;-1,4;-2,7MPa), formulados a partir de NaCl (0; 300 e 600mmol L<sup>-1</sup>) tendo plantas com tricomas vesiculares e plantas com ausência parcial de tricomas. Adotou-se o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 3 x 2 com cinco repetições, totalizando 30 unidades experimentais. Foram realizadas avaliações fisiológicas (Potencial Hídrico -  $\Psi_w$ , Osmótico -  $\Psi_o$  e de Pressão -  $\Psi_p$ , Teor Relativo de Água, Ajustamento Osmótico, Curva Pressão-Volume - PV, Fluorescência da clorofila, Fotossíntese líquida, Condutância estomática, Transpiração e Eficiência do uso da água), Extravasamento de eletrólitos, Peroxidação lipídica e Atividade enzimática (Superóxido Dismutase, Ascorbato Peroxidase, Catalase). O experimento foi conduzido em ambiente protegido num período de 30 dias. Os resultados avaliados permitiram identificar a forte contribuição dos tricomas vesiculares nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos. Os valores de  $\Psi_o$  obtidos no osmômetro confirmaram que o vazamento dos solutos inorgânico dos tricomas através da maceração são os responsáveis pelos potenciais osmóticos mais negativos. Os parâmetros obtidos com a curva PV permitiram confirmar que escovação realizada para remoção dos tricomas conseguiu excluir solutos concentrados no espaço apoplástico e corrigiu a discrepância ocorrida entre os valores acessados por curva PV e por osmometria. A presença dos tricomas foram capazes de regular os processos estomáticos de forma que a planta mantenha seu desempenho fotossintético. Dados de fluorescência da clorofila demonstraram a integridade do componente do fotossistema (FSII) mesmo com a remoção dos tricomas e elevação da salinidade. A avaliação de extravasamento de eletrólitos, junto com o aumento do conteúdo de malondialdeído sugerem que a remoção parcial das vesículas apresenta maior probabilidade de estresse oxidativo. A atividade da APX é um dos principais mecanismos adotados pela *A. nummularia* na desintoxicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Palavras Chaves:** Erva Sal; Halófitas; Salinidade.

PAULINO, MARTHA KATHARINNE SILVA SOUZA. MSc. Federal Rural University of Pernambuco. February 2020. **Function epidermal bladder cells in tolerance to salinity in *Atriplex nummularia***

**Advisor:** Prof. Dr. Edivan Rodrigues de Souza  
**Co- Advisor:** Dr<sup>a</sup>. Cintia Maria Teixeira Lins  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva

## GENERAL ABSTRACT

Epidermal bladders play a fundamental role in the exclusion of toxic ions in some halophyte species. To better understand the role of these structures in the tolerance to salinity, an experiment was carried out with plants of *A. nummularia* irrigated with waters of three levels of osmotic potential (-0.1; -1.4; -2.7MPa), formulated from NaCl (0; 300 and 600mmol L<sup>-1</sup>), having plants with Epidermal bladders and plants partially absent from these bladders cells. A randomized block design in a 3 x 2 factorial scheme with five replications was adopted, totaling 30 experimental units. Physiological evaluations were performed (hydraulic Potential -  $\Psi_w$ , Osmotic Potential -  $\Psi_o$  and Pressure -  $\Psi_p$ , Relative Water Content, Osmotic Adjustment, Pressure-Volume Curve - PV, Liquid photosynthesis, Stomatal conductance, Sweating and Water use efficiency), Extravasation electrolyte, lipid peroxidation and enzyme activity (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, catalase). The experiment was carried out in a protected environment over a period of 30 days. The evaluated results allowed to identify the strong contribution of epidermal bladders in physiological and biochemical relationships. The  $\Psi_o$  values obtained on the osmometer confirmed that the leakage of inorganic solutes from the bladders cells through maceration are responsible for the most negative osmotic potentials. The parameters obtained with the PV curve allowed to confirm that brushing performed to remove the bladders cells managed to exclude solutes concentrated in the apoplastic space and corrected the discrepancy that occurred between the values accessed by PV curve and by osmometry. Influence of vesicular trichomes on photosynthetic and antioxidant metabolism in *Atriplex nummularia* plants subjected to salt stress. Chlorophyll fluorescence data demonstrated the integrity of the photosystem component (FSII) even with the removal of bladders cells and elevated salinity. The evaluation of electrolyte leakage, together with the increase in the content of MDA suggest that the partial removal of the vesicles presents a higher probability of oxidative stress. Among the enzyme activities evaluated, APX activity is one of the main mechanisms adopted by *Atriplex nummularia* in the detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Key words:** Salt Bush; Halophytes; Epidermal bladders.

## **CAPÍTULO I**

---

### **REFERENCIAL TEÓRICO**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A salinidade do solo é um dos principais estresses abióticos que afeta a produtividade das culturas por reduzir o crescimento e o desenvolvimento das plantas (KALAJI et al., 2016). O estresse salino afeta significadamente os processos de crescimento, e desenvolvimento devido as alterações nos processos fisiológicos e bioquímicos. Tais respostas são consequência principalmente da diminuição do potencial osmótico do solo que limita a absorção de água e nutrientes, além da presença de íons tóxicos, como sódio e cloreto (PARIHAR et al., 2015).

Algumas plantas, para sobreviverem em ambientes salinos, desenvolveram ao longo de sua evolução mecanismos de defesa, como alteração de características anatômicas à processos do metabolismo fisiológico (SILVA et al., 2018).

Dentre as plantas capazes de desenvolverem em ambientes com altas concentrações de sais, as halófitas se destacam, devido à existência de uma série de mecanismos fisiológicos, bioquímicos e anatômicos que conferem maior tolerância à salinidade (KIANI-POUYA et al., 2017).

Entre as halófitas, o gênero *Atriplex* vem sendo amplamente explorado em pesquisas devido a capacidade das plantas tolerar elevados níveis de salinidade. Plantas de *Atriplex nummularia*, por exemplo, são capazes de se desenvolver em solos com alta concentração de sais

A alta tolerância à salinidade da espécie é resultado principalmente da compartimentalização de sais no vacúolo e pela excreção em tricomas vesiculares localizados na epiderme das folhas (DE SOUZA et al., 2012).

Os tricomas vesiculares, tem uma forma esférica com um diâmetro médio de 1 mm e volume de cerca de 500 nL (ADAMS, et al. 1998). Esses tricomas apresentam diâmetro 10 vezes maior do que as células epidérmicas, conferindo a estas um volume muito maior e aumentando 1000 vezes mais a sua capacidade de sequestro de  $\text{Na}^+$  quando comparada a vacúolos celulares. Desta forma, na tolerância a salinidade, a exclusão de sódio e cloro nos tricomas vesiculares destaca-se como importante característica adaptativa das plantas e contribui na minimização de distúrbios ocasionados pelo estresse salino (BÖHM et al., 2018).

Outra característica importante das plantas halófitas é que o  $\text{Na}^+$ , em determinadas concentrações, configura-se como um elemento benéfico, uma vez que, é observado um melhor desenvolvimento de espécies na presença desse íon (BROWNELL, 1968; MELO

et al., 2016). A exemplo da *Atriplex*, na qual o crescimento e a produção de matéria seca foram estimulados em concentrações entre 150 a 300 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl (HASSINE; LUTTS, 2010; RANGANI et al, 2016 , PARVEZ et al., 2020 ).

Belkheiri ; Mulas (2013) relatam que o sódio pode, até certo ponto, substituir o K<sup>+</sup> em suas funções osmóticas no vacúolo, uma vez que as halófitas requerem menos K<sup>+</sup>, para o crescimento do que as glicófitas (MARSCHNER, 2011), indicando uma ligação entre a capacidade de substituir o K<sup>+</sup> pelo Na<sup>+</sup> e conseqüentemente proporcionar maior tolerância ao sal.

Diante disto, para elucidar o papel dos tricomas vesiculares na tolerância à salinidade em halófitas, Kiani-pouya et al. (2017) propuseram que a remoção das vesículas epidérmicas em *Chenopodium quinoa* e *Atriplex lentiformis* cultivadas com NaCl resultou em um fenótipo sensível ao sal.

Diferentes métodos foram desenvolvidos para determinação do potencial osmótico em *Atriplex nummularia*, incluindo a maceração e a Curva Pressão Volume (PV) e concluíram que a maceração do tecido foliar é o principal fator responsável por valores extremamente baixos de potencial osmótico na espécie, em função do vazamento do conteúdo inorgânico armazenado nas vesículas, demonstrando assim, que o ajustamento osmótico não é o principal mecanismo fisiológico adotado pela espécie que tolere solos salinos (LINS et al.,2018)

Portanto, essa pesquisa tem o objetivo de avaliar a influência dos tricomas vesiculares, quanto à tolerância à salinidade em *Atriplex nummularia* através de avaliações fisiológicas e bioquímicas.

## **2 HIPÓTESES**

- ❖ A compartimentalização de íons em tricomas vesiculares de plantas de *Atriplex nummularia* é um mecanismo de sobrevivência mais importante quando comparadas ao ajustamento osmótico na tolerância à salinidade.
- ❖ A ausência dos tricomas vesiculares em *Atriplex* possibilita uma maior produção de enzimas do complexo oxidativo, em consequência de menores taxas de fotossíntese e reduzidos potenciais.

## **3 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a contribuição dos tricomas vesiculares como mecanismo de tolerância à salinidade da *Atriplex nummularia* submetida a irrigação com águas salinizadas com NaCl.

## **4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 4.1** Avaliar a influência da remoção dos tricomas vesiculares em plantas *Atriplex nummularia* irrigadas com água salinizada com NaCl.
- 4.2** Verificar a contribuição dos tricomas vesiculares nos processos de relações hídricas em plantas *Atriplex nummularia* irrigadas com água salinizada com NaCl.
- 4.3** Avaliar a contribuição dos tricomas vesiculares no mecanismo de ajustamento osmótico de plantas de *Atriplex nummularia* irrigadas com água salinizada com NaCl.
- 4.4** Averiguar a dinâmica dos mecanismos fotossintético e enzimático em plantas de *Atriplex nummularia* com e sem vesículas epidérmicas, submetidas a irrigação com água salinizada com NaCl.

## 5 REVISÃO DE LITERATURA

### 5.1 Salinização do solo

A salinização do solo é um processo que afeta a produtividade de culturas, sendo resultado de fatores naturais e antrópicos (YANG et al., 2020). Hoje, prevê-se que metade das terras cultiváveis sejam atingidas pela salinidade até 2050, uma vez que a cada ano 10% das terras aráveis são afetadas por salinidade (JAMIL et al., 2011).

Sendo classificada por suas causas, o processo de salinização pode ser dividido em salinização primária e salinização secundária. A salinização primária, representada por processos naturais incluem o intemperismo do material de origem rico em sais, bem como através eventos geológicos ou formações específicas, que podem aumentar a concentração de sais nas águas subterrâneas causando a salinização do solo através efeitos capilares e evapotranspiração, ocasionando na acumulação destes sais na superfície do solo (DALIAKOPOULOS et al., 2016).

Já a salinização secundária é derivada de processos antrópicos, sendo atribuída principalmente ao manejo inadequado da irrigação como o uso de águas salobras associadas a más condições de drenagem (FAN et al., 2012).

Além dessa classificação, quanto a salinidade, os solos podem ser classificados como salino, salino-sódico, sódico ou sódico degradado observando os parâmetros (Tabela 01): potencial hidrogeniônico (pH), condutividade elétrica do extrato de saturação (CEes) e porcentagem de sódico trocável (PST) (RICHARDS, 1954).

**Tabela 1** – Classificação de solos afetados por sais segundo Richards, (1954)

Classificação do solo	CEes	pH	PST
Salino	>4 dS m <sup>-1</sup>	<8,5	<15
Sódico	<4 dS m <sup>-1</sup>	>8,5	>15
Salino-Sódico	>4 dS m <sup>-1</sup>	<8,5	>15

CEes – Condutividade elétrica do extrato de saturação; pH potencial hidrogeniônico; PST - Porcentagem de sódico trocável

Os impactos da salinização no solo acarretam diversas perdas, sobretudo na sua estrutura, sendo esta resultado da interação do sódio com as partículas do solo. Além disso, com uma salinidade moderada e quando o sódio é o íon predominante, verificam-se toxidez nas plantas, dispersão de argilas e desestruturação dos solos, tornando-os impermeáveis. Esse processo culmina em impactos significativos nas relações solo-água, levando à erosão, baixa capacidade de campo e perdas na produtividade de culturas (LEBRON; SUAREZ; YOSHIDA et al., 2002; LITALIEN; ZEEB, 2020).

## 5.2 Efeito da salinidade

A elevada concentração de sais no solo influencia diretamente o desenvolvimento das plantas através de efeitos osmóticos, efeitos específicos de toxicidade iônica e desequilíbrios nutricionais (SCUDIERO; SKAGGS; CORWIN, 2017).

A concentração de sais superior ao tolerado pela planta, afeta inicialmente o crescimento, devido a menor disponibilidade de água decorrente do efeito osmótico, e a elevada concentração de íons no fluxo transpiratório que causa injúrias nas folhas (PARIHAR et al., 2015). Desta forma, estresse salino nas plantas pode ser dividido em duas fases: fase osmótica e fase iônica, em ambas pode-se gerar distúrbios no metabolismo das plantas, incluindo efeitos deletérios em várias organelas e compartimentos celulares (FLOWERS; MUNNS; COLMER, 2014).

A fase osmótica é a resposta rápida à pressão osmótica do solo, sendo resultado da diminuição do potencial osmótico do solo afetando diretamente a absorção de água e nutrientes, reduzindo conseqüentemente a taxa de crescimento da planta (WU, 2008).

Este fenômeno é conhecido como o primeiro efeito causado pela salinidade na qual é resultado do sal fora da planta, a alta concentração salina na solução do solo reduz o crescimento das folhas e, em menor grau, o crescimento das raízes (PARIHAR et al., 2015). Isso ocorre devido as reduções de água na folha e menor potencial hídrico, desencadeando o fechamento estomático e interrompendo a fixação de carbono nas folhas, afetando diretamente no processo fotossintético (KARIMI et al., 2018).

Na segunda fase, os problemas de toxicidade surgem quando os íons presentes na água de irrigação ou no solo se acumulam excessivamente no tecido da planta causando reduções no seu rendimento, independentemente da concentração total de sais. Esta toxicidade se inicia com um desbalanceamento osmótico celular, seguido da toxidez iônica acarretando danos ao citoplasma, bem como danos visíveis (DIAS et al., 2016).

O excesso de íons no citosol, em especial o íon  $\text{Na}^+$ , desencadeia várias alterações na atividade enzimática, na estrutura funcional de proteínas, causando efeitos diretos de toxicidade. O aumento na absorção de sal, induz toxicidade iônica específica, a exemplo da alta concentração de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ou sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), que diminuem a absorção de nutrientes essenciais como fósforo (P), potássio ( $\text{K}^+$ ), nitrogênio (N) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (PARIHAR et al., 2015).

Desta forma, a salinidade pode induzir problemas sérios no transporte de água e de nutrientes minerais, acarretando “seca por salinidade” e desbalanço nutricional, especialmente na relação  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  no citosol (SILVEIRA et al., 2016).

### 5.3 Mecanismos de tolerância nas plantas

Para uma planta ser tolerante a um estresse ambiental, deve possuir caracteres que minimizem os efeitos deletérios e maximizem os efeitos vantajosos para sobreviver e completar seu ciclo de vida sob o estresse imposto. Respostas celulares à salinidade incluem ajustes dos sistemas de transporte de membrana e lipídios, modificações da arquitetura da parede celular, mudanças no ciclo celular e na divisão celular (MANSOUR; ALI, 2017).

Além disso, os mecanismos de tolerância vegetal a salinidade, podem ser relacionados principalmente ao acúmulo de solutos compatíveis, absorção seletiva de elementos, compartimentalização de íons em estruturas epidérmicas (LIANG et al., 2018), controle de transporte de sal a longa distância, compartimentalização no vacúolo, extrusão de sal da planta e priorização da manutenção de relação  $K / Na^+$  no citosol (PARIHAR et al., 2015).

O mecanismo de compartimentalização impede que os íons tóxicos absorvidos pela planta na presença de altas concentrações de sais, atinjam os processos e as funções essenciais destas (SHABALA; BOSE; HEDRICH, 2014). Esta função é mais expressiva e eficiente em plantas halófitas, tolerantes a salinidade, nas quais há compartimentalização de íons inorgânicos no vacúolo, acompanhada do acúmulo de solutos orgânicos compatíveis no citoplasma, os quais mantêm o equilíbrio osmótico entre os compartimentos celulares (FLOWERS et al., 2014).

A maior expressão da tolerância à salinidade é conferida as halófitas devido a um desempenho orquestrado de mecanismos fisiológicos, anatômicos e morfológicos (DE SOUZA et al., 2012; KIANI-POUYA et al., 2017). Dentre estes, a capacidade de secretar sal através de especializadas estruturas foliares denominadas glândulas de sal, que é uma das características morfofisiológicas mais notáveis, encontrada em grande número de espécies de diferentes famílias (FLOWERS et al., 2014).

Um tipo de glândula salina é a vesícula epidérmica, que são tricomas modificados (SHABALA; BOSE; HEDRICH, 2014). Os tricomas são amplamente conservados em todo o reino vegetal, mas são altamente divergentes em relação à morfologia e função, eles produzem, armazenam e, no caso de tricomas glandulares, secretam diversificados compostos (BARKLA et al., 2015).

Na tolerância à salinidade, o acúmulo de altas concentrações de  $Na^+$  e  $Cl^-$  nestas vesículas epidérmicas, confere uma importante característica adaptativa das plantas ao sal, evitando distúrbios de estresse salino, a exemplo de algumas espécies, cujas vesículas

de sal podem armazenar até 1 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, dentro de um grande vacúolo (BÖHM et al., 2018).

Sob condições de estresse, muitas plantas e organismos sintetizam e acumulam solutos compatíveis, que atuam como osmoprotetores (NAHAR; HASANUZZAMAN ; FUJITA, 2016). Em plantas cultivadas sob condições de salinidade é possível observar variações na concentração de alguns compostos orgânicos, tais como, carboidratos solúveis, glicina betaína, prolina, e proteínas solúveis (COELHO et al., 2016), realizando o ajuste osmótico, que segundo Karimi et al. (2018) é o processo pelo qual o potencial osmótico do citosol é reduzido pela acumulação ativa de solutos compatíveis.

Diante disto, o ajustamento osmótico é considerado um dos componentes importante dos mecanismos de tolerância ao sal nas plantas, pois exerce um aumento líquido nos osmólitos intracelulares, auxiliando na capacidade das plantas em absorver água fazendo com que as células mantenham seu turgor e metabolismo normal sob estresse osmótico (BENZARTI et al., 2014; LIANG et al., 2018).

O papel dos solutos compatíveis nas plantas é muito importante, devido a necessidade de se conservar o gradiente osmótico (MUNNS; GILLIHAM, 2015). Dentre estes solutos, destacam-se a prolina e glicina betaína, apresentando um acúmulo expressivo em plantas tolerantes à salinidade (TORRE-GONZÁLEZ et al., 2018)

Os solutos sintetizados pelas plantas como forma de ajuste osmótico, apesar de apresentarem em alta concentração no citoplasma, não causam efeitos tóxicos, permitindo a manutenção do turgor e a proteção de estruturas macromoleculares dependendo do grau do estresse (MANSOUR; ALI, 2017).

Sob condições de estresse, a prolina desempenha diversos papéis, tais como estabilização de proteínas e proteção de estruturas celulares pela eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SALINAS et al., 2013). Além disso, é verificado uma forte correlação entre o aumento dos níveis de prolina e a tolerância de culturas à salinidade, uma vez que seu acúmulo, aliado a outros solutos orgânicos neutraliza o estresse osmótico causado pela salinidade (TORRE-GONZÁLEZ et al., 2018).

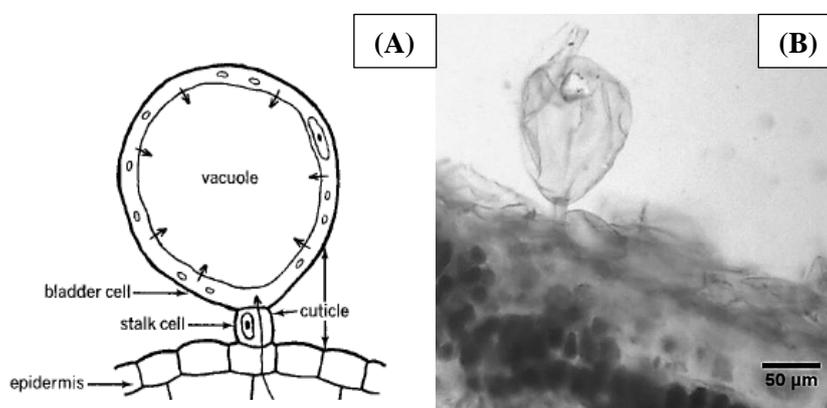
A glicina, é um dos aminoácidos quaternários derivados de ácidos, que assim como a prolina se acumula em resposta ao estresse salino e hídrico em muitos organismos diferentes, atuando no ajustamento osmótico e como osmoprotetor. Além disso, é observada em abundância nos cloroplastos, onde desempenha um papel fundamental na proteção da membrana dos tilacoides para manter a eficiência fotossintética (PARDO-DOMÈNECH et al., 2016).

Além da prolina e glicina betaína, relata-se a acumulação de outros osmólitos, como açúcares solúveis e poliálcoois como resposta ao estresse salino sob condições controladas (GIL et al. 2013).

#### 5.4 Glândulas de Sal

A secreção de íons pelas glândulas de sal é um dos mecanismos conhecido para regular o teor de sal em plantas. Estas glândulas são normalmente encontradas em halófitos e podem variar em estrutura e nos métodos de liberação de sal (EVERT, 2006).

Nas Chenopodiaceae, incluindo todas as espécies de *Atriplex*, as glândulas de sal são do tipo tricomas constituídos por de uma ou mais células-tronco (pedúnculo) e uma grande célula da bexiga, que na maturidade contém um grande vacúolo central (Figura 1) (EVERT, 2006).



**Figura 1** – A - Esquema do tricoma anexado a epiderme da folha de *Atriplex* (ESAÚ, 1977.) e B - corte transversal de folha de *Atriplex nummularia* destacando o tricoma vesicular.

As células da bexiga e caule são cobertas por uma cutícula e pelas paredes laterais a célula-tronco que tornam-se completamente cutinizadas (THOMSON; PLATT-ALOIA, 1979). Além disso, um caminho simplástico existe entre as células da bexiga e o mesofilo celular das folhas, nas quais, parte dos íons transportados no fluxo de transpiração são entregues através do protoplasto e plasmodesmata para as células da bexiga (EVERT, 2006).

A presença dessas estruturas é considerada uma adaptação a salinidade. A eliminação de sais das folhas de *Atriplex* nos vacúolos das células da bexiga epidérmica pode reduzir efetivamente a carga de sal nos tecidos de plantas que crescem em ambientes altamente salinos (BATANOUNY, 1993).

Eventualmente, a célula da bexiga entra em colapso e o sal é depositado na superfície da folha. Um gradiente positivo da concentração de sal existe a partir das células do

mesófilo para as células da bexiga, indicando que a entrega de íons no vacúolo da célula da bexiga é um processo consumidor de energia (LÜTTGE, 1971; SCHIRMER; BRECKLE, 1982; BATANOUNY, 1993).

Baumeister; Kloos (1974), investigando a espécie *Halimione portulacoides*, descobriram que a seiva secretada para a células da bexiga, sob alto nível de salinidade, apresentam uma maior concentração de íons do que na seiva do mesófilo. E Batanouny (1993) conclui que uma poderosa bomba de sal deve ser operada na célula-tronco para manter e produzir um gradiente tão alto de concentração de sal entre a bexiga e as células foliares adjacentes.

Isso destaca a importância que os tricomas vesiculares apresentam para as espécies halofitas, contribuindo para seu desenvolvimento em ambientes salinos, conferindo uma alta tolerância a salinidade as espécies que o possuem.

## 5.5 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo em plantas pode ser definido como um desequilíbrio entre os níveis de compostos antioxidantes e compostos oxidantes, que causam danos às estruturas celulares, podendo chegar até mesmo a acarretar a morte da planta (BARBOSA et al., 2014).

Esse desequilíbrio provocado afeta processos como fotossíntese, respiração, fotorrespiração e o metabolismo celular em geral (SILVEIRA et al., 2016).

Em consequência ao fechamento dos estômatos ocasionado pela salinidade, o processo de fotossíntese sofre um desbalanço ocasionado por um excesso de energia nos sistemas envolvidos, tais como captação de luz e transporte de elétrons. Assim, o processo de redução do CO<sub>2</sub> torna-se pouco eficiente, culminando com um desbalanço entre as reações luminosas e de fixação de carbono (SILVEIRA et al., 2016).

Com isto, parte da energia excedente, é fornecida a radicais livres formadores de oxigênio molecular, como o radical aniônico superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (OH<sup>-</sup>), produzindo em excesso as espécies reativas de oxigênio (EROS) (RASOULI ; KIANI-POUYA 2015).

As EROS possuem uma forte capacidade oxidativa e causam danos à membrana citoplasmática, disfunção metabólica irreversível, peroxidação de lipídios, inativação de enzimas, danos ao DNA e afetam outros componentes vitais para as células vegetais (DIAS et al. 2016). Além disso, o oxigênio reativo pode atacar resíduos de aminoácidos em proteínas para formar derivados de carbonila (LIANG et al., 2018).

Em resposta ao estresse oxidativo, as plantas desenvolveram vários mecanismos defensivos e adaptativos para sobreviver. A resposta bioquímica caracterizada pelo acúmulo de solutos também pode funcionar como estabilizador de proteínas que acompanham as enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (PARIHAR et al., 2015; KAUR; ASTHIR, 2015).

A Superóxido dismutase (SOD), é a primeira na linha de defesa do sistema enzimático antioxidante de plantas, atuando na dismutação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) nas células para formar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) eliminando sua toxicidade (LIANG et al., 2018).

Com isto, para evitar o dano oxidativo, o  $H_2O_2$  produzido é reduzido a  $H_2O$  e  $O_2$  pela peroxidase do ascorbato cloroplastica (SILVEIRA et al., 2016). A ascorbato peroxidase (APX) é uma das principais enzimas que removem o  $H_2O_2$ , sendo o cloroplasto APX o principal responsável por esta, através da reação de Miller (LIANG et al., 2018).

A catalase (CAT) é gerada durante a fotorrespiração e a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e assim como o APX é uma das principais enzimas que removem  $H_2O_2$ . A CAT difere da APX, por operar sem agente redutor, fornecendo às plantas uma forma energeticamente eficiente para remoção do  $H_2O_2$  (BARBOSA et al., 2014; LIANG et al., 2018).

Panella et al., (2016) relata em seu estudo que a atividade das enzimas antioxidantes primárias envolvidas na remoção de EROs (SOD, CAT e APX) foi significativamente estimulada nas plantas sob salinidade, tentando evitar o estresse oxidativo.

Diante disso, o envolvimento simultâneo de componentes antioxidantes é necessário para obter um aumento e /ou uma resposta mais rápida nas defesas das plantas quando as plantas enfrentam estresse, como salinidade (JALEEL et al., 2009).

## **5.6 *Atriplex nummularia***

Pertencente à família Chenopodiaceae, o gênero *Atriplex* conta com mais de 400 espécies distribuídas em regiões áridas e semiáridas do mundo. Essas regiões, apresentam uma forte tendência a salinização, devido principalmente, aos fatores climáticos, deficiência na drenagem do solo e condições geológicas dos mesmos (BONILLA et al., 2000).

Nesses ambientes, o gênero *Atriplex* é bem expressivo, uma vez que as halófitas são capazes de extrair sais do solo, a exemplo da espécie *Atriplex nummularia* que se destaca na fitoextração de sais no solo (DE SOUZA, et al., 2011; SILVA et al., 2016; MOURA et al., 2019). Também conhecida como erva-sal, a *A. nummularia* é uma espécie forrageira, de metabolismo C4, originária da Austrália e está presente no oeste da Ásia, norte da África, sul da Europa e da América, principalmente Argentina, Chile e Brasil (SALEM et al., 2010).

A erva sal é amplamente utilizada em vários tipos de sistemas de produção salina, apresentando potencial para produção de forragem para alimentação de rebanhos, produção de lenha, revegetação de áreas degradadas entre outros. Além disso, é uma espécie resistente a doenças e pragas e de fácil propagação (FAO, 1996).

Destacando-se por sobreviver em ambientes áridos e salinos, a espécie é conhecida também pelo seu potencial forrageiro rico em proteínas e carotenos, além de apresentar a propriedade de manter abundante e ativa a sua fitomassa foliar durante os períodos desfavoráveis do ano, sobretudo na época das secas (OLIVARES, 1983).

A resistência da espécie à salinidade é atribuída a diversos mecanismos de defesa, dentre eles destaca-se a presença de tricomas vesiculados que cobrem a superfície foliar, armazenando grandes quantidades de sal (SMAOUI et al. 2010). Estes tricomas desempenham um papel significativo na remoção de sal dos tecidos das folhas, impedindo assim o acúmulo de sais tóxicos no parênquima e tecidos vasculares (DE SOUZA, et al., 2012; BENZARTI et al., 2013).

Nos últimos anos, diversos trabalhos relatam o desempenho da *A. nummularia* em resposta a salinidade, tais como, respostas anatômicas (DE SOUZA, et al., 2012), fisiológicas (MELO; DE SOUZA; CUNHA, 2017; MELO et al., 2018; LINS et al., 2018). Entretanto, pouco é abordado sobre o papel das vesículas ocorrentes na espécie quanto a tolerância à salinidade.

Lins et al. (2018), relataram que o ajustamento osmótico não é o principal mecanismo fisiológico adotado pela *A. nummularia* quanto a tolerância à salinidade e destaca a importância dos tricomas vesiculares presentes na espécie.

Nesse contexto, diversos autores vem investigando e detalhando o desempenho destas estruturas epidérmicas em várias espécies de halófitas (SHABALA, BOSE, HEDRICH, 2014; BOHM et al., 2018; KIANI-POUYA et al. 2017; 2019) enfatizando a importância do estudo dos tricomas frente a salinidade e tentando elucidar os mecanismos por eles realizados para excreção de sais.

## 6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. et al. Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). **The New Phytologist**, v. 138, n. 2, p. 171-190, 1998.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BARKLA, B.; VERA-ESTRELLA, R. Single cell-type comparative metabolomics of epidermal bladder cells from the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 435, 2015.
- BATANOUNY, K. H. Adaptation of plants to saline conditions in arid regions. In: **Towards the rational use of high salinity tolerant plants**. Springer, Dordrecht, p. 387-401, 1993.
- BAUMEISTER, W.; KLOOS, G. Über die Salzsekretion bei *Halimione portulacoides*. **Flora** 163. p. 24-56, 1974
- BELKHEIRI, O.; MULAS, M. The effects of salt stress on growth, water relations and ion accumulation in two halophyte *Atriplex* species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 86, p. 17-28, 2013.
- BENZARTI, M. et al. Effect of high salinity on *Atriplex portulacoides*: Growth, leaf water relations and solute accumulation in relation with osmotic adjustment. **South African Journal of Botany**, v. 95, p. 70-77, 2014.
- BÖHM, J. et al. Understanding the molecular basis of salt sequestration in epidermal bladder cells of *Chenopodium quinoa*. **Current Biology**, v. 28, n. 19, p. 3075-3085. e7, 2018.
- BONILLA, O. H. et al *Atriplex* – Nova forrageira para solos salinizados no semi-árido nordestino. **Série documentos**. Recife: IPA, p25, 2000.
- BROWNELL, P. F. Sodium as an essential micronutrient element for some higher plants. **Plant and Soil**, v. 28, n. 1, p. 161-164, 1968.
- COELHO, J. et al. Crescimento e acúmulo de solutos orgânicos no feijão vigna submetido ao estresse salino. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, v. 13/14, p. 242-256, 2016.
- DALIAKOPOULOS, I. N. et al. The threat of soil salinity: A European scale review. **Science of the Total Environment**, v. 573, p. 727-739, 2016.
- DE SOUZA, Edivan R. et al. Fitoextração de sais pela *Atriplex nummularia* lindl. sob estresse hídrico em solo salino sódico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 5, 2011.
- DE SOUZA, E. R. et al. Biomass, anatomical changes and osmotic potential in *Atriplex nummularia* Lindl. cultivated in sodic saline soil under water stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 82, p. 20-27, 2012.

- DIAS, N. S. et al. Efeitos dos sais na planta e tolerância das culturas à salinidade (Salinity effects on plants and tolerance of crops to salinity). **Capítulo de Livro**, v.2, p. 151-162, 2016.
- ESAU, K. Anatomy of seed plants. **Soil Science**, v. 90, n. 2, p. 149, 1960.
- EVERT, R. F. **Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development**. John Wiley & Sons, 2006.
- FAN, X. et al. Soil salinity development in the yellow river delta in relation to groundwater dynamics. **Land Degradation & Development**, v. 23, n. 2, p. 175-189, 2012.
- FAO - Food and Agriculture Organization (Roma, Itália). **Espécies Vegetales para las Zonas Aridas y Semiaridas de Chile y México**. Roma, p.146, 1996.
- FLOWERS, T. J., MUNNS, R. AND COLMER, T. D. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. **Annals of Botany**, v. 115, n. 3, p. 419-431, 2014.
- GIL, R. et al. Are soluble carbohydrates ecologically relevant for salt tolerance in halophytes?. **Functional Plant Biology**, v. 40, p. 805-818, 2013.
- HASSINE, A. B; LUTTS, S. Differential responses of saltbush *Atriplex halimus* L. exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 17, p. 1448-1456, 2010.
- JALEEL, C. A. et al. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **Int. J. Agric. Biol**, v. 11, n. 1, p. 100-105, 2009.
- JAMIL, A. et al. Gene expression profiling of plants under salt stress. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 5, p. 435-458, 2011.
- KALAJI, H. M. et al. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta physiologiae plantarum**, v. 38, n. 4, p. 102, 2016.
- KARIMI, S. et al. Inducing drought tolerance in greenhouse grown *Juglans regia* by imposing controlled salt stress: The role of osmotic adjustment. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 181-192, 2018.
- KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 4, p. 609-619, 2015.
- KIANI-POUYA, A. et al. A large-scale screening of quinoa accessions reveals an important role of epidermal bladder cells and stomatal patterning in salinity tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 168, p. 103885, 2019.
- KIANI-POUYA, A. et al. Epidermal bladder cells confer salinity stress tolerance in the halophyte quinoa and *Atriplex* species. **Plant, cell & environment**, v. 40, n. 9, p. 1900-1915, 2017.

LEBRON, I.; SUAREZ, D.L.; YOSHIDA, T. Gypsum effect on the aggregate size and geometry of three sodic soils under reclamation. **Soil Science Society of America Journal**, v.66, p.92-98, 2002.

LIANG, W. et al. Plant salt-tolerance mechanism: A review. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 286-291, 2018.

LINS, C. M. T. et al. Pressure-volume (PV) curves in *Atriplex nummularia* Lindl. for evaluation of osmotic adjustment and water status under saline conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 124, p. 155-159, 2018.

LITALIEN, A; ZEEB, B. Curing the earth: A review of anthropogenic soil salinization and plant-based strategies for sustainable mitigation. **Science of The Total Environment**, p. 134235, 2020.

LUTTGE, Ulrich. Structure and function of plant glands. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 22, n. 1, p. 23-44, 1971.

MANSOUR, M.; ALI, E. Glycinebetaine in saline conditions: an assessment of the current state of knowledge. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 2, p. 56, 2017.

MARSCHNER, Horst. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic press, 2011.

MELO, H. F. de et al. Growth, biomass production and ions accumulation in *Atriplex nummularia* Lindl grown under abiotic stress. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 2, p. 144-151, 2016.

MELO, H. F. de; DE SOUZA, E. R. de; CUNHA, J.C. Fluorescence of chlorophyll a and photosynthetic pigments in *Atriplex nummularia* under abiotic stresses. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 4, p. 232-237, 2017.

MELO, H. F. et al. Water potential in soil and *Atriplex nummularia* (phytoremediator halophyte) under drought and salt stresses. **International journal of phytoremediation**, v. 20, n. 3, p. 249-255, 2018.

MOURA, E. S. R. et al. Phytoextraction of salts by *Atriplex Nummularia* Lindl. irrigated with reject brine under varying water availability. **International journal of phytoremediation**, v. 21, n. 9, p. 892-898, 2019.

MUNNS, R.; GILLIHAM, M.. Salinity tolerance of crops—what is the cost?. **New phytologist**, v. 208, n. 3, p. 668-673, 2015.

NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M. Roles of osmolytes in plant adaptation to drought and salinity. In: **Osmolytes and plants acclimation to changing environment: Emerging omics technologies**. Springer, New Delhi, p. 37-68. 2016.

NORMAN, H. C. et al. Sheep production, plant growth and nutritive value of a saltbush-based pasture system subject to rotational grazing or set stocking. **Small Ruminant Research**, v. 91, n. 1, p. 103-109, 2010.

OLIVARES, A. Los arbustos del género *Atriplex* y su importancia como especies forrajeras. In: **Actas del encuentro del estado de las investigaciones sobre manejo**

**silvopastoral en Chile.** Proyecto CONAF/PNUD/FAO. Talca, Universidad de Talca, Dpt°. Ing. Florestal. P. 5-13, 1983.

PARDO-DOMÈNECH, L. L. et al. Proline and glycine betaine accumulation in two succulent halophytes under natural and experimental conditions. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 150, n. 5, p. 904-915, 2016.

PARIHAR, P. et al. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4056-4075, 2015.

PARVEZ, S. et al. Effect of salinity on physiological, biochemical and photostabilizing attributes of two genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) exposed to arsenic stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 187, p. 109814, 2020.

RANGANI, J. et al. Coordinated changes in antioxidative enzymes protect the photosynthetic machinery from salinity induced oxidative damage and confer salt tolerance in an extreme halophyte *Salvadora persica* L. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 50, 2016.

RASOULI, F.; KIANI-POUYA, A. Photosynthesis capacity and enzymatic defense system as bioindicators of salt tolerance in triticale genotypes. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 214, p. 34-43, 2015.

RICHARDS, L.A. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Washington, D.C.: United States Salinity Laboratory, **United States Department of Agriculture - Handbook**, V.60, p.160, 1954

SALEM, H. Ben et al. Potential use of oldman saltbush (*Atriplex nummularia* Lindl.) in sheep and goat feeding. **Small Ruminant Research**, v. 91, n. 1, p. 13-28, 2010.

SALINAS, R. et al. Proline, Betaine, and Choline Responses to Different Phosphorus Levels in Green Bean. **Communications in soil science and plant analysis**, v. 44, n. 1-4, p. 465-472, 2013.

SCHIRMER, U.; BRECKLE, S. W. The role of bladders for salt removal in some Chenopodiaceae (mainly *Atriplex* species). In: **Contributions to the ecology of halophytes**. Springer, Dordrecht, 1982. p. 215-231.

SCUDIERO, E.; SKAGGS, T. H.; CORWIN, D. L. Simplifying field-scale assessment of spatiotemporal changes of soil salinity. **Science of the Total Environment**, v. 587, p. 273-281, 2017.

SHABALA, Sergey; BOSE, Jayakumar; HEDRICH, Rainer. Salt bladders: do they matter?. **Trends in plant science**, v. 19, n. 11, p. 687-691, 2014.

SILVA, Y. et al. *Atriplex nummularia* Lindl. as alternative for improving salt-affected soils conditions in semiarid environments: a field experiment. **Chilean journal of agricultural research**, v. 76, n. 3, p. 343-348, 2016.

SILVA, J. R. I. et al. Estresse salino como desafio para produção de plantas forrageiras. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural**

**Science/Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 11, n. 3, 2018.

SILVEIRA, Joaquim AG et al. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas (Biomolecular mechanisms involved with resistance to salt stress in plants). **Capítulo de Livro**, v. 2, p. 161-18, 2016.

SMAOUI, A. et al. Localization of potential ion transport pathways in vesicular trichome cells of *Atriplex halimus* L. **Protoplasma**, v. 248, n. 2, p. 363-372, 2011.

THOMSON, W. W.; PLATT-ALOIA, K. Ultrastructural transitions associated with the development of the bladder cells of the trichomes of *Atriplex*. **Cytobios**, v. 25, n. 98, p. 105-114, 1979.

TORRE-GONZÁLEZ, A. et al. Influence of the proline metabolism and glycine betaine on tolerance to salt stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) commercial genotypes. **Journal of plant physiology**, v. 231, p. 329-336, 2018.

WU, L. et al. Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. **Plant physiology**, v. 148, n. 4, p. 1953-1963, 2008.

YANG, J. et al. Soil salinization in the oasis areas of downstream inland rivers—Case Study: Minqin oasis. **Quaternary International**, 2020.

## CAPÍTULO II

---

RELAÇÕES HÍDRICAS DE *Atriplex nummularia* SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO COM REMOÇÃO PARCIAL DOS TRICOMAS VESICULARES

PAULINO, MARTHA KATHARINNE SILVA SOUZA. MSce. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Fevereiro de 2020. **Relações hídricas de *Atriplex nummularia* submetidas a estresse salino com remoção parcial dos tricomas vesiculares.**

Orientador: Prof. Dr. Edivan Rodrigues de Souza  
Co-orientadoras: Dr<sup>a</sup>. Cintia Maria Teixeira Lins  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva

## RESUMO

A sobrevivência de algumas plantas em ambiente salino se dá a partir de adaptações morfoanatômicas, como os tricomas vesiculares, que se destacam por conseguir armazenar íons tóxicos, impedindo que os processos e funções essenciais das plantas sejam alterados. O status hídrico das plantas frente ao estresse salino é um parâmetro de fundamental importância, pois através deste pode-se avaliar o desenvolvimento e a tolerância à salinidade das culturas. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar a influência dos tricomas de *Atriplex nummularia* submetidas a diferentes níveis de potencial osmótico: (-0,1; -1,4 e -2,7 MPa) formulados a partir de NaCl (0; 300 e 600mmol L<sup>-1</sup>), tendo plantas com tricomas vesiculares e plantas parcialmente ausentes desses tricomas. Foi adotado o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 3 x 2 com cinco repetições, totalizando 30 unidades experimentais. Avaliou-se o teor relativo de água (TRA), suculência foliar (SF), potencial hídrico ( $\Psi_w$ ), osmótico ( $\Psi_o$ ) e de pressão ( $\Psi_p$ ), ajustamento osmótico e parâmetros da curva pressão volume – Curva PV. Os resultados obtidos demonstraram que a remoção parcial dos tricomas não foi sensível as variáveis de TRA, SF e  $\Psi_w$ . Os valores de  $\Psi_o$  obtidos por osmometria confirmaram que o vazamento dos solutos inorgânicos dos tricomas através da maceração são os responsáveis pelos valores de  $\Psi_o$  mais negativos da *A. nummularia*. Os parâmetros obtidos com a curva pressão volume permitiram confirmar a influência dos tricomas nas relações hídricas das plantas de *A. nummularia*, observando que escovação realizada para remover parcialmente as vesículas conseguiu excluir solutos concentrados no espaço apoplástico, mantendo a concentração de íons no interior da célula e corrigindo a discrepância ocorrida entre os valores acessados por curva PV e por osmometria, além disso, o aumento no  $\epsilon$  das plantas de *A. nummularia* com incremento da salinidade e presença dos tricomas é resultado de uma rigidez da parede celular que auxilia na manutenção do turgor das plantas.

**Palavras chave:** Status hídrico, halofitas, Salinidade.

PAULINO, MARTHA KATHARINNE SILVA SOUZA. MSc. Federal Rural University of Pernambuco. February 2020. ***Atriplex nummularia* water relations under to saline stress with partial removal of epidermal bladder.**

**Advisor:** Prof. Dr. Edivan Rodrigues de Souza

**Co- Advisor:** Dr<sup>a</sup>. Cintia Maria Teixeira Lins

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva

## **ABSTRACT**

The survival of some plants in a saline environment occurs through adaptations developed by them over time, such as epidermal bladders, which stand out for being able to store toxic ions, preventing the essential processes and functions of plants from being altered. The water status of plants in the face of salt stress are parameters of fundamental importance, because through these it is possible to evaluate the development and tolerance to the salinity of the crops. Thus, this study aimed to evaluate the influence of *Atriplex nummularia* bladders cells submitted to different levels of osmotic potential: (-0.1; -1.4 and -2.7 MPa) formulated from NaCl (0; 300 and 600mmol L<sup>-1</sup>), having plants with Epidermal bladders and plants partially absent from these bladders cells. A randomized block design in a 3 x 2 factorial scheme with five replications was adopted, totaling 30 experimental units. The relative water content (TRA), leaf succulence (SF), hydric potential ( $\Psi_w$ ), osmotic ( $\Psi_o$ ) and pressure ( $\Psi_p$ ), osmotic adjustment and parameters of the pressure-volume curve were evaluated. With the partial removal of bladders cells from the leaf epidermis of the plant, it was possible to observe significant differences in the analyzed variables. The results obtained demonstrated that the partial removal of the bladders cells was not sensitive to the values of TRA, SF,  $\Psi_w$  and  $\Psi_p$ . The  $\Psi_o$  values obtained in the osmometer confirmed that the leakage of inorganic solutes from the bladders cells through maceration are responsible for the most negative osmotic potentials of *A. nummularia*. The parameters obtained with the pressure-volume curve allowed to confirm the influence of vesicles on hydric relations of *Atriplex nummularia* plants, noting that brushing performed to eliminate vesicles managed to exclude solutes concentrated in the apoplastic space, maintaining the concentration of ions inside the cell and correcting the discrepancy between the values accessed by PV curve and by osmometry, besides, the increase in  $\epsilon$  of *A. nummularia* plants with an increase in salinity and the presence of vesicles is the result of a rigidity of the cell wall that helps maintain the plant's turgor.

**Keywords:** water status, halophytes, epidermal bladders.

## 1 INTRODUÇÃO

A salinidade é um desafio global que afeta diretamente a produtividade de culturas. Prevê-se que metade das terras hoje cultiváveis sejam atingidas pela salinidade até 2050, uma vez que, a cada ano 10% das terras aráveis são afetadas pela salinidade por razões naturais e antropogênicas (JAMIL et al., 2012).

Os efeitos diretos provocados pela salinidade, ou seja, pela alta concentração de sais solúveis afetam o crescimento e a produtividade das plantas causada pelo do estresse osmótico e toxicidade iônica (MINHAS et al, 2020).

Algumas plantas desenvolveram mecanismos bioquímicos, fisiológicos, anatômicos e moleculares para lidar com o estresse, auxiliando o processo de tolerância à salinidade (KIANI-POUYA et al., 2017). Dentre estas, a espécie *Atriplex nummularia* destaca-se pela sua capacidade de se desenvolver em ambientes de alta salinidade devido a capacidade de compartimentalização de íons no vacúolo e pela excreção de sais através de tricomas vesiculares localizados na epiderme das folhas (DE SOUZA et al., 2012).

As relações hídricas são processos de fundamental importância na avaliação da tolerância das plantas a salinidade, uma vez que a manutenção estável do status hídrico das plantas é essencial para sua sobrevivência em condições salinas (PAN et al., 2016). Variáveis como potencial hídrico e teor relativo de água têm sido utilizados como ferramentas de avaliação de status hídrico e tolerância das culturas às condições de seca e estresse salino em regiões semiáridas (MELO, et al., 2018).

Outra variável fundamental, é o ajuste osmótico, que é o processo pelo qual o potencial osmótico do citosol é reduzido pelo acúmulo ativo de solutos compatíveis dentro da célula (KARIMI et al., 2018). Esta estratégia é utilizada por algumas plantas como forma de sobrevivência ao estresse salino, ao passo que cria-se um gradiente de potencial hídrico permitindo a absorção e manutenção do turgor celular (TURNER, 2018).

Diferentes métodos vem sendo investigados para determinar o potencial osmótico em *A. nummularia*, incluindo a maceração e a curva pressão-volume (PV) e concluíram que a maceração do tecido foliar é o principal fator responsável por valores extremamente baixos de potencial osmótico na espécie, em função do vazamento do conteúdo inorgânico armazenado nas vesículas, demonstrando assim, que o ajustamento osmótico não é o principal mecanismo fisiológico adotado pela espécie na tolerância a salinidade (LINS et al., 2018)

Desta forma, através da remoção dos tricomas vesiculares de plantas de *A. nummularia*, o presente estudo objetivou avaliar a contribuição dessas estruturas anatômicas na manutenção do status hídrico e tolerância da espécie frente ao estresse salino.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Material Vegetal e Local do Experimento**

Mudas de *Atriplex nummularia* provenientes do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) foram cultivadas em ambiente protegido em vasos de 60dm<sup>3</sup> para formação de matrizes por um período de sete meses.

A partir destas, novas mudas foram propagadas por estaquia, utilizando uma única matriz, com objetivo de minimizar a variabilidade genética. As mudas foram inicialmente cultivadas em sacos de polietileno com capacidade de 0,5dm<sup>3</sup>, contendo areia lavada como substrato e irrigadas diariamente com solução nutritiva de Hoagland, Arnon (1950) a ½ de força iônica.

Aos 60 dias após a confecção das mudas, estando estas completamente enraizadas e aclimatadas, realizou-se o transplante, para vasos de polietileno com capacidade de 5 dm<sup>3</sup> com areia lavada, nos quais permaneceram por mais 60 dias até o início da imposição dos tratamentos salinos.

O experimento foi conduzido em ambiente protegido do Departamento de Agronomia, situado no campus sede da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizado em Recife-PE (8°04'03'' de latitude sul, 34°55'00'' de longitude oeste e altitude de 4 m).

### **2.2 Elaboração e manejo da água de irrigação**

As soluções de irrigação foram feitas com solução nutritiva de Hoagland, Arnon (1950) correspondente ao potencial osmótico de -0,1MPa e solução nutritiva suplementada com NaCl (300 e 600mmol L<sup>-1</sup>), correspondente aos potenciais osmóticos -1,4 e -2,7 MPa, obtidos através da leitura de osmolalidade, com auxílio do osmômetro de pressão de vapor e calculados a partir da equação de Van't Hoff (Equação 1). Além disso, para garantir a manutenção do potencial osmótico proposto no sistema foram realizadas uma vez por semana coletas e verificação da osmolalidade da solução drenada.

$$\Psi_o = - RTC \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

R= Constante geral dos gases ( $0,00831 \text{ kg MPa mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

T= Temperatura em Kelvin (K)

C= Concentração do soluto ( $\text{mol kg}^{-1}$ )

Com o objetivo de evitar choque osmótico, o estabelecimento dos tratamentos foi realizado gradativamente, em incrementos diários de solução nutritiva de Hoagland, Arnon (1950) suplementada com 25 e 50 mmol NaCl até atingir as concentrações propostas em 12 dias. Além disso, foram irrigadas plantas com solução nutritiva e ausência de NaCl que foram adotadas como controle. A irrigação foi realizada diariamente ao final da tarde, com volume suficiente para haver drenagem e manutenção dos potenciais propostos no sistema.

### 2.3 Remoção dos tricomas

No início e aos 25 dias de tratamento, parte das plantas irrigadas tiveram parte de seus tricomas vesiculares das faces (abaxial e adaxial) de todas as folhas, removido de forma cautelosa usando um pincel macio.

Com isto, dois tipos de tratamentos foram realizados nas plantas (Figura 1): no primeiro as plantas permaneceram intactas, ou seja, os tricomas vesiculares não foram removidos através da escovação com pincel (abreviadas como Não Escovadas - NEs). Já no segundo tratamento, as plantas foram submetidas a escovação com pincel um dia antes do início e aos 25 dias de tratamento salino (abreviado como Escovadas - Es).

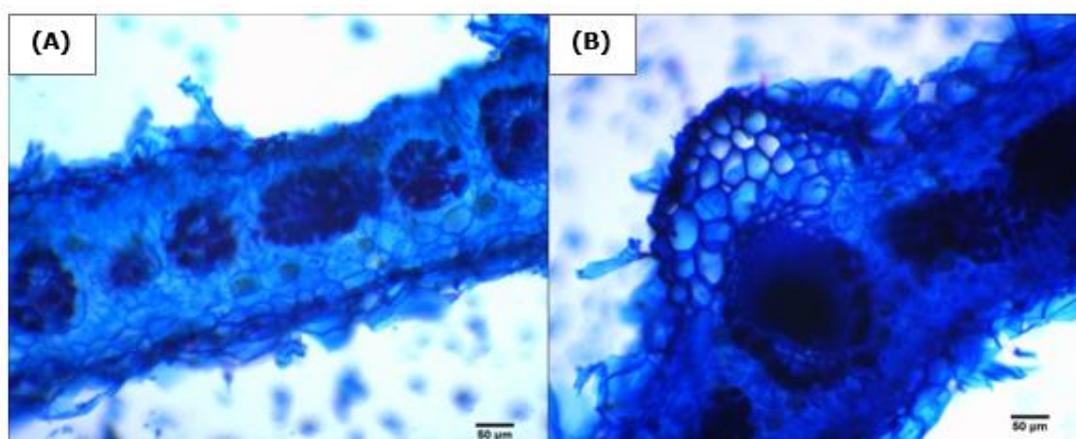


**Figura 1** – Folhas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs)

## 2.4 Confeção de lâminas e densidade de tricomas

Para garantir que o procedimento utilizado para a remoção dos tricomas vesiculares não tenha causado nenhum dano a epiderme, a mesma foi analisada através da confecção de cortes anatômicos.

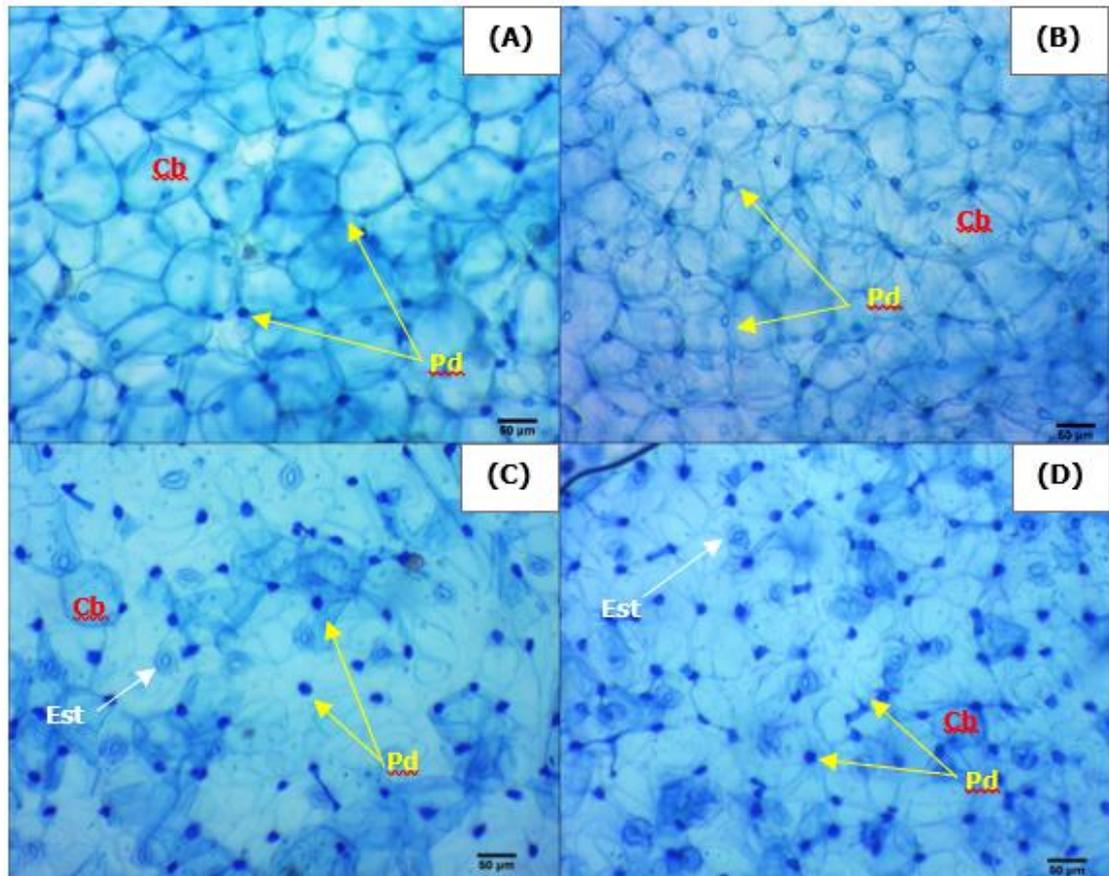
Foram confeccionadas lâminas semipermanentes contendo cortes transversais de folhas de *A. nummularia* realizados à mão livre. Os cortes foram descoloridos com hipoclorito de sódio, corados com azul de metileno (1%) e fixados nas lâminas com glicerina (50%) para observação da integridade do mesófilo após a escovação (Figura 2).



**Figura 2** – Cortes transversais de *Atriplex nummularia* submetida a escovação, destacando o mesófilo foliar (A) e nervura central (B).

Para observação da epiderme foi realizada a dissociação epidérmica das folhas de *A. nummularia* da região do ápice, terço médio e base com hipoclorito de sódio a 60%, em seguida coradas com azul de metileno (1%) e fixadas nas lâminas com glicerina (50%).

As lâminas foram observadas através de microscópio fotônico acoplado a uma câmera para a captura de imagens, para contabilizar a densidade de tricomas em cada tratamento com auxílio do programa Image J (Figura 3)



**Figura 3** – Lâmina da epiderme foliar de *Atriplex nummularia* não escovada face adaxial (A) e face abaxial (B), escovada face adaxial (C) e face abaxial (D), detalhes da estrutura dos tricomas vesiculares: cabeça “Cb”, pedúnculo “Pd”, estômato “Est”.

## 2.5 Potencial Hídrico ( $\Psi_w$ )

A determinação do potencial hídrico foliar foi realizada nas primeiras horas da madrugada, entre as 1h e 3h aos 30 dias de aplicação dos tratamentos salinos completamente estabilizados. Ramos do terço médio de cada planta foram selecionados e levados a câmara de pressão de Scholander (SCHOLANDER et al., 1965), onde as determinações foram realizadas. Para a leitura foi realizado um corte em bisel com auxílio de uma lâmina cortante, para restabelecimento do equilíbrio hídrico do ramo e facilitar a visualização da extrusão da seiva, com auxílio de uma lupa. Após este procedimento o ramo foi posicionado na câmara e submetido a uma pressão de fluxo constante até visualização da primeira gota na superfície do corte, anotando-se, neste momento, o valor da pressão exercida.

## 2.6 Potencial osmótico ( $\Psi_o$ )

A determinação da osmolalidade total do tecido foliar foi realizada com as folhas do ramo escolhido para determinação do potencial hídrico. Após maceração em nitrogênio líquido, a seiva obtida foi filtrada em tecido musseline e centrifugada a 10.000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi separado e uma alíquota de 10  $\mu$ L foi utilizada para a determinação da osmolalidade do tecido com osmômetro de pressão de vapor.

Os valores obtidos em  $\text{mmol kg}^{-1}$  foram convertidos em potencial osmótico, por meio da equação de Van't Hoff (Equação 1).

## 2.7 Potencial de Pressão ( $\Psi_p$ )

A estimativa do potencial de pressão foi feita a partir dos valores obtidos nas determinações de potencial hídrico e potencial osmótico. Admitindo-se que o potencial hídrico é igual ao somatório do potencial osmótico e de pressão (Equação 2) possibilitando calcular o potencial de pressão a partir da equação 2.

$$\Psi_w = \Psi_o + \Psi_p \quad \text{Equação (2)}$$

## 2.8 Ajustamento Osmótico (AO)

Para realização da análise do ajustamento osmótico foram selecionados ramos das plantas de cada tratamento, nas quais, foram coletadas as folhas, acondicionadas e transportadas para o laboratório de Física do Solo localizado no Departamento de Agronomia do Campus SEDE da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde foram submetidas a saturação ao escuro por um período de 24h para atingirem pleno turgor.

Passado esse tempo, o excesso de água na folha foi cuidadosamente retirado com o auxílio de papel toalha e após esse processo a folha foi macerada em nitrogênio líquido e a seiva extraída foi filtrada e centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 4°C. Por fim, foi realizada a leitura da osmolalidade em osmômetro por pressão de vapor com uma alíquota de 10 $\mu$ L do sobrenadante derivado da centrifugação.

As leituras obtidas no osmômetro por pressão de vapor são dadas em  $\text{mmol kg}^{-1}$  e convertidos em MPa partir da equação de Van't Hoff, conforme Equação 1. O ajustamento osmótico foi estimado a partir da equação 4 (BLUM, 1989).

$$AO_{total} = \Psi_{ne}^{100} - \Psi_e^{100} \quad \text{Equação (4)}$$

Em que,  $AO_{total}$  é o ajustamento osmótico total,  $\Psi_{ne}^{100}$  é o potencial osmótico das plantas que não foram submetidas ao estresse salino a pleno turgor e  $\Psi_e^{100}$  o potencial osmótico das plantas submetidas ao estresse salino a pleno turgor.

## 2.9 Teor Relativo de Água (TRA)

A determinação do teor relativo de água foi realizada em folhas coletadas em ramos próximos aos utilizados para determinação do potencial hídrico. Cinco discos foliares de 8,16 mm de diâmetro foram retirados das folhas coletadas e pesados em balança analítica obtendo-se a biomassa fresca (BMF) em grama.

Após à pesagem os discos foram postos para saturar por 24h até atingir pleno turgor. Os discos completamente saturados foram pesados obtendo-se o peso da biomassa túrgida (BMT). O peso de biomassa seca (BMS) foi obtido após secagem dos discos a 80°C em estufa de circulação forçada de ar por 48h. A determinação do TRA foi feita conforme proposto por Silveira et al. (2003) e calculado a partir da Equação (5).

$$TRA(\%) = \frac{BMF - BMS}{BMT - BMS} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

## 2.10 Suculência foliar (SF)

Os valores de suculência foliar foram obtidos a partir dos dados do teor relativo de água utilizando a relação entre massa fresca, seca e área dos discos foliares, representada pela equação abaixo (Equação 6), propostas por Delf (1912).

$$SF = \frac{(BMF - BMS)}{A} \quad \text{Equação (6)}$$

Em que:

SF = Suculência Foliar ( $g\ cm^{-2}$ )

A – Área dos discos foliares ( $cm^2$ )

## 2.11 Curva Pressão Volume

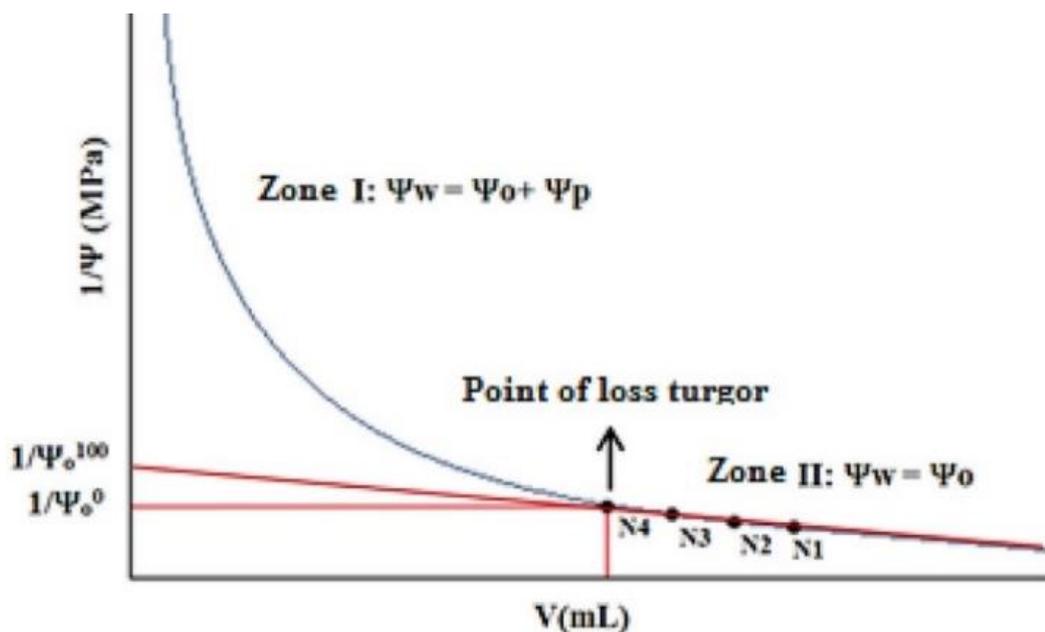
A metodologia adotada para confecção da Curva foi realizada através das técnicas utilizadas por Fanjul; Barradas (1987) e adaptadas por Lins et al. (2018). Para construção das curvas Pressão-Volume foram selecionados ramos opostos aos coletados para determinação do potencial hídrico foliar. Os ramos selecionados foram completamente submersos em água deionizada e cortados com auxílio de uma tesoura, ainda submerso o

ramo foi inserido numa proveta, na qual o exerceo de água foi retirado de modo que apenas a parte do corte estivesse submerso. Os ramos ficaram sob saturação por 24h a temperatura ambiente.

Após atingir a plena saturação foi realizado um corte em bisel na extremidade do ramo para restabelecimento do equilíbrio hidrostático. Posteriormente o ramo foi posicionado na câmara de Scholander e submetido a incrementos de pressão com fluxo de 100 kPa por minuto. A seiva liberada em cada pressão foi coletada com auxílio de um papel filtro previamente pesado. Os aumentos de pressão continuaram até a ruptura das células pecíolo. O volume de seiva coletado e a pressão correspondente foram anotados para construção das curvas Pressão-Volume, conforme modelo apresentado na Figura 4.

Assim, a partir da construção das curvas Pressão-Volume foi possível estimar o potencial osmótico a pleno turgor ( $\Psi_o^{100}$ ) a partir do prolongamento da região linear da curva ao eixo Y, o potencial osmótico a zero turgor ( $\Psi_o^0$ ) sendo estimado projetando o ponto de inflexão da curva no eixo Y, teor relativo de água no ponto de perda de turgor ( $TRA_0$ ) projetando o ponto de inflexão da curva no eixo X, o conteúdo de água apoplástica (CAA) prolongando da região linear da curva ao eixo X e o módulo de elasticidade ( $\epsilon$ ) estimado através da equação 7 (Patakas e Noitsakis, 1999).

$$\epsilon = \frac{(\Psi_o^{100} - \Psi_o^0)(1 - CAA)}{(1 - TRA_0)} \quad \text{Equação (7)}$$



**Figura 4** – Modelo Hipotético de curva Pressão-Volume (Lins et al., 2018).

## 2.12 Análise de Dados

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, e analisado em esquema fatorial (3x2) relativo a três níveis de potencial osmótico (-0,1; -1,4 e -2,7 MPa) e plantas com tricomas vesiculares (não escovadas - NEs) e plantas com remoção parcial dos tricomas vesiculares (escovadas - Es). Cada tratamento com cinco repetições totalizando 30 unidades experimentais.

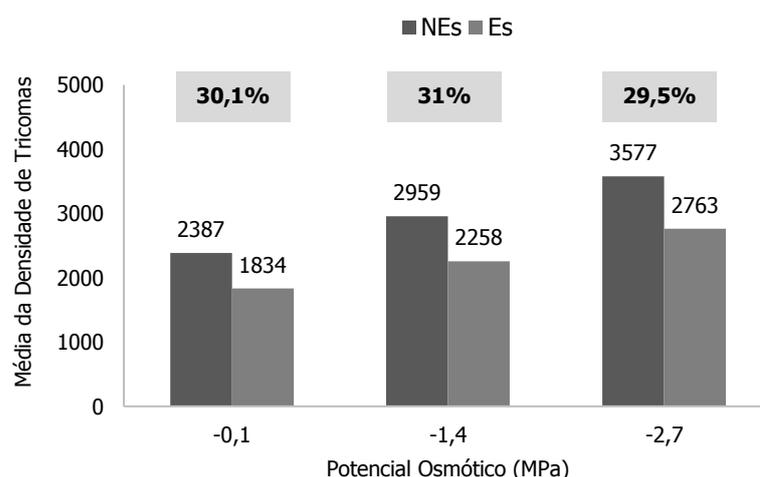
Os dados foram tabulados, submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparação de média por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Remoção dos Tricomas

Foi verificado, mediante testes, que a metodologia utilizada para a remoção completa dos tricomas vesiculares resultou na morte das plantas, divergindo assim do apresentado por Kiani-Pouya et al. (2017), que utilizou metodologia semelhante com as halófitas *quinoa* e *Atriplex lentiformis* e ambas não sofreram danos fisiológicos ou bioquímicos.

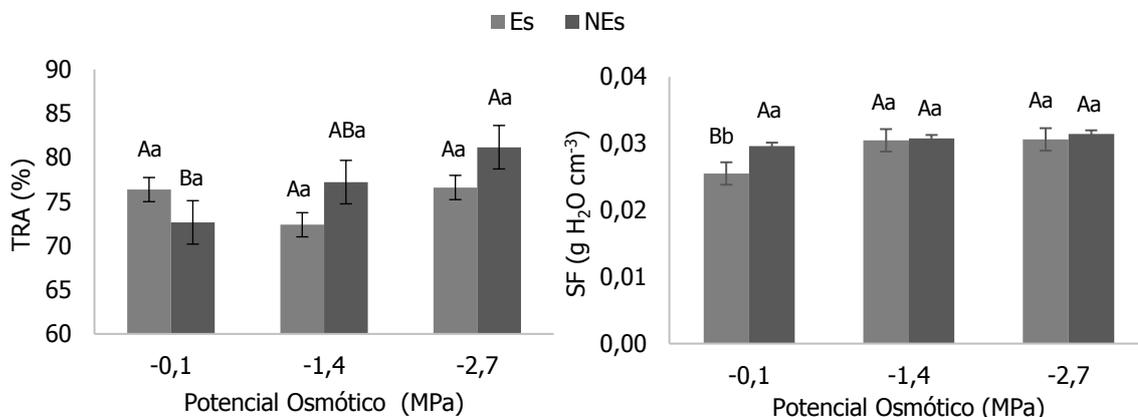
Diante disso, procedeu-se o experimento realizando a remoção parcial dos tricomas. A partir da técnica utilizada e a contabilização dos tricomas existentes após a escovação, foi possível observar uma redução cerca de 30 % dos tricomas em relação as plantas não escovadas (Figura 5).



**Figura 5** – Densidade dos tricomas vesiculares de *Atriplex nummularia* após a segunda remoção aos 25 dias de tratamento salino. Em destaque a porcentagem de remoção dos tricomas obtida com a escovação.

### 3.2 Teor Relativo de Água e Suculência Foliar

O teor relativo de água e a suculência foliar de *Atriplex nummularia* submetidas ao estresse salino apresentaram uma pequena redução nos valores das plantas submetidas a escovação (Figura 6).



**Figura 6** – Teor relativo de água (TRA) e Suculência Foliar (SF) de folhas de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Com a imposição dos tratamentos salinos, nas soluções de potenciais osmóticos mais negativos, os valores de TRA aumentaram cerca de 4% em relação ao controle para as plantas não escovadas e de potenciais osmóticos das soluções de -1,4 e -2,7MPa apresentando valores de TRA de 74,80 e 78,89% respectivamente.

Já a suculência foliar em relação as plantas controle Es, apresentou um aumento de 16% quando cultivada em solução de potencial mais negativo (-1,4 e -2,7MPa).

Estes resultados indicam que estas plantas não foram afetadas com o incremento das soluções osmóticas, confirmando a alta capacidade de retenção de água da *A. nummularia* em ambiente salino, dados semelhantes são apresentados por Araújo et al. (2006) e Belkheiri e Mulas (2013) pesquisando a mesma espécie.

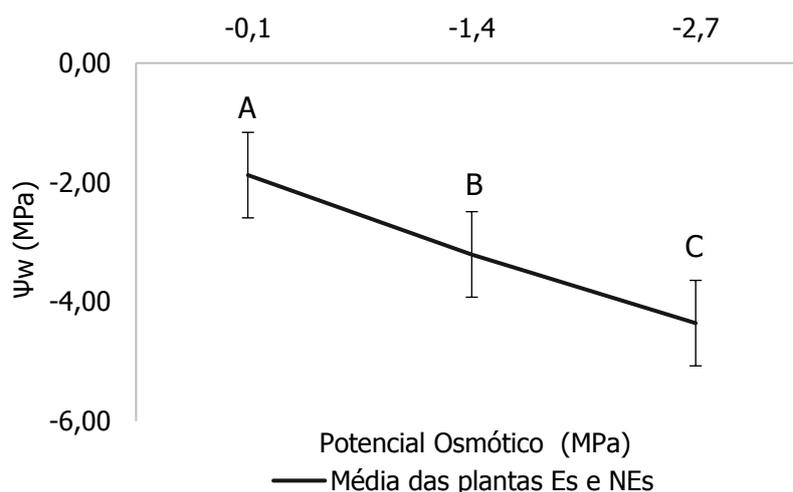
O aumento nos valores da suculência foliar e no teor relativo de água induzido pelo NaCl supõe um efetivo ajustamento osmótico em plantas cultivada sob salinidade (DA SILVA et al., 2010; PAN, ET AL., 2016). Além disso, a manutenção de altos valores do teor relativo de água faz com que as plantas se tornem menos vulneráveis ao estresse osmótico e iônico causado pela salinidade (ARAÚJO et al., 2006).

### 3.3 Potencial Hídrico

A remoção parcial dos tricomas vesiculares não influenciaram no potencial hídrico, uma vez que não diferiram estatisticamente entre si. Entretanto, a irrigação com soluções de potenciais osmóticos mais negativos influenciou fortemente nesta variável,

apresentando menor energia livre da água disponível em relação as plantas controle, atingindo valores de -3,20 e -4,36MPa para as soluções de -1,4 e -2,7MPa respectivamente (Figura 7).

Kiani-Pouya et al. (2017), mostra em seu trabalho que as halófitas estudadas, cuja vesículas foram removidas, tornaram-se fenótipos sensíveis ao sal. Assim, os resultados de  $\Psi_w$ , TRA e SF da presente pesquisa demonstra que a variável apresentada não foi sensível a remoção parcial dos tricomas.



**Figura 7** - Potencial Hídrico ( $\Psi_w$ ) em ramo de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais entre potenciais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O potencial hídrico das plantas está diretamente relacionado ao primeiro efeito causado pelo estresse salino, o efeito osmótico, causado principalmente pela alta concentração de sais no solo. Potenciais hídricos mais baixos com aumento da concentração de NaCl na água de irrigação também foram observados por Hassine e Lutts (2010) e Melo et al. (2018) investigando *Atriplex halimus* e *A. nummularia* respectivamente.

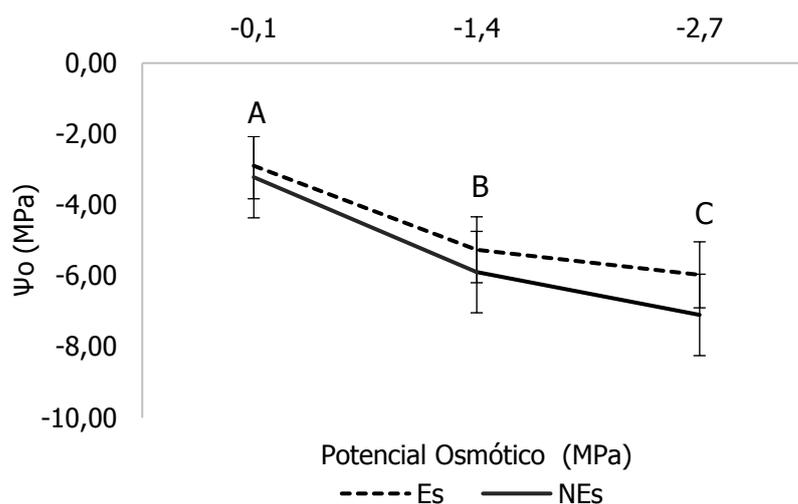
Em halófitas, potenciais hídricos mais negativo na planta, mesmo após reduções na transpiração e reidratação completa, pode ser resultado da presença de solutos orgânicos e inorgânicos (DONOVAN; LINTON E RICHARDS, 2001). Assim, a capacidade das plantas de *A. nummularia* em ajustar osmoticamente auxilia na manutenção da pressão do turgor celular e um gradiente favorável de absorção de água (LINS et al, 2018).

### 3.4 Potencial Osmótico

A remoção parcial dos tricomas vesiculares influenciaram significativamente no potencial osmótico das plantas de *A. nummularia* sob tratamentos salinos, nos quais as

plantas com os tricomas proporcionaram, valores de potencial osmótico mais negativos (Figura 8). Esta diferença foi mais expressiva principalmente para solução de irrigação de -2,7MPa, com variação de 2MPa entre as plantas escovadas e não escovadas.

Além disso, a irrigação com soluções de maiores concentração de sais (-1,4 e -2,7 MPa) apresentaram potenciais osmóticos mais negativos, apresentando uma diminuição de -2 e -4MPa dos potenciais das plantas controle diferindo estatisticamente entre si, conforme apresentado na figura 8.



**Figura 8** - Potencial Osmótico ( $\Psi_o$ ) de folhas de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais entre potenciais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

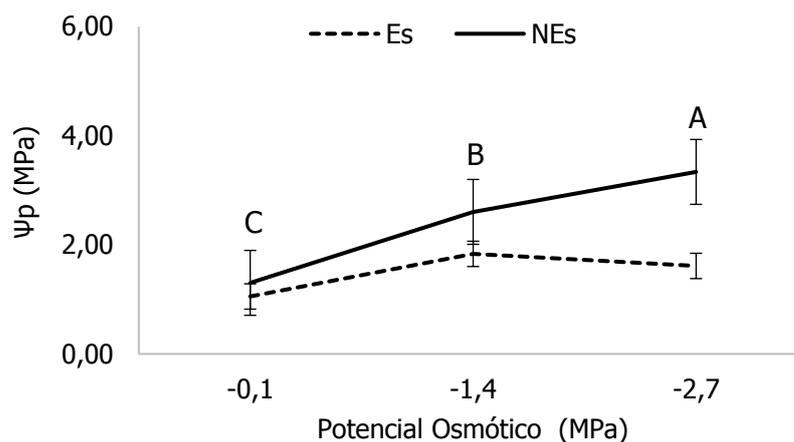
Potenciais osmótico mais negativos nas plantas resulta em uma maior capacidade de ajuste osmótico, o que facilita a captação de água e, portanto, pode manter o turgor nas plantas em condições de baixo potencial de água (PAN et al., 2016). Além disso, a maior absorção dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  resultam na redução do potencial osmótico foliar das plantas submetidas à salinidade (SILVEIRA et al., 2009).

Os valores mais baixos de potencial osmótico das plantas NEs quando comparadas as Es induzem que a remoção parcial dos tricomas vesiculares diminuiu a capacidade da planta de ajustar-se osmoticamente. Estes dados confirmam Lins et al. (2018) ao relatar que vazamento do conteúdo inorgânico armazenado nos tricomas através da maceração do tecido foliar é o principal responsável pelos baixos valores de potencial osmótico nas espécies.

Sustentando ainda a hipótese de que a maceração do tecido foliar não é recomendada em plantas com tricomas vesiculares, e que o vazamento dos solutos leva a erros de estimativa do ajuste osmótico (LINS et al., 2018).

### 3.4 Potencial de pressão

Assim como o potencial osmótico, o potencial de pressão apresentou interferência significativa na remoção parcial dos tricomas vesiculares exibindo valores mais baixo para as plantas escovadas. Já em relação ao estresse salino, as plantas irrigadas com solução de potenciais osmóticos mais negativos sofreram apenas influência para as plantas não escovadas, apresentando um aumento de 1 e 2MPa em relação ao controle das plantas irrigadas com solução de -1,4 e -2,7MPa respectivamente (Figura 9).



**Figura 9** - Potencial de Pressão ( $\Psi_p$ ) de folhas de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais entre potenciais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

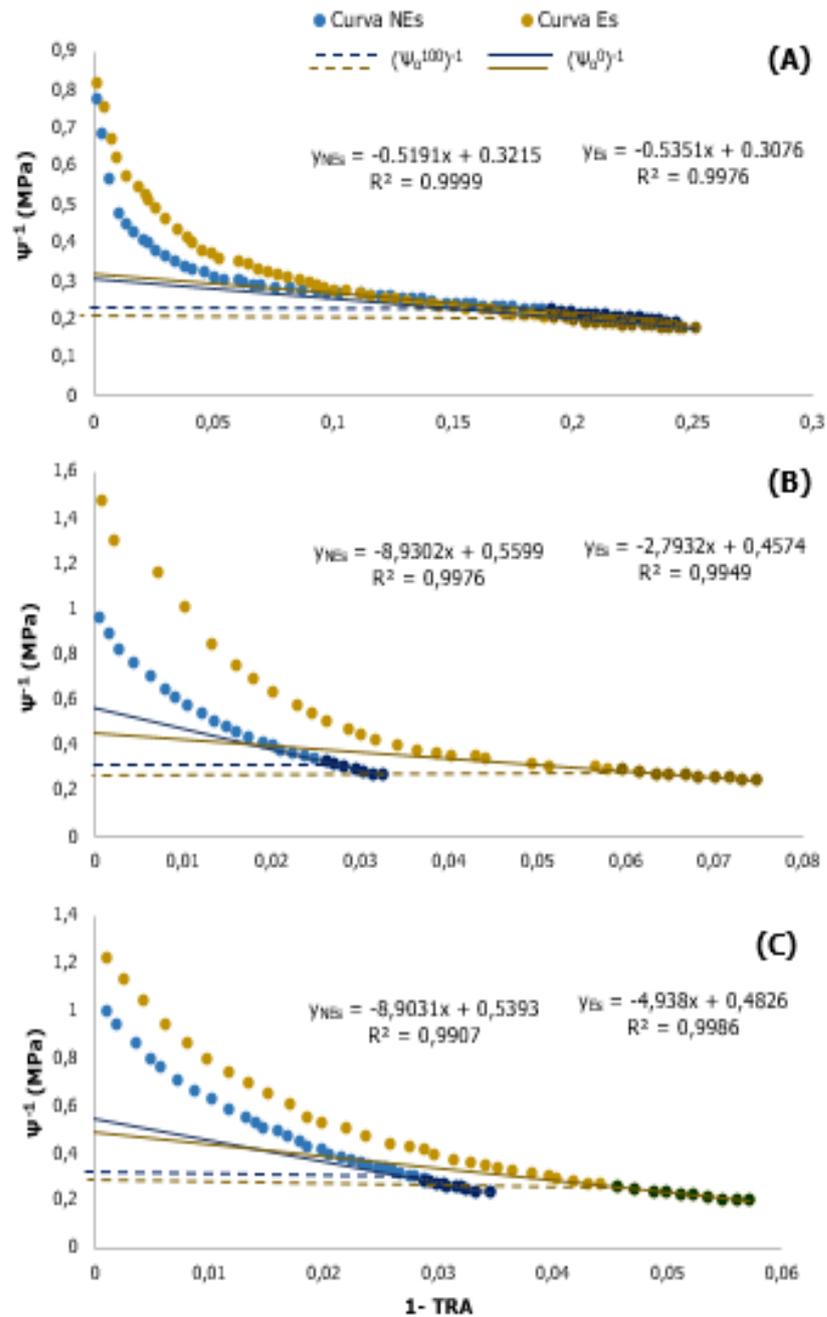
O potencial de pressão também conhecido como potencial de turgor é uma importante variável nas relações hídricas, pois indica a capacidade de turgidez das células vegetais, influenciando diretamente na absorção de água.

Maiores valores de potencial de turgor nas células indicam uma maior capacidade de expansão celular, o que vai auxiliar diretamente na eficiência do balanço hídrico nas plantas e conseqüentemente um melhor desenvolvimento das espécies frente ao estresse (HUSSIN; GEISLER; KOYRO, 2013; BLUM, 2017)

Desta forma, é perceptível a influência dos tricomas na manutenção do turgor nas plantas, uma vez que as plantas não escovadas apresentaram uma tendência crescente com o incremento salino, observando o oposto para as plantas com remoção parcial dos tricomas.

### 3.5 Parâmetros Curva Pressão-Volume

Através da construção e análise da Curva P-V (Figura 10) foi possível avaliar parâmetros hídricos dentre os quais se destacam o potencial osmótico a pleno turgor ( $\Psi_o^{100}$ ), o potencial osmótico na perda de turgor ( $\Psi_o^0$ ), e o módulo de elasticidade ( $\epsilon$ ).



**Figura 10** – Curva pressão Volume de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) submetidas a estresse salino de -0,1 MPa (A), -1,4 MPa (B) e -2,7 MPa (C) aos 30 dias do início do tratamento.

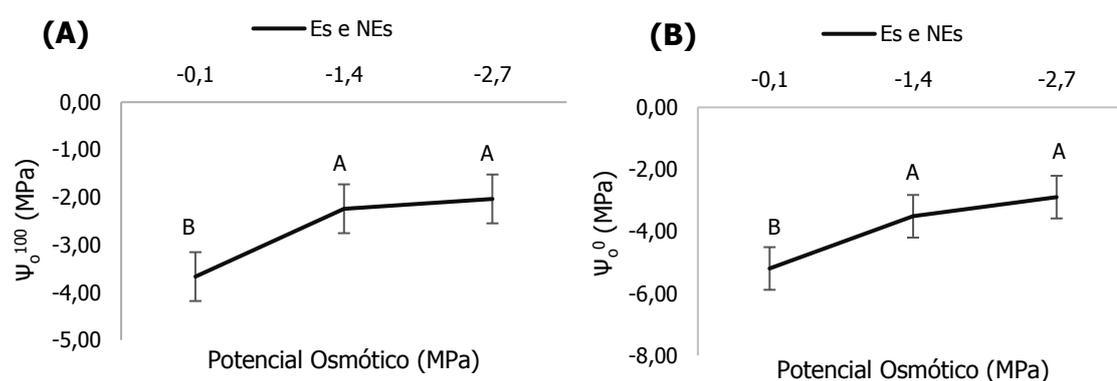
De maneira geral, nenhum dos potenciais osmóticos obtidos através da Curva P-V foram influenciados pela remoção parcial dos tricomas vesiculares, não diferindo estatisticamente entre si.

Esta resposta confirma que a metodologia adotada revela respostas hídricas apenas do interior das células das plantas submetidas ao estresse salino sem a influência das estruturas de excreção de sais. Uma vez que a Curva P-V acessa o potencial osmótico

pela a pressão de equilíbrio que corresponde ao potencial osmótico da seiva intracelular (TYREE; HAMMEL, 1972).

Desta forma, a exclusão ou manutenção dos tricomas pode afetar a concentração de solutos no exterior das células, mas não afeta os componentes do potencial osmótico no interior da folha.

O  $\Psi_o^{100}$  e  $\Psi_o^0$ , nas plantas de *A. nummularia* irrigadas com solução salina apresentaram maiores potenciais osmóticos com o aumento da concentração de NaCl na água de irrigação variando cerca de -2,0 MPa entre a as plantas controle e a de maior concentração de NaCl (Figura 11).



**Figura 11** – Potencial osmótico a pleno turgor (A) e a zero turgor (B) de folhas de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A diminuição do  $\Psi_o^{100}$  e  $\Psi_o^0$  com o incremento de NaCl, também foi observado por Touchette et al. (2009) no estudo da *Juncus roemerianus*, atribuindo essa redução ao menor teor de água no tecido durante o estresse salino, principalmente nas plantas controle, reduzindo assim seu potencial osmótico.

No presente estudo, acredita-se que os valores de potencial osmótico a pleno turgor mais negativo para as plantas controle, sejam uma resposta intracelular das plantas estudadas, uma vez que estas não estavam sob estresse e não necessitaram ativar seus mecanismos de defesa. Uma vez que, o mecanismo de exclusão de íons do citosol é iniciado quando atinge a concentração de aproximadamente 100mmol, para evitar a inibição de importantes enzimas (MUNNS; SHARP, 1993).

Assim, na ausência de alta salinidade, as plantas permanecem sem estresse e os mecanismos de compartimentalização de sais não são ativados, fazendo com que a solução simplástica esteja com uma concentração maior de solutos e solução apoplástica menos concentrada.

Esta hipótese é confirmada quando comparamos os valores do  $\Psi_o^{100}$  da Curva P-V que foram em média 85% menores que o  $\Psi_o^{100}$  acessados pela conversão dos valores de concentração de solutos da seiva pela equação de Van't Hoff em folhas escovadas e 68% menores em folhas não escovadas (Tabela 1), onde as leituras feitas em osmômetro convertidas pela equação de Van't Hoff sofrem a influência da diluição da água apoplástica.

Marur (1999) relata que os valores mais negativos do  $\Psi_o^{100}$  em algodão é uma consequência da acumulação líquida de solutos no simplasto.

Além disso, Arndt; Irawan; Sanders, (2015) afirmam que as leituras de potencial osmótico pelo método osmômetro são mais propensos a erros, especialmente pela diluição apoplástica de água e/ou a reidratação excessiva durante a preparação da amostra.

Desta forma, durante a maceração das folhas para a obtenção da seiva, a fração apoplástica se misturou a fração simplástica do tecido vegetal causando sua diluição de modo que o potencial osmótico acessado por osmometria foi maior que o acessado por Curvas P-V.

**Tabela 1** - Valores de potencial osmótico a máxima turgescência ( $\Psi_o^{100}$ ), o potencial osmótico a turgescência zero ( $\Psi_o^0$ ) e ajuste osmótico (AO) de plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) encontrados na metodologia de Curva P-V e osmometria.

Tratamento	$\Psi_o^0$ (MPa) (Curva P-V)	$\Psi_o^{100}$ (MPa) (Curva P-V)	$\Psi_o^{100}$ (MPa) (Osmometria)	AO (Curva P-V)	AO (Osmometria)
-0,1 MPa Es	-5.00 Ba	-3.84 Ba	-0.57 Aa	-	-
-1,4 MPa Es	-3.59 Aa	-2.36 Aa	-2.09 Ba	-1,48	1,52
-2,7 MPa Es	-3.35 Aa	-1.87 Aa	-2.40 Ba	-1,97	1,83
-0,1 MPa NEs	-4.94 Ba	-3.50 Ba	-1.12 Aa	-	-
-1,4 MPa NEs	-3.43 Aa	-2.12 Aa	-2.24 Ba	-1,38	1,12
-2,7 MPa NEs	-2.44 Aa	-1.62 Aa	-2.80 Ba	-1,88	1,68

Médias seguidas de letras iguais nas colunas, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 0,05 de probabilidade.

As plantas irrigadas com potencial de -1,4MPa, quando comparadas entre metodologias, indicaram uma similaridade nos valores encontrados sugerindo que a *A.nummularia* iniciou seu processo de compartimentalização dos sais nos tricomas vesiculares, de modo que o excesso de sais que se acumulariam no interior das células das folhas foi compartimentalizado nestas estruturas.

O menor  $\Psi_o^{100}$  na seiva de folhas, acessado por osmometria, nas plantas NEs em relação as Es, indica que a maior concentração de solutos encontram-se nas

vesículas, e essa tendência decrescente é confirmada no tratamento com maior concentração de sais.

Esse comportamento também é observado quando avalia-se o  $\Psi_o^{100}$  na metodologia da curva, no qual percebe-se um aumento do potencial osmótico nas plantas NEs em relação as Es, indicando a diminuição da concentração de solutos no interior da célula.

Para De Souza et al., (2012), o mecanismo de compartimentação dos sais nos vacúolos celulares e células especializadas, é o que confere a *A. nummularia* sua alta tolerância a salinidade.

No tratamento com maior concentração de sais, os valores de  $\Psi_o^{100}$  acessados por Curvas P-V se aproximaram do valor obtido por osmometria em plantas escovadas e aumentaram cerca de 73% em relação as plantas não escovadas. Desta forma, com o tratamento salino a solução apoplástica na *Atriplex* passa a ter um efeito concentrado, pois a parte dos solutos que se concentrariam no interior da célula, mas foram excluídos para os tricomas aumentando a concentração no espaço apoplástico.

Assim, essa resposta sugere que a escovação realizada conseguiu excluir solutos concentrados no espaço apoplástico, mantendo a concentração de íons no interior da célula, corrigindo a discrepância ocorrida entre os valores acessados por Curva P-V e por osmometria.

Por outro lado, isso mostra que o potencial osmótico das folhas de *Atriplex* não reduzem com o aumento da concentração de sais, confirmando a principal indagação feita por Lins et al. (2018) a qual põe em dúvida se o principal mecanismo de tolerância ao estresse salino é o ajustamento osmótico.

Este comportamento fica evidente quando compara-se os valores de AO nas duas metodologias, nas quais pode ser verificado que não ocorre ajuste quando utiliza-se os valores da Curva P-V para a estimativa do AO.

Estas respostas ainda evidenciam as afirmações de Kiani-Pouya et al. (2017) e Lins et al. (2018) quando destacam a importância dos tricomas na tolerância de espécies de halófitas em outros mecanismos que não a exclusão de sais.

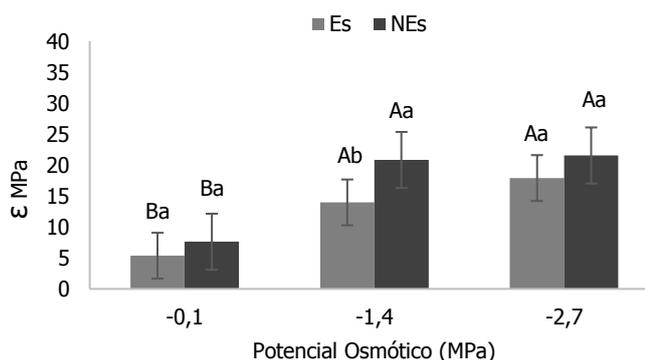
Além disso, complementam e confirmam a suposição feita por Lins et al. (2018) quando relata que existe um possível mecanismo de tolerância ainda não considerado, no qual os sais excluídos nos tricomas vesiculares contribuem para o

desenvolvimento de um gradiente de potencial hídrico favorável à absorção de água e manutenção do turgor celular.

Para o  $\Psi_o^0$  verifica-se o mesmo comportamento do  $\Psi_o^{100}$  e valores de potencial mais negativos são atrelados a maior concentração de solutos em função de um menor TRA.

O módulo de elasticidade aumentou 185% com o incremento de NaCl (Figura 12). Resultados semelhantes forem encontrados por Touchette et al. (2009) e Benzarti et al. (2014) investigando espécies halófitas (*Juncus roemerianus*, *Spartina alterniflora* e *A. portulacoides*) sob altas concentrações salinas, observando aumento do  $\epsilon$  com incremento de salinidade.

Além disso, a remoção parcial dos tricomas proporcionaram menores valores de  $\epsilon$  quando comparados as plantas NEs, apresentando assim paredes celulares mais elásticas, entretanto, resultados apresentados mostram que essa diminuição foi significativa apenas para as plantas irrigadas com solução de -1,4MPa (Figura 12).



**Figura 12** –Módulo de elasticidade ( $\epsilon$ ) em ramo de *Atriplex nummularia* aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A elasticidade da parede celular é estimada pelo módulo de elasticidade, e este depende da espécie, estágio de desenvolvimento, intensidade e tipo de estresse, sendo uma variável afetada por muitas condições de estresse abiótico (TOUCHETTE et al., 2009; RUI; DINNENY, 2019).

A manutenção do turgor celular das plantas sob estresse osmótico, além de poder indicar um acúmulo ativo de solutos, pode resultar em alterações no conteúdo de água do apoplasto e alterações na elasticidade da parede celular (TOUCHETTE et al., 2009; HAMOUDA et al., 2016).

Desta forma, os resultados sugerem que a manutenção dos tricomas vesiculares auxiliaram no aumento rigidez da parede celular, e conseqüentemente na manutenção do turgor, sendo observado principalmente para plantas de irrigadas com solução de -1,4MPa, que apresentaram uma maior porcentagem de remoção dos tricomas.

Clifford et al. (1998) relatam que em espécies que apresentam ajuste osmótico e acumulam altas concentrações de soluto, pode ser necessária uma parede celular rígida para manter a integridade ou reidratação das células após um período de estresse.

Desta forma, os resultados obtidos sugerem que as paredes celulares tornaram-se mais rígidas com o incremento da salinidade, observando que, paredes celulares mais rígidas podem facilitar a manutenção de um baixo potencial hídrico a um determinado volume celular do que paredes elásticas. (MARTINEZ et al., 2004; HASSINNE et al., 2015).

Hassinne et al. (2008) relatam que redução da elasticidade da parede celular parece aumentar a força motriz para a extração de água do solo com menor perda de água. Além disso, a rigidez da parede celular como processo fisiológico auxiliando na manutenção de mais  $\psi_w$  e turgor celular são relatados por diversos autores (TOUCHETTE et al., 2009; BENZARTI et al., 2014; HASSINNE et al., 2015; AL-YASI et al., 2020)

Estudos mais detalhados sobre a parede celular e estresse salino precisam ser explorados para identificar o processo de enrijecimento frente a salinidade, entretanto, é perceptível mudanças na parede celular com incremento salino e estas mudanças são importantes nas plantas como um mecanismo para manter a homeostase osmótica e da água em ambientes salinos (BENZARTI et al., 2014).

## CONCLUSÕES

A remoção parcial dos tricomas sob irrigação com soluções de potencial osmótico mais negativo não promoveram influências nas variáveis de TRA e SF.

O  $\Psi_w$  e  $\Psi_o$  foliar foram reduzidos significativamente com o incremento de NaCl nas soluções de irrigação.

O  $\Psi_o$  mais negativo das plantas que não foram submetidas a remoção parcial dos tricomas vesiculares comprovam que o vazamento do conteúdo inorgânico armazenado nestas estruturas são os principais responsáveis por estes valores.

As plantas irrigadas com soluções de potencial osmótico mais negativo apresentaram potencial de pressão maior que as plantas controle, apresentando uma maior turgescência destas.

A remoção parcial dos tricomas conseguiu excluir solutos concentrados no espaço apoplástico mantendo a concentração de íons no interior da célula e corrigindo a discrepância ocorrida entre os valores acessados por curva P-V e por osmometria.

Esses resultados mostraram ainda que o  $\Psi_o$  das folhas de *A. nummularia* não reduz com o aumento da concentração de sais, comprovando que a metodologia de osmometria não é indicada para plantas que apresentem tricomas vesiculares e sugerindo que principal mecanismo de tolerância ao estresse salino não é o ajustamento osmótico.

O aumento no  $\epsilon$  das plantas de *A. nummularia* é resultado de uma rigidez da parede celular em função da presença dos tricomas e salinidade, que auxilia na manutenção do turgor das plantas.

## 5 REFERÊNCIAS

- AL-YASI, Hatem et al. Impact of drought on growth, photosynthesis, osmotic adjustment, and cell wall elasticity in Damask rose. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2020.
- ARAÚJO, S.A.M. ; et al. Salinity tolerance in the halophyte *Atriplex nummularia* Lind. Grown under increasing NaCl levels. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 848–854, 2006.
- ARNDT, S. K.; IRAWAN, A.; SANDERS, G. J. Apoplastic water fraction and rehydration techniques introduce significant errors in measurements of relative water content and osmotic potential in plant leaves. **Physiologia plantarum**, v. 155, n. 4, p. 355-368, 2015.
- RUI, Y; DINNENY, J. R. A wall with integrity: surveillance and maintenance of the plant cell wall under stress. **New Phytologist**, v. 225, n. 4, p. 1428-1439, 2019.
- BELKHEIRI, O.; MULAS, M. The effects of salt stress on growth, water relations and ion accumulation in two halophyte *Atriplex* species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 86, p. 17-28, 2013.
- BENZARTI, M. et al. Effect of high salinity on *Atriplex portulacoides*: Growth, leaf water relations and solute accumulation in relation with osmotic adjustment. **South African Journal of Botany**, v. 95, p. 70-77, 2014.
- BLUM, A. Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. **Crop Science**, v. 29, n. 1, p. 230-233, 1989.
- BLUM, A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant, cell ; environment**, v. 40, p. 4-10, 2017.
- CLIFFORD, S. C. et al. The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). **Journal of Experimental Botany**, v. 49, n. 323, p. 967-977, 1998.
- DE SOUZA, Edivan Rodrigues et al. Biomass, anatomical changes and osmotic potential in *Atriplex nummularia* Lindl. cultivated in sodic saline soil under water stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 82, p. 20-27, 2012.
- DELF, E. Marion. Transpiration in succulent plants. **Annals of Botany**, v. 26, n. 102, p. 409-442, 1912.
- DONOVAN, L.; LINTON, M.; RICHARDS, J. Predawn plant water potential does not necessarily equilibrate with soil water potential under well-watered conditions. **Oecologia**, v. 129, n. 3, p. 328-335, 2001.
- FANJUL, L.; BARRADAS, V. Diurnal and Seasonal Variation in the Water Relations of Some Deciduous and Evergreen Trees of a Deciduous Dry Forest of the Western Coast of Mexico. **The Journal of Applied Ecology**, v. 24, n. 1, p. 289, 1987.
- HAMOUDA, I. et al. Salt tolerance of *Beta macrocarpa* is associated with efficient osmotic adjustment and increased apoplastic water content. **Plant Biology**, v. 18, n. 3, p. 369-375, 2016.

- HASSINE, A. B.; LUTTS, S. Differential responses of saltbush *Atriplex halimus* L. exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 17, p. 1448-1456, 2010.
- HESSINI, Kamel et al. Biomass production, photosynthesis, and leaf water relations of *Spartina alterniflora* under moderate water stress. **Journal of Plant Research**, v. 121, n. 3, p. 311-318, 2008.
- HESSINI, Kamel et al. How does salinity duration affect growth and productivity of cultivated barley?. **Agronomy Journal**, v. 107, n. 1, p. 174-180, 2015.
- HOAGLAND, D. R., & ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. **California agricultural experiment station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.
- HUSSIN, S.; GEISLER, N.; KOYRO, H.W. Effect of NaCl salinity on *Atriplex nummularia*(L.) with special emphasis on carbon and nitrogen metabolism. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.35, n.4, p. 1025-1038, 2013.
- JAMIL, M. et al. Effect of salinity on physiological and biochemical characteristics of different varieties of rice. **Pak. J. Bot**, v. 44, n. 1, p. 7-13, 2012.
- KARIMI, S. et al. Inducing drought tolerance in greenhouse grown *Juglans regia* by imposing controlled salt stress: The role of osmotic adjustment. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 181-192, 2018.
- KIANI-POUYA, Ali et al. Epidermal bladder cells confer salinity stress tolerance in the halophyte quinoa and *Atriplex* species. **Plant, cell & environment**, v. 40, n. 9, p. 1900-1915, 2017.
- LINS, C. M. T. et al. Pressure-volume (PV) curves in *Atriplex nummularia* Lindl. for evaluation of osmotic adjustment and water status under saline conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 124, p. 155-159, 2018.
- MARTÍNEZ, Juan-Pablo et al. Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atriplex halimus* L?. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 9, p. 1041-1051, 2004.
- MARUR, C. J. Curvas pressão-volume e expansão foliar em cultivares de algodoeiro submetidos à déficit hídrico. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 3, p. 563-569, 1999.
- MELO, H. F. et al. Water potential in soil and *Atriplex nummularia* (phytoremediator halophyte) under drought and salt stresses. **International journal of phytoremediation**, v. 20, n. 3, p. 249-255, 2018.
- MINHAS, P. S. et al. Coping with salinity in irrigated agriculture: Crop evapotranspiration and water management issues. **Agricultural Water Management**, v. 227, n. October 2019, p. 105832, 2020.
- MUNNS, R.; SHARP, R.E; Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soils of low water potential. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 20, p. 425- 437, 1993.

PAN, Y. et al. A fotossíntese, homeostase  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  e ajuste osmótico de *Atriplex canescens* em resposta à salinidade. **Fronteiras em ciência das plantas**, v. 7, p. 848, 2016.

RUI, Yue; DINNENY, José R. A wall with integrity: surveillance and maintenance of the plant cell wall under stress. **New Phytologist**, v. 225, n. 4, p. 1428-1439, 2020.

SCHOLANDER, P. et al. Sap Pressure in Vascular Plants: Negative hydrostatic pressure can be measured. **Plants Science**, v. 148, n. 3668, p. 339-346, 1965.

SILVEIRA, Joaquim Albenisio Gomes et al. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 1, p. 1-8, 2009.

SINCLAIR, R.; VENABLES, W. An alternative method for analysing pressure-volume curves produced with the pressure chamber. *Plant, Cell and Environment*, v. 6, n. 3, p. 211-217, 1983.

TOUCHETTE, B. W. et al. Tolerance and avoidance: two contrasting physiological responses to salt stress in mature marsh halophytes *Juncus roemerianus* Scheele and *Spartina alterniflora* Loisel. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 380, n. 1-2, p. 106-112, 2009.

TURNER N.C. Turgor maintenance by osmotic adjustment: 40 years of progress. **Journal of experimental botany**, v. 69, n. 13, p. 3223-3233, 2018.

TYREE, M. T.; HAMMEL, H. T. The measurement of the turgor pressure and the water relations of plants by the pressure-bomb technique. **Journal of experimental Botany**, v. 23, n. 1, p. 267-282, 1972.

### **CAPÍTULO III**

---

INFLUÊNCIA DOS TRICOMAS VESICULARES NO METABOLISMO  
FOTOSSINTÉTICO E ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE *Atriplex nummularia*  
SUBMETIDAS A ESTRESSE SALINO

PAULINO, MARTHA KATHARINNE SILVA SOUZA. MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Fevereiro de 2020. **Influência dos tricomas vesiculares no metabolismo fotossintético e antioxidante em plantas de *Atriplex nummularia* submetidas a estresse salino.**

Orientador: Prof. Dr. Edivan Rodrigues de Souza

Co-orientadoras: Dr<sup>a</sup>. Cintia Maria Teixeira Lins

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva

## RESUMO

As halófitas são plantas capazes de se desenvolver em ambientes salinos, as quais apresentam adaptações fisiológicas e morfológicas, superando os efeitos causados pela alta concentração de sais. Dentre os mecanismos adotados por esse tipo de planta, os tricomas vesiculares desempenham um papel fundamental, sendo responsáveis pelo acúmulo de íons tóxicos em suas estruturas e conferindo tolerância à salinidade. Assim, o objetivo desta pesquisa é avaliar a influência dos tricomas na halófita *Atriplex nummularia* submetidas a irrigação com águas de três diferentes níveis de potencial osmótico (-0,1; -1,4 e -2,7MPa) formulados a partir de NaCl (0; 300 e 600mmol L<sup>-1</sup>) com a presença e remoção de tricomas vesiculares. Para isto, foi adotado o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 3 x 2 com cinco repetições, totalizando 30 unidades experimentais. Foram avaliadas as trocas gasosas (fotossíntese líquida, condutância estomática, transpiração, carbono interno e eficiência do uso da água), fluorescência da clorofila a (fluorescência inicial, máxima, variável e rendimento quântico) e marcadores de estresse oxidativo (extravasamento de eletrólitos, conteúdo de MDA, conteúdo de peróxido de hidrogênio e atividade enzimática da superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase). As trocas gasosas foram fortemente influenciadas com a elevação das concentrações de NaCl, derivado de uma resposta adaptativas da espécie a salinidade. A presença dos tricomas foram capazes de regular os processos estomáticos de forma que a planta mantenha seu desempenho fotossintético. Dados de fluorescência da clorofila demonstraram a integridade do componente do fotossistema (FSII) mesmo com a remoção dos tricomas e elevação da salinidade. A avaliação de extravasamento de eletrólitos, junto com o aumento do conteúdo de MDA sugerem que a remoção parcial das vesículas apresenta maior probabilidade de estresse oxidativo. E dentre as atividades enzimáticas avaliadas a atividade da APX é um dos principais mecanismos adotados pela *Atriplex nummularia* na desintoxicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Palavras-chave:** fotossíntese, erva sal, halófitas, enzimas antioxidantes.

PAULINO, MARTHA KATHARINNE SILVA SOUZA. MSc. Federal Rural University of Pernambuco. February 2020. **Influence of vesicular trichomes on photosynthetic and antioxidant metabolism in *Atriplex nummularia* plants subjected to salt stress.**

**Advisor:** Prof. Dr. Edivan Rodrigues de Souza

**Co- Advisor:** Dr<sup>a</sup>. Cintia Maria Teixeira Lins

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva

## **ABSTRACT**

Halophytes are plants capable of growing in saline environments, which present physiological and morphological adaptations, overcoming the effects caused by the high concentration of salts. Among the mechanisms adopted by this type of plant, epidermal bladders play a fundamental role, being responsible for the accumulation of toxic ions in their structures and providing tolerance to salinity. Thus, the objective of this research is to evaluate the influence of bladders cells on halophyte *Atriplex nummularia* submitted to irrigation with waters of three different levels of osmotic potential (-0.1; -1.4 and -2.7MPa) formulated from NaCl ( 0; 300 and 600mmol L<sup>-1</sup> ), having plants with epidermal bladders and plants partially absent from these bladders cells. For this, a randomized block design in a 3 x 2 factorial scheme with five replications was adopted, totaling 30 experimental units. Gas exchanges (liquid photosynthesis, stomatal conductance, transpiration, internal carbon and water use efficiency), chlorophyll a fluorescence (initial, maximum, variable and quantum yield) and oxidative stress markers (electrolyte leakage, content concentration, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and enzymatic activity of superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase). Gas exchange was strongly influenced by the increase in NaCl concentrations, derived from an adaptive response of the species to salinity. The presence of trichomes was able to regulate stomatal processes so that the plant maintains its photosynthetic performance. Chlorophyll fluorescence data demonstrated the integrity of the photosystem component (FSII) even with the removal of bladders cells and elevated salinity. enzymes lack completion. Among the enzyme activities evaluated, APX activity is one of the main mechanisms adopted by *Atriplex nummularia* in the detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Keywords:** Epidermal bladders, salinity, halophytes

## 1 INTRODUÇÃO

O estresse salino é um dos principais fatores responsáveis pela redução da produtividade em áreas agrícolas (SILVA et al., 2018). A salinização do solo apresenta efeitos diretos no crescimento e na produtividade das plantas, primeiramente com o aumento do estresse osmótico, seguido de um acúmulo desequilibrado de íons causando toxicidade (MINHAS et al., 2020).

O efeito osmótico causado pela salinidade do solo é reflexo de presença da alta concentração de sais, aumentando a pressão osmótica e dificultando a absorção de água e de nutrientes para as plantas, induzindo um estado de seca e dificultando a osmorregulação (DEINLEIN et al., 2014; LITALIEN; ZEEB, 2020).

O estresse secundário decorrente da salinidade é o estresse oxidativo, caracterizado pela toxicidade de íons, acarretando, além de injúrias na epiderme foliar, o descontrole metabólico envolvendo processos como fotossíntese, respiração e o metabolismo celular em geral (DIAS et al., 2016).

Desta forma, para sobreviver em ambientes salinos, algumas plantas desenvolveram adaptações altamente eficientes, como mecanismos bioquímicos, anatômicos e moleculares (KIANI-POUYA et al., 2017).

As plantas halófitas, por exemplo, são potencialmente mais tolerantes à salinidade, por possuírem estratégias mais eficientes, uma vez que, além de apresentar maior expressão dos mecanismos de tolerância bioquímicos e fisiológicos, muitas halófitas realizam a compartimentação dos íons no vacúolo e pela excreção em tricomas vesiculares localizados na epiderme das folhas, como a *Atriplex nummularia* (DE SOUZA et al., 2012; SILVA et al., 2018).

O mecanismo de compartimentalização e excreção impede que os íons tóxicos absorvidos pela planta na presença de altas concentrações de sais atinjam os processos e as funções essenciais destas, sendo extremamente importante na tolerância da salinidade nas espécies halofitas (SHABALA; BOSE; HEDRICH, 2014).

Além disso, para lidar com esses distúrbios metabólicos as plantas dispõem de um complexo sistema de proteção antioxidante, representado por pigmentos, antioxidantes de baixa massa molecular e enzimas catalisadoras de reações de eliminação (desintoxicação) de Espécies Reativas de Oxigênio - EROs (SILVEIRA et al., 2016).

Diante disto, a presente pesquisa tem como objetivo verificar a contribuição dos tricomas vesiculares de *A. nummularia* sob condição de salinidade, através de avaliações de parâmetros fisiológicos e bioquímicos como as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a* e das enzimas antioxidantes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal e Local do Experimento

As mudas de *Atriplex nummularia* foram propagadas por estaquia, utilizando uma única matriz proveniente do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Estas, foram inicialmente cultivadas em sacos de polietileno com capacidade de 0,5dm<sup>3</sup>, contendo areia lavada como substrato e irrigadas diariamente com solução nutritiva de Hoagland, Arnon (1950) a ½ de força iônica.

Aos 60 dias após a confecção das mudas, realizou-se o transplântio, para vasos de com capacidade de 5 dm<sup>3</sup> com areia lavada, nos quais permaneceram por mais 60 dias até o início da imposição dos tratamentos salinos.

O experimento foi conduzido em ambiente protegido do Departamento de Agronomia, situado no campus sede da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizado em Recife-PE (8°04'03'' de latitude sul, 34°55'00'' de longitude oeste e altitude de 4 m).

### 2.2 Elaboração e manejo da água de irrigação

As soluções de irrigação foram confeccionadas com solução nutritiva de Hoagland, Arnon (1950) correspondente ao potencial osmótico de -0,1MPa e solução nutritiva suplementada com NaCl (300 e 600mmol L<sup>-1</sup>), correspondente aos potenciais osmóticos -1,4 e -2,7 MPa, obtidos através da leitura de osmolalidade, com auxílio do osmômetro de pressão de vapor e calculados a partir da equação de Van't Hoff (Equação 1).

$$\Psi_0 = - RTC \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

R= Constante geral dos gases (0,00831 kg MPa mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)

T= Temperatura em Kelvin (K)

C= Concentração do soluto (mol kg<sup>-1</sup>)

Com o objetivo de evitar choque osmótico, o estabelecimento dos tratamentos foi realizado gradativamente, em incrementos diários de 25 e 50 mmol de solução nutritiva de Hoagland, Arnon (1950) suplementada com NaCl até atingir as concentrações propostas em 12 dias. Além disso, foram irrigadas plantas com solução nutritiva e ausência de NaCl que foram adotadas como controle. A irrigação foi realizada

diariamente ao final da tarde, com volume suficiente para haver drenagem e manutenção dos potenciais propostos no sistema.

### 2.3 Remoção dos tricomas

No início e aos 25 dias de tratamento, parte das plantas irrigadas tiveram parte dos seus tricomas vesiculares das faces (abaxial e adaxial) de todas as folhas, removido de forma cautelosa usando um pincel macio.

Com isto, dois tipos de tratamentos foram realizados nas plantas (Figura 1): no primeiro as plantas permaneceram intactas, ou seja, os tricomas vesiculares não foram removidos através da escovação com pincel (abreviadas como Não Escovadas - NEs). Já no segundo tratamento, as plantas foram submetidas a escovação com pincel um dia antes do início e aos 25 dias de tratamento salino (abreviado como Escovadas - Es).

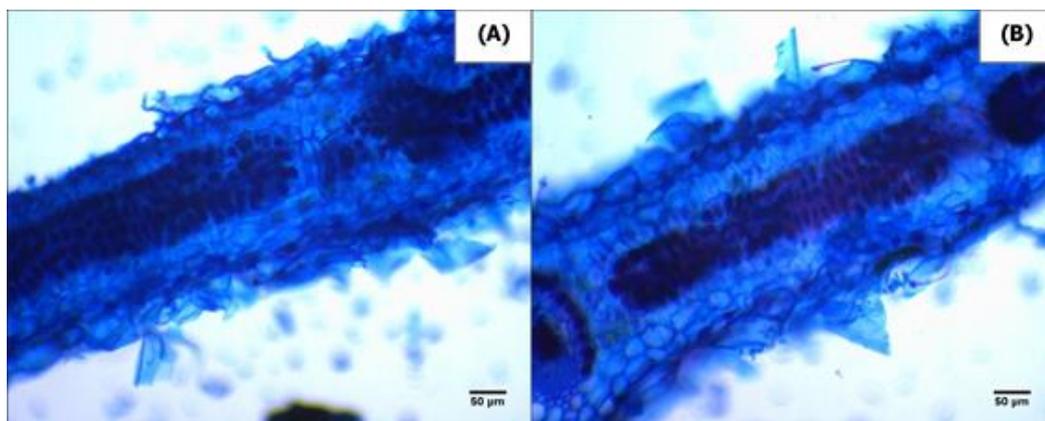


**Figura 1** – Ramo de *Atriplex nummularia* escovados (Es) e não escovados (NEs) e em destaque imagem da epiderme de folhas

### 2.4 Confeção de lâminas e densidade de tricomas

Para garantir que o procedimento utilizado para a remoção dos tricomas vesiculares não tenha causado nenhum dano a epiderme, a mesma foi analisada através da confecção de cortes anatômicos.

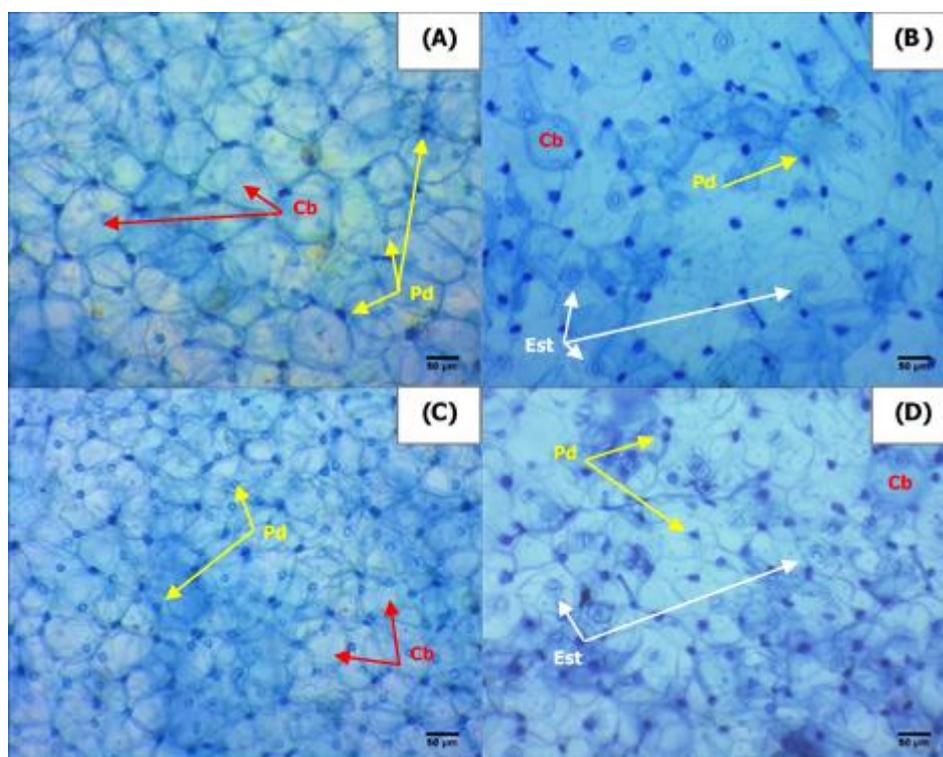
Foram confeccionadas lâminas semipermanentes contendo cortes transversais de folhas de *A. nummularia* realizados à mão livre. Os cortes foram descoloridos com hipoclorito de sódio, corados com azul de metileno (1%) e fixados nas lâminas com glicerina (50%) para observação da integridade do mesofilo após a escovação (Figura 2).



**Figura 2** – Cortes transversais de *Atriplex nummularia* submetida a escovação, destacando o mesófilo foliar (A) e mesófilo próximo a nervura central (B).

Para observação da epiderme foi realizada a dissociação epidérmica das folhas de *A. nummularia* da região do ápice, terço médio e base com hipoclorito de sódio a 60%, em seguida coradas com azul de metileno (1%) e fixadas nas lâminas com glicerina (50%).

As lâminas foram observadas através de microscópio fotônico acoplado a uma câmera para a captura de imagens, para contabilizar a densidade de tricomas em cada tratamento com auxílio do programa Image J (Figura 3).



**Figura 3** – Lâmina da epiderme foliar de *Atriplex nummularia* não escovada face adaxial (A) e face abaxial (C), escovada face adaxial (B) e face abaxial (D), detalhes da estrutura dos tricomas vesiculares: cabeça “Cb”, pedúnculo “Pd”, estômato “Est”.

## **2.5 Metabolismo fotossintético**

### **2.5.1 Trocas Gasosas**

As avaliações das trocas gasosas das plantas foram realizadas aos 7 e 30 dias após a imposição dos tratamentos salino, medindo-se a Fotossíntese líquida ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração ( $E$ ), carbono interno ( $C_i$ ) por meio de um Analisador Portátil de Gás Infravermelho (IRGA), modelo LICOR Li- 6400, sendo calculando posteriormente a eficiência do uso da água ( $EUA - A/E$ ).

As leituras foram realizadas entre 8 e 11h, com auxílio de câmara de luz sendo o sistema ajustado para fornecer uma radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de  $1800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura do bloco de  $2^\circ\text{C}$ , umidade relativa do ar de referência variável na faixa de 50 a 60% e a concentração de  $\text{CO}_2$  do ar de referência de  $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a fim de padronizar as condições de leitura.

### **2.5.2 Fluorescência da Clorofila**

A fluorescência da clorofila foi realizada aos 7 e 30 dias após o início do tratamento salino determinada com um fluorômetro portátil (Modelo Fluorpen FP 100) em folhas não destacadas, sadias e totalmente expandidas da região do terço médio da planta. Foram amostradas folhas expostas ao sol dos ramos selecionados de todos os indivíduos, selecionando-se sempre uma única folha por planta.

O procedimento iniciou-se pinçando uma região circular da folha (local de determinação da fluorescência) por um período de 30 minutos (Figura 4). Esse procedimento é importante por promover a abertura dos centros de reação do PSII.

A fluorescência inicial ( $F_0$ ) foi determinada a partir da incidência de um pulso de luz modulada de baixa intensidade ( $< 0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para não repercutir em influências na fluorescência variável. A fluorescência máxima ( $F_m$ ) foi obtida a partir da incidência de um pulso de luz saturante 0,3s de duração. A  $F_v$  foi determinada pela diferença entre  $F_m$  e  $F_0$ . A partir dos resultados de  $F_v$  e  $F_m$  obteve-se a relação  $F_v/F_m$ .



**Figura 4** – Aclimação das folhas ao escuro para determinação de fluorescência da clorofila *a* com auxílio de fluorômetro portátil.

## **2.6 Metabolismo antioxidante**

### **2.6.1 Extravasamento de eletrólitos**

A integridade da membrana celular foi avaliada por meio da observação do vazamento de eletrólitos do tecido foliar. Para isso, foram coletados 20 discos foliares, tendo 1 cm de diâmetro cada, os quais ficaram imersos em 30 ml de água destilada por 24 horas. Passado esse tempo, realizou-se a primeira leitura de condutividade elétrica livre (CL), com auxílio de um condutivímetro de bancada. Após esta leitura, as mesmas amostras foram submetidas a banho maria a 95°C por uma hora, para posterior leitura da condutividade elétrica total (CT). De posse dos dados, calculou-se a porcentagem de extravasamento de eletrólitos conforme equação 2 (VASQUEZ-TELLO et al., 1990).

$$PEE = \frac{CL}{CT} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

### **2.6.2 Extração para avaliação da concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e determinação de peroxidação lipídica (MDA)**

Aos 30 dias de estresse salino, foram coletadas folhas totalmente expandidas do terço médio das plantas, congeladas, maceradas em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% juntamente com 20% de PVPP (polivinilpolipirrolidona). A solução extraída foi centrifugada a 10.000g a 4°C por 5 minutos e os sobrenadantes obtidos foram separados em microtubos e congelados em freezer a -20°C para posterior avaliação.

### **2.6.2.1 Conteúdo de Peróxido de Hidrogênio**

A partir do sobrenadante obtido na extração, retirou-se 200  $\mu\text{L}$  da amostra e foi adicionado a esta 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800  $\mu\text{L}$  de solução 1 M de iodeto de potássio. As amostras permaneceram em gelo e no escuro, durante uma hora. Passado este período, as amostras foram retiradas do gelo e mantidas em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Figura 6) a 390 nm (LORETO; VELIKAVA, 2001). Os resultados expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$ .

### **2.6.2.2 Peroxidação Lipídica**

A peroxidação de lipídeos foi avaliada através da mensuração do conteúdo de malondialdeído (MDA), o qual é um produto da peroxidação lipídica. Do sobrenadante obtido na extração retirou-se uma alíquota de 250 $\mu\text{L}$  e pipetou-se em tubos criogênicos contendo 1mL de solução de ácido tiobarbitúrico (0,5%) e ácido tricloroacético (20%). Esta solução foi mantida em banho-maria a 95°C durante 30 minutos e em seguida, passou por rápido resfriamento por 10 minutos. Após esse tempo, a solução foi centrifugada a 10.000g por 10 minutos e realizou-se a leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 535 e 600 nm (HEATH; PACKER, 1968). A peroxidação lipídica foi expressa em nmol (MDA)  $\text{g}^{-1}\text{MF}$ .

### **2.6.3 Extração para avaliação da atividade enzimática**

Para extração das proteínas, também aos 30 dias de estresse salino, foram coletadas folhas totalmente expandidas do terço médio das plantas, congeladas e maceradas em nitrogênio líquido e extraídas em solução tampão de extração (pH 7,0) contendo fosfato de potássio, 1,4 – dithiothreitol e ácido etilenodiamino tetra-acético,

A solução extraída foi centrifugada a 10.000g a 4°C por 20 minutos e os sobrenadantes obtidos foram separados em microtubos e congelados em freezer a -20°C para posterior avaliação. Toda as enzimas foram expressas em U  $\text{mg}^{-1}$  de proteínas, sendo a concentração das proteínas totais determinada segundo o método de Bradford (1976).

#### **2.6.3.1 Atividade da Superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da superóxido dismutase foi determinada em em meio de reação constituído de 1765  $\mu\text{L}$  de 154 tampão fosfato de sódio (85 mmol/L), 780  $\mu\text{L}$  de metionina (50 mmol/L), 225  $\mu\text{L}$  de nitro blue tetrazolium (1 mmol/L), 30  $\mu\text{L}$  de EDTA (10 mmol/L)

e 150 µL de riboflavina (0,1 mmol/L) foi adicionada a 50µL do extrato da amostra em tubos de ensaio (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977).

A produção de formazana azul proveniente da redução do NBT em presença de luz é máxima na ausência da enzima. A atividade da SOD está relacionada à capacidade da enzima presente no extrato em inibir a produção de formazana azul e uma unidade de SOD é a quantidade de enzima requerida capaz de reduzir em 50% a produção de formazana azul. A produção de formazana proveniente da redução do NBT em presença de luz foi lida em espectrofotômetro a 560 nm e a atividade da SOD foi cauculada com base na capacidade catflica da unidade enzimática em inibir a formação da formazana.

### **2.6.3.2 Ascorbato Peroxidase (APX)**

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada em meio de reação constituído por 100µL do extrato enzimático, 2,7mL do tampão fosfato de potássio (50mmol/L – pH 6,0) contendo ascorbato (0,5 mmol/L) e 200 µL peróxido de hidrogênio (0,1 mmol/L). A atividade da APX foi monitorada pela taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm em espectrofotômetro (NAKANO; ASADA, 1981).

### **2.6.3.3 Atividade da Catalase (CAT)**

A atividade da catalase (CAT) foi determinada em um meio de reação constituído por 50 µL do extrato enzimático; 2,95ml do tampão fosfato de potássio (50mmol/L – pH 7,0) e peróxido de hidrogênio (20 mmol/L). A atividade da CAT foi monitorada pela decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da mudança na absorbância lida a 240 nm em espectrofotômetro (HAVIR; MCHALE, 1987).

## **2.7 Análise de Dados**

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, e analisado em esquema fatorial (3x2) relativo a três níveis de potencial osmótico (-0,1; -1,4 e -2,7 MPa) e plantas com tricomas vesiculares (não escovadas (NEs)) e plantas com remoção parcial dos tricomas vesiculares (escovadas (Es)). Cada tratamento com cinco repetições totalizando 30 unidades experimentais.

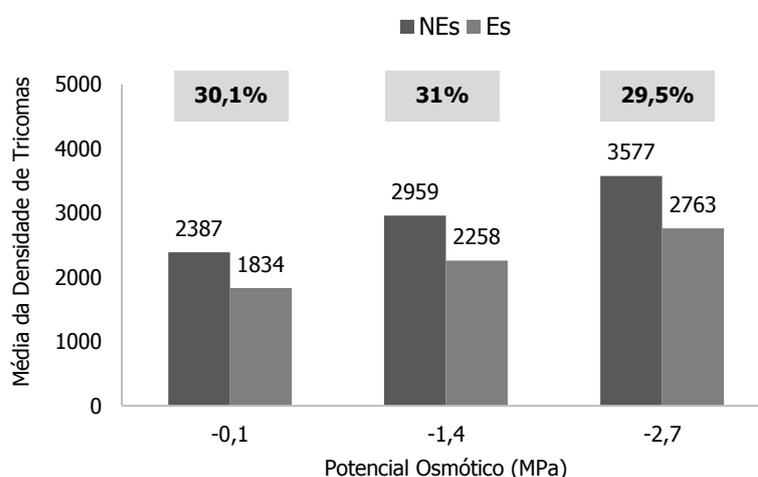
Os dados foram tabulados, submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparação de média por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Remoção dos Tricomas

Foi verificado, mediante testes, que a metodologia utilizada para a remoção completa dos tricomas vesiculares resultou na morte das plantas, divergindo assim do apresentado por Kiani-Pouya et al. (2017), que utilizou metodologia semelhante com as halófitas *quinoa* e *Atriplex lentiformis* e ambas não sofreram danos fisiológicos ou bioquímicos.

Diante disso, procedeu-se o experimento realizando a remoção parcial dos tricomas. A partir da técnica utilizada e a contabilização dos tricomas existentes após a escovação, foi possível observar uma redução cerca de 30 % dos tricomas em relação as plantas não escovadas (Figura 5).

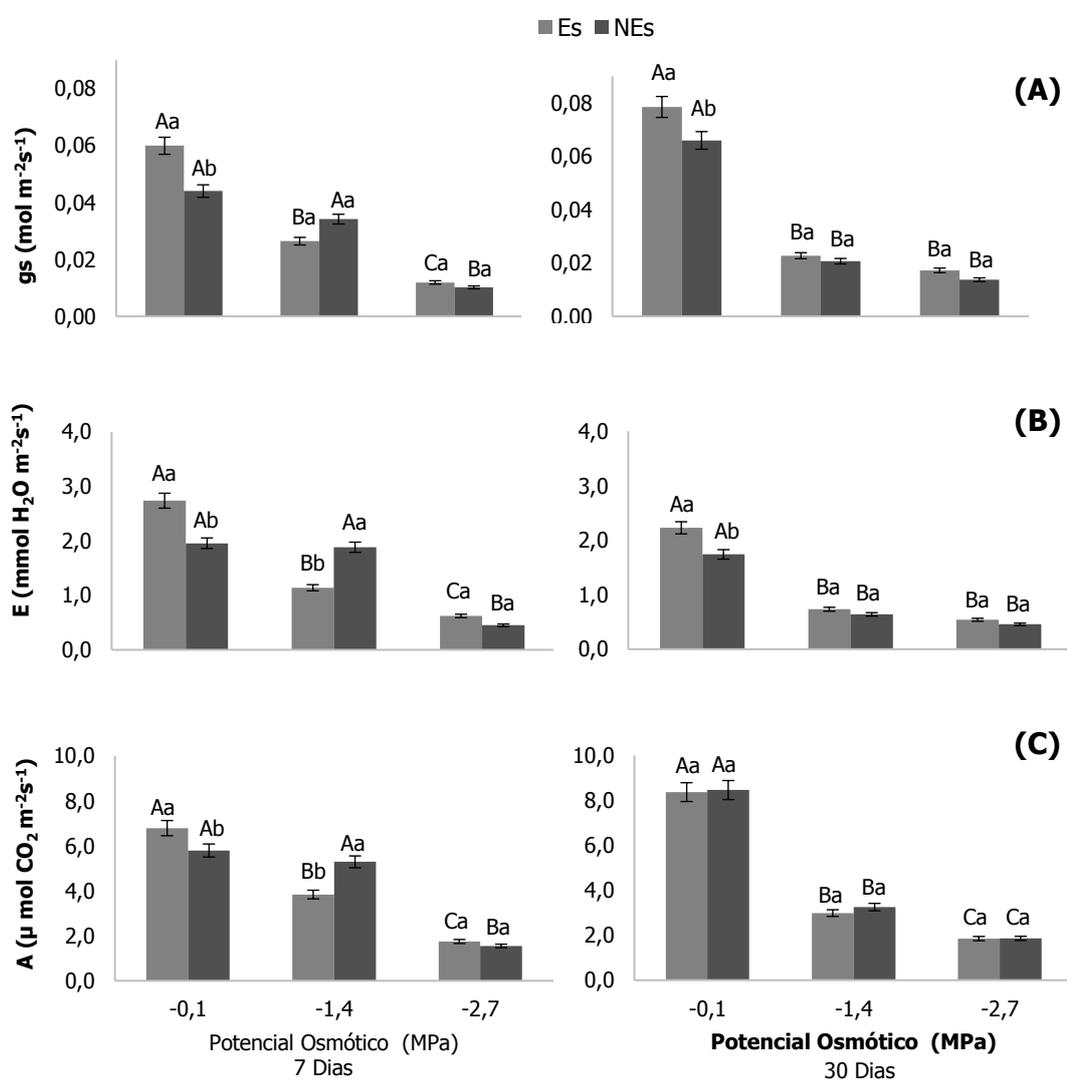


**Figura 5** – Densidade dos tricomas vesiculares de *Atriplex nummularia* após a segunda remoção aos 25 dias de tratamento salino. Em destaque a porcentagem de remoção dos tricomas obtida com a escovação.

#### 3.2 Metabolismo fotossintético

A condutância estomática (*gs*) das plantas de *A. nummularia* foram fortemente influenciadas pelo estresse salino apresentando uma diminuição com o potencial osmótico mais negativo das soluções de irrigação nos dois momentos de avaliação, reduzindo em maior proporção aos 30 dias de estresse, com diferenças de 70 e 78% das plantas irrigadas com solução de -1,4 e -2,7MPa respectivamente quando comparadas as plantas controle (Figura 6).

Da mesma maneira, a transpiração ( $E$ ) das plantas também sofreu uma redução com o aumento da concentração de sais nos dias avaliados, esse tipo de repostas pode estar diretamente relacionado com o fechamento estomático.



**Figura 6** – A - Condutância Estomática ( $g_s$ ), B - Transpiração ( $E$ ) e C - Assimilação fotossintética de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 7 e 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A assimilação fotossintética de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) das plantas de *A. nummularia* foram fortemente influenciadas pelo potencial osmótico mais negativo (Figura 6), apresentando já aos 7 dias de estresse uma tendência decrescente, o que se manteve aos 30 dias, chegando a reduzir 64 e 75% da assimilação fotossintética para as nas plantas irrigadas com solução de -1,4 e -2,7MPa respectivamente.

Resultados semelhantes foram observados por Geissler et al. (2015) trabalhando com a mesma espécie, as quais apresentaram uma redução na taxa de assimilação fotossintética de 75% para o tratamento com 750 mmol de NaCl sob concentração ambiente de CO<sub>2</sub>.

A resposta estomática geralmente ocorre antes da inibição da fotossíntese limitando a disponibilidade de CO<sub>2</sub> no cloroplasto, sendo este o mecanismo de defesa provavelmente mais importante que limita a fixação de carbono (OLIVEIRA et al., 2017).

A redução da condutância estomática é resultado do mecanismo de defesa das plantas frente a salinidade, uma vez que estas apresentam uma alta eficiência na abertura e fechamento dos estômatos, refletindo diretamente, no aumento da eficiência de uso da água e auxiliando na manutenção do status hídrico da planta (TAIZ et al., 2017).

A redução da assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> com o incremento da concentração de sal pode ser atribuída ao fechamento estomático, induzido pela salinidade, causando um desbalanço no processo de fotossíntese e excesso de energia no sistema de captação de luz, podendo resultar no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SILVA et al., 2010; SILVEIRA et al., 2016).

Quanto a remoção parcial dos tricomas, de modo geral, os valores de *g<sub>s</sub>*, *E* e *A* (Figura 6), não apresentaram diferença significativa, exceto para as plantas controle que apresentaram uma redução de 36, 40 e 17% respectivamente, dos valores obtidos pelas plantas NEs quando comparadas a Es aos 7 dias de estresse salino e 19 e 28% para a *g<sub>s</sub>* e *E* aos 30 dias de estresse salino.

Também foi observado diferença significativa para estas variáveis nas plantas irrigadas com solução -1,4MPa aos 7 dias de estresse salino, na qual os valores das plantas NEs aumentaram 22% para a *g<sub>s</sub>*, 40% para *E* e 27% para *A* em relação as Es.

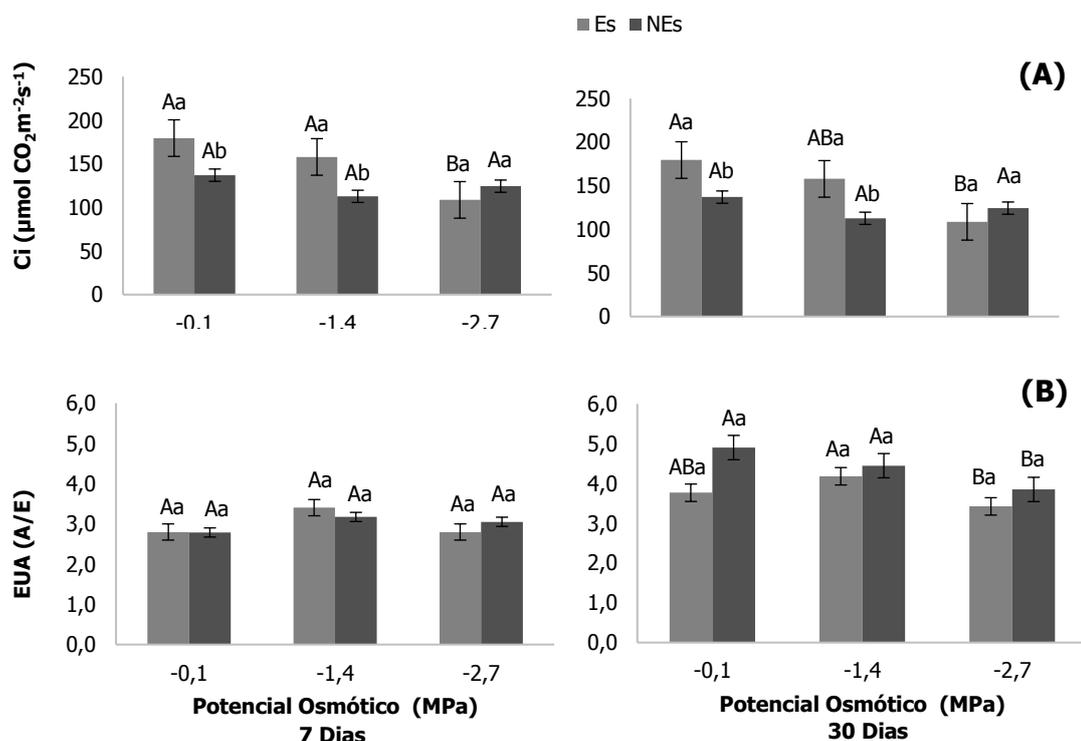
Kiani-Pouya et al, (2019) investigando papel dos tricomas vesiculares no padrão estomático na tolerância à salinidade em plantas de quinoa, verificaram que plantas de quinoa regulam o processo de transpiração e entrada de CO<sub>2</sub> através do comprimento dos estômatos, observando que este diminuiu em média 30% em todos os acessos estudados.

Desta forma, no presente estudo, o comportamento semelhante das variáveis apresentadas sugere que as respostas obtidas foram resultado do fechamento estomático. Além disso, induz que a presença dos tricomas são capazes de regular os processos estomáticos de forma que a planta mantenha seu desempenho fotossintético.

Isso é observado aos 7 dias de estresse, no qual as plantas NEs matem constante as variáveis de *A*, *g<sub>s</sub>* e *E* nas plantas controle e irrigadas com solução de -1,4MPa reduzindo em maior proporção para as plantas irrigadas com maior concentração de NaCl

e as Es apresentam essa redução de forma mais brusca. Já aos 30 dias o comportamento entre as plantas Es e NEs apresentam-se de forma semelhante exceto nas plantas controle na qual sugerem que a maior densidade de tricomas reduziu a abertura estomática.

A concentração interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) das plantas de *A. nummularia* apresentaram, uma diminuição com o incremento da salinidade para as plantas Es e mantiveram constante para as NEs aos 7 e 30 dias de estresse (Figura 7).



**Figura 7** – A - Concentração interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) e B - eficiência do uso da água (EUA) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 7 e 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Já os resultados da eficiência do uso da água (EUA) mantiveram-se constantes para todos os tratamentos em ambas leituras, exceto para as plantas irrigadas com solução de -2,7 MPa aos 30 dias de estresse salino (Figura 7).

Resultado semelhantes foram também relatados por Rangani et al. (2016), trabalhando com a halófito *Salvadora persica* sob altas concentração de sais, as quais apresentaram reduções na *g<sub>s</sub>* e *E* sob as salinidades de 750 e 1000mmol de NaCl e permaneceram inalterados os valores de C<sub>i</sub> e EUA intercelular.

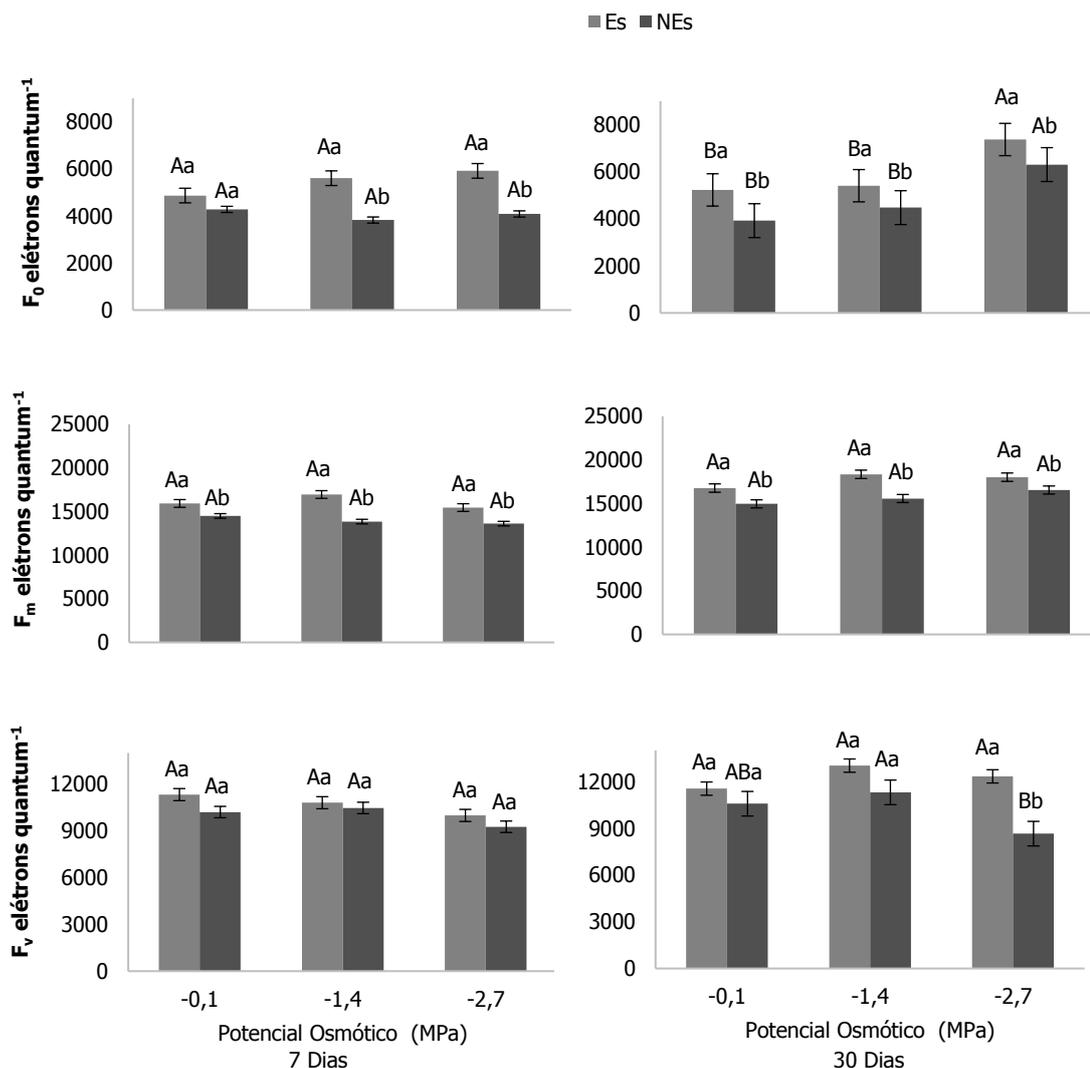
Oliveira et al., (2016) investigando estresse salino ao longo do tempo em plantas de *A. nummularia* também observou um aumento da concentração interna de CO<sub>2</sub> aos 15 e 30 dias de estresse salino para as concentrações de 300 e 600mmol de NaCl.

Quanto a remoção dos tricomas, foi possível observar diferença significativa para as plantas controle e irrigadas com solução de -1,4MPa aos 7 e 30 dias de estresse, nas quais as plantas Es apresentaram valores de  $C_i$  maiores que as plantas NEs.

Para a  $EUA$  nenhum dos dias avaliados apresentou diferença significativa quanto a remoção parcial dos tricomas. Além disso, de maneira geral, o tratamento de -1,4MPa apresentou maiores médias de  $EUA$  sugerindo que este tratamento oferece condições vantajosas no desenvolvimento da espécie *A. nummularia*.

O aumento da  $C_i$  acompanhada do decréscimo da  $g_s$  induzindo que o fechamento dos estômatos seria o fator principal da limitação do desempenho fotossintético, o que pode acarretar a redução da capacidade do mesofilo de assimilar carbono (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A fluorescência da clorofila pode ser usada como sonda para a atividade fotossintética bem como para monitorar processos regulatórios que afetam o fotossistema II ( $FSII$ ) (KALAJI et al., 2017). De maneira geral a remoção parcial dos tricomas influenciaram significativamente nos parâmetros de fluorescência da clorofila apresentando valores superiores para as plantas Es, sugerindo uma sensibilidade destas ao estresse imposto (Figura 8).



**Figura 8** – Fluorescência inicial ( $F_0$ ), Máxima ( $F_m$ ), Variável ( $F_v$ ) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 7 e 30 dias de estresse salino. Letras iguais, minúsculas ao longo do tempo e maiúsculas entre os potenciais, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A  $F_0$  apresentou um aumento para as plantas irrigadas com solução de potenciais mais negativos, principalmente com a maior concentração de sais, apresentando aumento de 35% para plantas irrigadas com solução de -2,7Mpa aos 30 de estresse salino (Figura 8).

Para a  $F_m$  o tratamento salino não apresentou diferença significativa. Entretanto, foi possível observar que as plantas submetidas a escovação apresentaram valores 10% superior as plantas NEs diferindo entre si estatisticamente aos 7 e 30 dias de estresse salino.

Resultados semelhantes foram encontrados por Melo; De Souza; Cunha, (2017) trabalhando com a mesma espécie sob níveis crescentes de salinidade.

A  $F_0$  indica ativação das reações fotoquímicas, pois é o primeiro estímulo na exposição imediata à luz, subindo para o nível mínimo de fluorescência que é obtido quando os centros de reação do Fotossistema II (*FSII*) apresentam-se no estado aberto (BAKER; ROSENQVST, 2004).

Desta forma, aumentos na  $F_0$  pode indicar o comprometimento dos centros de reação do *FSII* ou problemas na transferência da energia de excitação da antena para os centros de reação (GUO et al., 2015).

A remoção parcial dos tricomas proporcionou valores de  $F_0$  mais altos em relação as plantas NEs, principalmente aos 30 dias de estresse salino, onde observou-se este crescimento para todos os níveis salinos estudados.

Diante disto, os dados obtidos sugerem que a presença dos tricomas vesiculares contribuiu de maneira positiva nas reações fotoquímicas, apresentando valores de  $F_0$  mais baixo quando comparadas as plantas escovadas.

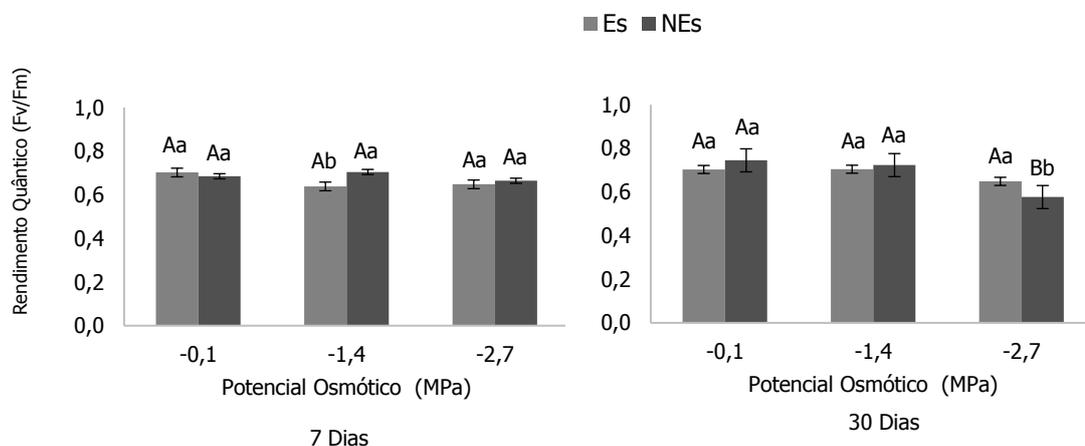
A  $F_m$  representa a intensidade máxima da fluorescência, quando praticamente toda a quinona é reduzida e os centros de reação atingem sua capacidade máxima de reações fotoquímicas (BAKER; ROSENQVIST, 2004; SILVA et al., 2015).

Desta forma, quanto maior sua taxa em relação a  $F_0$ , maior o fluxo de elétrons no *FSII* até o centro de reação, que é representado pela diferença entre  $F_m$  e  $F_0$ , resultando na Fluorescência Variável ( $F_v$ ) (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

Como apresentado na Figura 8, para a  $F_v$ , o tratamento com maior concentração de NaCl, apresentaram um decréscimo aos 30 dias de estresse em relação as plantas controle. Não foi possível observar diferença significativa quanto a remoção das vesículas na  $F_v$ , exceto para as plantas irrigadas com maior concentração de sais aos 30 dias, na qual observou-se uma redução de 42% no valor de  $F_v$  das plantas NEs.

Como os valores de  $F_m$ , foram superiores aos de  $F_0$ , a  $F_v$  se manteve alta, não ocasionaram deficiência na fotorredução da quinona A (*QA*) nem no fluxo de elétrons entre os fotossistemas (TATAGIBA et al., 2014).

O rendimento quântico máximo fotoquímico primária, dado pela razão  $F_v/F_m$ , se manteve estável ao longo do tempo, para todos os tratamentos, bem como quanto a remoção parcial dos tricomas, como observado na Figura 9, exceto para as plantas irrigadas com solução de -2,7Mpa que apresentou uma diminuição em relação as demais aos 30 dias.



**Figura 9** –Rendimento Quântico Máximo ( $F_v/F_m$ ) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 7e 30 dias de estresse salino. Letras iguais, minúsculas ao longo do tempo e maiúsculas entre os potenciais, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

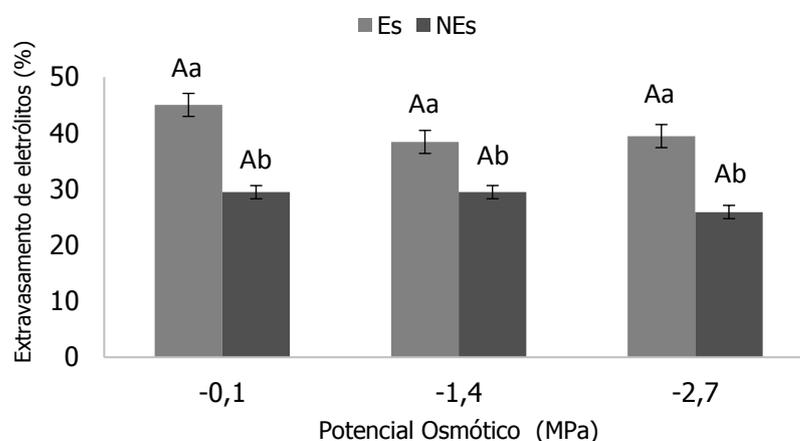
Esse parâmetro é geralmente bem aceito como uma medida para o status dos centros de reação do  $FSII$  (KALAJI et al., 2017). Baixos valores de  $F_v/F_m$  estão relacionados com a redução das taxas de transporte de elétrons, resultando em baixos valores de eficiência quântica do fotossistema II (BACELAR et al., 2007).

Apesar disso, de modo geral, salinidade, bem como a remoção parcial dos tricomas parece não afetar fotoquímica primária do  $FSII$ , como demonstrado pela falta de alteração na  $F_v/F_m$ . Isso é evidenciado nos altos valores de  $F_m$ , uma vez que quanto mais o valor de  $F_v$  se aproxima de  $F_m$ , mais próximo a planta está de seu estado ótimo de realização de fotossíntese (MURCHIE; LAWSON, 2013).

Além disso, alguns autores sugerem que a falta de alteração no parâmetro  $F_v/F_m$  frente a salinidade é resultado de genótipos resistentes nas investigações (MISRA; SRIVASTAVA; STRASSER, 2001; STEFANOV et al., 2016).

### 3.3 Metabolismo antioxidante

Em relação a integridade das membranas, as plantas Es apresentaram valores 50% maiores para o extravasamento de eletrólitos que as plantas NEs (Figura 10).

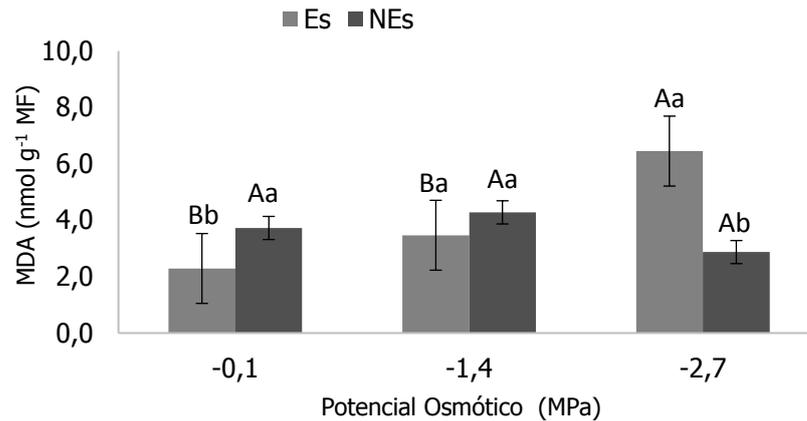


**Figura 10** - Extravasamento de eletrólitos (EE) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O extravasamento de eletrólitos é considerado um sinalizador fisiológico do grau de injúria sob condições de estresse (GAO et al., 2011), e associados ao conteúdo de MDA possibilita a avaliação da peroxidação lipídica da membrana.

Esta variável é um indicador útil da produção de EROs em plantas impostas a condições ambientais adversas, como alta salinidade (RANGANI et al., 2016). Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que as plantas submetidas a escovação podem ser mais propensas a estresse oxidativo.

O conteúdo de MDA aumentou com o incremento das concentrações de NaCl para as plantas Es, em contraste a isto, as plantas NEs mantiveram o conteúdo de MDA mesmo com o incremento da salinidade, não apresentando alterações significativa no nível de peroxidação lipídica medido em termos de conteúdo de MDA (Figura 11), o que sugere que a integridade das membranas celulares foram mantidas, uma vez que não houve acúmulo de radicais livres que levam à peroxidação dos lipídios de membrana.

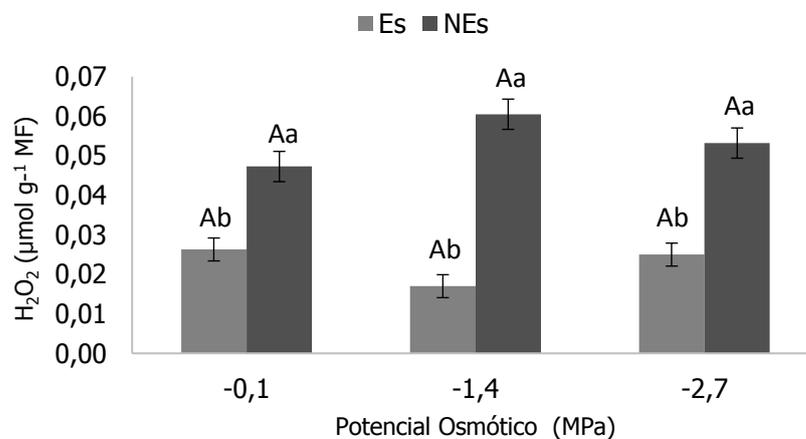


**Figura 11** – Concentração de malondialdeído (MDA) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Resultados semelhantes, de manutenção nos valores de peroxidação lipídica, foram relatados por Rangani et al. (2016) trabalhando com a halófito *Salvadora persica*, submetidas a altas concentrações de NaCl. Panda et al. (2017), investigando a tolerância a salinidade e arsênio da halófito *Suaeda marítima*, sugeriram que esta manutenção seria resultado de um sistema eficiente de eliminação de EROS.

De maneira geral, as plantas de *A. nummularia* submetida a crescentes níveis de salinidade e remoção parcial dos tricomas apresentaram altos valores de peróxido de hidrogênio, variando entre 0,02 a 0,06  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF.

O conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) no presente estudo, foi inversamente proporcional ao extravasamento de eletrólitos, como observado na Figura 12, com um incremento de 50% das plantas NEs sob as Es. Entretanto, com o incremento da salinidade não apresentaram diferença significativa.

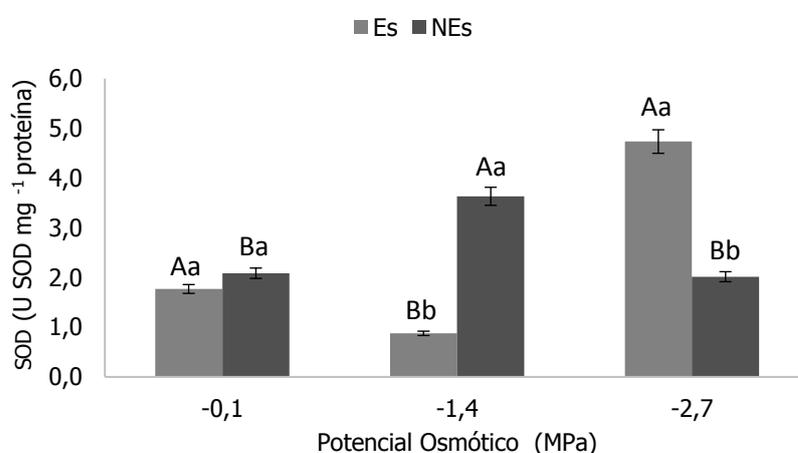


**Figura 12** – Concentração de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O peróxido de hidrogênio é um oxidante muito forte e que pode induzir numerosos efeitos tóxicos em plantas, fazendo-se necessária a remoção rápida e eficiente para evitar seus efeitos nocivos e tóxicos nas plantas (PARVEZ et al., 2020).

A manutenção dos teores de  $H_2O_2$  em halófitas submetidas a salinidade pode ser atribuído aos efeitos cumulativos de ambos os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (PANDA et al., 2017).

Na figura 13, foi observado que a atividade da SOD das plantas submetidas a escovação foi reduzida quando irrigadas com solução de -1,4MPa e aumentadas para as plantas irrigadas com solução de maior salinidade. Para as plantas NEs, o comportamento foi inverso, aumentando para solução de -1,4MPa e diminuindo para solução de -2,7MPa.



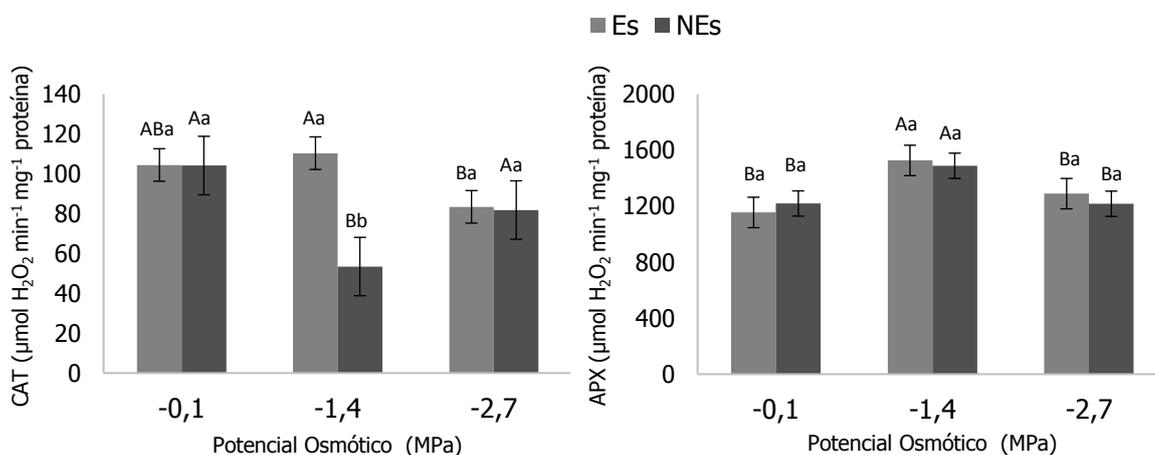
**Figura 13** – Atividade da superóxido dismutase (SOD) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Entre as enzimas antioxidantes, a SOD constitui a primeira linha de defesa contra EROs em plantas (ABBAS et al., 2018). Uma diminuição na sua atividade com o incremento da salinidade, como apresentado para as plantas não escovadas pode ser atribuída uma maior utilização da enzima para sequestrar radicais  $O^{\cdot-}$  ou devido à síntese mínima das isoformas de SOD em altas concentrações de sal (RANGANI et al., 2016).

O produto da atividade de SOD é o  $H_2O_2$ , que é eliminado por conversão em  $H_2O$  em reações subsequentes, sendo regulado por várias enzimas, como a CAT, APX e GPX (DE AZEVEDO NETO et al., 2006).

Nesse estudo, a atividade da CAT permaneceu inalterada tanto para as plantas com tricomas, quanto as com remoção parcial dos tricomas, não apresentando diferença significativa entre si, exceto para as plantas NEs e irrigadas com solução de -1,4MPa, apresentando uma redução de 50% em relação as plantas controle (Figura 14).

Semelhante a atividade da CAT, a APX permaneceu inalterada com o aumento da concentração de NaCl, não diferindo também quanto a remoção dos tricomas. Entretanto, apresentou um aumento de  $300 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína para o tratamento com solução de  $-1,4\text{MPa}$ . Além disso, apesar de apresentarem comportamentos semelhantes, a atividade da APX foi 1100 vezes maior que a CAT.



**Figura 14** – Atividade da catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em plantas de *Atriplex nummularia* escovadas (Es) e não escovadas (NEs) aos 30 dias de estresse salino. Letras iguais, maiúsculas entre os potenciais e minúsculas entre escovações, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Benzati et al.,(2012) estudando estresse salino em *Atriplex portulacoides* inferiu que uma razão para a atividade da CAT se manter inalterada nas folhas é resultado de que a quantidade relatada foi o suficiente para lidar com o estresse imposto ou a desintoxicação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  não depende principalmente de CAT.

Da mesma forma, a atividade de APX em alta salinidade semelhante as plantas controle, sugere que o APX constitutivamente presente na planta pode ser de um nível limiar para desintoxicar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em cloroplastos e citossol (RANGANI et al., 2016\_).

Diante disto, os dados apresentados da atividade da APX sugerem que esta é um dos principais mecanismos adotados pela *Atriplex numulária* na desintoxicação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Uma vez que sua alta atividade da APX parece auxiliar na manutenção do seu potencial redox e diminuir o acúmulo de EROs, evitando danos ao FSII (BENZATI et al.,2012).

#### 4 CONCLUSÃO

As trocas gasosas foram influenciadas reduziram com a elevação das concentrações de NaCl.

A presença dos tricomas são capazes de regular os processos estomáticos de forma que a planta mantenha seu desempenho fotossintético.

A integridade do componente do fotossistema II do cloroplasto das plantas de *A. nummularia* não foi afetada pela salinidade, nem pela remoção dos tricomas.

Resultados da avaliação de extravasamento de eletrólitos, junto com o aumento do conteúdo de MDA sugerem que a remoção parcial das vesículas apresenta maior probabilidade de estresse oxidativo.

Dentre as atividades enzimáticas avaliadas a atividade da APX apresentou-se como um dos principais mecanismos adotados pela *Atriplex nummularia* na desintoxicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 5 REFERÊNCIAS

- ABBAS, Ghulam et al. Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: physiological, biochemical, and molecular aspects. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 1, p. 59, 2018.
- BACELAR, E.A. et al. Physiological behaviour, oxidative damage and antioxidative protection of olive trees grown under different irrigation regimes. **Plant Soil**, v.292 , p. 1–12, 2007.
- BAKER, Neil R.; ROSENQVIST, Eva. 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.
- BENZARTI, Maali et al. Photosynthetic activity and leaf antioxidative responses of *Atriplex portulacoides* subjected to extreme salinity. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 5, p. 1679-1688, 2012.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. GIANNOPOLITIS, Constantine N.; RIES, Stanley K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- DE AZEVEDO NETO, André Dias et al. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, n. 1, p. 87-94, 2006.
- DEINLEIN, U. et al. Plant salt-tolerance mechanisms. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 6, p. 371–379, 2014.
- DIAS, N. S. et al. Efeitos dos sais na planta e tolerância das culturas à salinidade (Salinity effects on plants and tolerance of crops to salinity). **Capítulo de Livro**, v.2, p. 151-162, 2016.
- GAO, Z.; ZHU, H.; GAO, J.; YANG, C.; M.U, C.; WANG, D. Germination responses of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds to various salt-Alkaline mixed stress. **African Journal of Agricultural Research**, v.6, p.3793-3803, 2011.
- GEISSLER, N. et al. Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration leads to different salt resistance mechanisms in a C<sub>3</sub> (*Chenopodium quinoa*) and a C<sub>4</sub> (*Atriplex nummularia*) halophyte. **Environmental and Experimental Botany**, v. 118, p. 67-77, 2015.
- GIANNOPOLITIS, Constantine N.; RIES, Stanley K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GUO, Y. Y. et al. Energy dissipation and antioxidant enzyme system protect photosystem II of sweet sorghum under drought stress. **Photosynthetica**, v. 56, n. 3, p. 861-872, 2018.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HOAGLAND, D. R., & ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. **California agricultural experiment station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

KALAJI, Hazem M. et al. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta physiologiae plantarum**, v. 38, n. 4, p. 102, 2017.

KIANI-POUYA, A. et al. A large-scale screening of quinoa accessions reveals an important role of epidermal bladder cells and stomatal patterning in salinity tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 168, p. 103885, 2019.

KIANI-POUYA, A. et al. Epidermal bladder cells confer salinity stress tolerance in the halophyte quinoa and *Atriplex* species. **Plant, cell & environment**, v. 40, n. 9, p. 1900-1915, 2017.

LITALIEN, A.; ZEEB, B. Curing the earth: A review of anthropogenic soil salinization and plant-based strategies for sustainable mitigation. **Science of the Total Environment**, v. 698, p. 134235, 2020.

LORETO, F; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1781-1787, 2001.

MAXWELL, Kate; JOHNSON, Giles N. Chlorophyll fluorescence a practical guide. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MELO, Hidelblandi F. de; SOUZA, Edivan R. de; CUNHA, Jailson C. Fluorescence of chlorophyll a and photosynthetic pigments in *Atriplex nummularia* under abiotic stresses. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 4, p. 232-237, 2017.

MINHAS, P. S. et al. Coping with salinity in irrigated agriculture: Crop evapotranspiration and water management issues. **Agricultural Water Management**, v. 227, n. October 2019, p. 105832, 2020.

MISRA, Amarendra N.; SRIVASTAVA, Alaka; STRASSER, Reto J. Utilization of fast chlorophyll a fluorescence technique in assessing the salt/ion sensitivity of mung bean and Brassica seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 9, p. 1173-1181, 2001.

MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, p. 208, 2013.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

OLIVEIRA, W. J. et al. Leaf gas exchange in cowpea and CO<sub>2</sub> efflux in soil irrigated with saline water. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 32-37, 2017.

PANDA, Ashok et al. Efficient regulation of arsenic translocation to shoot tissue and modulation of phytochelatin levels and antioxidative defense system confers salinity and arsenic tolerance in the Halophyte Suaeda maritima. **Environmental and Experimental Botany**, v. 143, p. 149-171, 2017.

PARVEZ, Shumaila et al. Effect of salinity on physiological, biochemical and photostabilizing attributes of two genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) exposed to arsenic stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 187, p. 109814, 2020.

RANGANI, Jaykumar et al. Coordinated changes in antioxidative enzymes protect the photosynthetic machinery from salinity induced oxidative damage and confer salt tolerance in an extreme halophyte *Salvadora persica* L. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 50, 2016.

SHABALA, S; BOSE, J; HEDRICH, R. Salt bladders: do they matter?. **Trends in plant science**, v. 19, n. 11, p. 687-691, 2014.

SILVA, E. N. et al. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Arid Environments**, v. 74, n. 10, p. 1130-1137, 2010.

SILVA, F.G. da et al. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas de berinjela sob lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 10, p. 946-952, 2015.

SILVA, J. R. I. et al. Estresse salino como desafio para produção de plantas forrageiras. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science/Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 11, n. 3, 2018.

SILVEIRA, J. A. G. et al. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas (Biomolecular mechanisms involved with resistance to salt stress in plants). **Capítulo de Livro**, v. 2, p. 161-18, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, p. 954, 2013.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TATAGIBA, Sandro Dan et al. Limitações fotossintéticas em folhas de plantas de tomateiro submetidas a crescentes concentrações salinas. **Revista Engenharia Na Agricultura**, v. 22, n. 2, p. 138-149, 2014.

VASQUEZ-TELLO, A.; et al. Electrolyte and Pi Leakages and Soluble Sugar Content as Physiological Tests for Screening Resistance to Water Stress in *Phaseolus* and *Vigna* Species. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, p. 827–832, 1990.

## CONCLUSÕES GERAIS

Parâmetros de relações hídricas avaliados principalmente quando comparado metodologias de obtenção do potencial osmótico evidenciaram que a compartimentalização de íons em tricomas vesiculares de plantas de *Atriplex nummularia* é um mecanismo de sobrevivência de extrema importância na tolerância à salinidade.

O aumento nos valores do módulo de elasticidade das plantas de *Atriplex nummularia* é resultado de uma rigidez da parede celular que auxilia na manutenção do turgor das plantas.

A presença dos tricomas são capazes de regular os processos estomáticos de forma que a planta mantenha seu desempenho fotossintético, demonstrando a influência dos tricomas não apenas na exclusão de sais, mas na dinâmica de morfoanatômica das superfícies foliares.

A remoção parcial dos tricomas vesiculares em *Atriplex nummularia* apresentou uma tendência maior ao estresse oxidativo.

A atividade da APX apresentou-se como um dos principais mecanismos adotados pela *Atriplex nummularia* na desintoxicação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.