



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências – Câmpus de Botucatu/Rio Claro
Seção Técnica de Pós-Graduação



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL (INTERUNIDADES)

SINALIZAÇÃO SISTÊMICA DE SORGHUM BICOLOR (L.) MOENCH EM ESTRESSE SALINO: DO GENE À FISIOLOGIA

PRISCILA PEGORIN

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Interunidades, entre o Instituto de Biociências do câmpus de Botucatu e Instituto de Biociências do câmpus de Rio Claro.

BOTUCATU – SP

2026



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências – Câmpus de Botucatu/Rio Claro
Seção Técnica de Pós-Graduação



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL (INTERUNIDADES)

SINALIZAÇÃO SISTÊMICA DE *SORGHUM BICOLOR* (L.) MOENCH EM ESTRESSE SALINO: DO GENE À FISIOLOGIA

PRISCILA PEGORIN

LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal Interunidades, entre o Instituto de Biociências do câmpus de Botucatu e Instituto de Biociências do câmpus de Rio Claro.

P376s Pegorin, Priscila
Sinalização sistêmica de *Sorghum bicolor* (L.) Moench em estresse salino: do gene à fisiologia / Priscila Pegorin. -- Botucatu, 2026
63 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Luiz Fernando Rolim de Almeida

1. Salinidade. 2. Estresse (Fisiologia). 3. Adaptação (Fisiologia). I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE PRISCILA PEGORIN, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 26 de março de 2026, às 9h, no(a) Sala da Pós- Graduação - Central de Aulas II, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de PRISCILA PEGORIN, intitulada "Sinalização sistêmica de *Sorghum bicolor* (L.) Moench em estresse salino: do gene à fisiologia ". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Gabinete do Reitor e do Vice-reitor / UNESP / Reitoria - RUNESP, Prof. Dr. IVAN DE GODOY MAIA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB, Prof. Dr. GUSTAVO MAIA SOUZA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Botânica / Universidade Federal de Pelotas, Prof. Dr. JOAQUIM ALBENÍSIO GOMES DA SILVEIRA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular / UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, Prof. Dr. DANILO MIRALHA FRANCO (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Animal e Vegetal / Universidade Estadual de Londrina – UEL, Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA

“Quanto maior o obstáculo, mais glorioso é superá-lo.”

(Molière)

Dedico,

Aos meus pais Alcides e Margarete

À minha irmã Marisa

Ao meu afilhado Pedro

Ao meu noivo Leonardo

À minha avó Aparecida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me abençoar e me guiar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado (140261/2022-2).

Aos meus pais, minha irmã, meu noivo e meu afilhado, pelas incontáveis vezes em que o amor de cada um de vocês me trouxe a calma e a esperança que minha mente e meu coração tanto precisavam. Por todo encorajar, pelo apoio, pelas palavras de carinho e por entenderem a minha ausência em vários momentos. Que eu possa continuar dando orgulho em qualquer que sejam os próximos passos. Essa conquista também é de vocês.

À querida Dra. Thayssa Rabelo Schley por estar ao meu lado durante toda a pós-graduação, por ter idealizado junto comigo este projeto intenso, por ter participado ativamente de todas as etapas, sempre me ensinando, apoiando e me direcionando. Mesmo com a distância e com todos os compromissos, você sempre fez questão de se fazer presente, e isso, foi extremamente importante para o meu crescimento como pesquisadora. Obrigada por toda ajuda, pelas experiências compartilhadas, pelo seu empenho, dedicação e comprometimento comigo, por cada ensinamento, por me ouvir e acolher em momentos difíceis, tanto acadêmicos quanto pessoais. Obrigada pela amizade linda que construímos. Você foi um presente em meio a essa caminhada.

Ao professor Dr. Gustavo Maia Souza por ter me acolhido em seu laboratório na UFPel, por toda a sua presença desde o início, por todo o debruçar, esforço e dedicação que este projeto envolveu, por cada ensinamento valioso, por toda ajuda. Foi um prazer poder fazer parte desse universo de sinalização bioelétrica e poder conviver um pouco com o senhor e com os seus alunos. Muito obrigada inclusive ao Thiago e ao Douglas pela acolhida e auxílio.

Ao professor Dr. Ivan de Godoy Maia pela acolhida em seu laboratório no Departamento de Genética – IB, pelo uso da casa de vegetação que possibilitou todo o experimento, pelos recursos, equipamentos e ensinamentos teóricos e práticos para a análise molecular. Obrigada pelo seu cuidado em me acolher e por me fazer sentir parte desse departamento como se eu fosse sua orientada.

Ao Dr. Diego Peres Alonso pelo respaldo metodológico e ajuda em relação a análise molecular, mas principalmente, por sempre estar disponível a cada dúvida ou impasse quando algo não saía como esperado. Muito obrigada por me ensinar na prática que ciência pede por resiliência.

Ao técnico Dr. Luís Paulo Benetti Mantoan por toda ajuda durante o experimento, pelas conversas e apoio constante.

Ao meu amigo Dr. Marcelo Augusto Mendes de Alcântara, pela amizade que construímos, por todas as conversas e desabafos, por todas as risadas, e por todo alívio mental que esses momentos proporcionaram as nossas cabeças.

Ao meu orientador Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida, por ter me aceitado como sua aluna há 6 anos, por acreditar na minha capacidade e por ter me colocado em contato com outros professores, técnicos e discentes que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Botânica e do Departamento de Genética pela amizade e apoio durante esta caminhada.

Aos novos e velhos amigos e colegas de laboratório, pelo incentivo, alegrias e dificuldades compartilhadas e por toda ajuda nas análises e no experimento.

À minha falecida avó Aparecida, por todo encorajar em vida perante este trilhar de escolhas e caminhos. Agora acabou, vovó. Continue me guiando e protegendo de onde estiver. Sinto sua falta todos os dias.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVO GERAL.....	5
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
4.1. <i>Espécie vegetal</i>	6
4.2. <i>Delineamento experimental</i>	6
4.3. <i>Variáveis ecofisiológicas</i>	9
4.4. <i>Análises antioxidantes</i>	12
4.4.1. <i>Prolina</i>	12
4.4.2. <i>SOD (EC 1.15.1.1)</i>	12
4.4.4. <i>POD (EC 1.11.1.7)</i>	12
4.4.5. <i>Proteínas solúveis</i>	13
4.4.6. <i>Peroxidação lipídica</i>	13
4.4.7. <i>Peróxido de hidrogênio</i>	13
4.5. <i>Análise molecular</i>	14
5. ANÁLISE DE DADOS.....	15
6. RESULTADOS.....	16
7. DISCUSSÃO.....	36
8. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	

RESUMO

Plantas podem reter informações associadas a eventos estressantes prévios, ajustando suas respostas sistêmicas por meio de sensibilização e memória do estresse. Contudo, o papel da sinalização bioelétrica na modulação da aclimatação sistêmica adquirida (SAA) sob estresse salino recorrente permanece pouco compreendido. Neste estudo, avaliamos as respostas fisiológicas, bioquímicas, moleculares e eletrofisiológicas de *Sorghum bicolor* exposto a eventos de salinidade únicos e repetidos (120 mM NaCl) atrelado ao uso da técnica de split-root, que permitiu a separação espacial da sinalização de estresse local e sistêmica a partir da salinização seletiva de um ou ambos os compartimentos da raiz. Os resultados demonstraram que o estresse recorrente (S-S) desencadeou um efeito de sensibilização, refletido em aumentos de aproximadamente 43% na transpiração e 46% na condutância estomática, em comparação ao controle (C-C) e aos demais tratamentos. Em contraste, a eficiência do uso da água (A/E) foi quase 90% maior em C-C e em estresse não recorrente (S 2º ciclo – S 2º ciclo) do que em S-S, enquanto a eficiência intrínseca (A/g_s) foi 60% maior em plantas submetidas a estresse não recorrente em comparação com S-S. A atividade da SOD em S-S foi 50% superior à observada nos grupos submetidos a estresse não recorrente, enquanto a atividade da POD em S 2º ciclo – S 2º ciclo superou em 175% aquela registrada em S-S. A expressão de *APX1* foi significativamente reduzida em S-S. Análises eletrofisiológicas evidenciaram respostas precoces e transitórias sob estresse recorrente, com $ApEn$ atingindo $\sim 0,6$ nos primeiros 10 minutos após o estímulo e DFA estabilizando em torno de 1,0. Em contraste, o estresse não recorrente promoveu respostas tardias (>60 min), menor complexidade dos sinais elétricos ($ApEn \sim 0,2$) e valores de DFA mais elevados ($>1,5$). De forma integrada, a combinação do split-root, da eletrofisiologia e da biologia molecular, fornece evidências de uma memória dinâmica baseada no electroma que aprimora a aclimatação ao estresse.

Palavras-chave: Salinidade, sinalização, tecido sistêmico, tolerância.

ABSTRACT

Plants can retain information associated with previous stressful events, adjusting their systemic responses through sensitization and stress memory. However, the role of bioelectrical signaling in modulating systemic acquired acclimation (SAA) under recurrent saline stress remains poorly understood. In this study, we evaluated the physiological, biochemical, molecular, and electrophysiological responses of *Sorghum bicolor* exposed to single and repeated salinity events (120 mM NaCl) using the split-root, which allowed the spatial separation of local and systemic stress signaling from the selective salinization of one or both root compartments. The results demonstrated that recurrent stress (S-S) triggered a sensitization effect, reflected in increases of approximately 43% in transpiration and 46% in stomatal conductance, compared to the control (C-C) and other treatments. In contrast, water use efficiency (A/E) was almost 90% higher in C-C and under non-recurrent stress (S 2nd cycle – S 2nd cycle) than in S-S, while intrinsic efficiency (A/g_s) was 60% higher in plants subjected to non-recurrent stress compared to S-S. SOD activity in S-S was 50% higher than that observed in groups subjected to non-recurrent stress, while POD activity in S 2nd cycle – S 2nd cycle exceeded that recorded in S-S by 175%. *APX1* expression was significantly reduced in S-S. Electrophysiological analyses showed early and transient responses under recurrent stress, with ApEn reaching ~0.6 in the first 10 minutes after the stimulus and DFA stabilizing around 1.0. In contrast, non-recurrent stress promoted delayed responses (>60 min), lower complexity of electrical signals (ApEn ~0.2), and higher DFA values (>1.5). Taken together, the combination of split-root, electrophysiology and molecular biology provides evidence of a dynamic electrome-based memory that enhances stress acclimation.

Keywords: Salinity, signaling, systemic tissue, tolerance.

1. INTRODUÇÃO

A salinidade afeta as plantas inicialmente por estresse osmótico de curta duração, que evolui para o acúmulo de íons fitotóxicos a longo prazo (Ullah et al., 2021). Este estresse osmótico induzido decorre da absorção de sais e consequentemente da diminuição do potencial hídrico ao redor da zona radicular, o que diminui a condutividade da água nas células, levando à desidratação e ao comprometimento do crescimento vegetal (Munns, 2005; Abbasi et al., 2016; Balasubramaniam et al., 2023). Sob exposição prolongada à elevada salinidade, verifica-se além do acúmulo de íons tóxicos e o desequilíbrio iônico, o prejuízo na absorção dos nutrientes e a interrupção de processos metabólicos essenciais, como a síntese de proteínas, reações enzimáticas e funções ribossômicas (Isayenkov & Maathuis, 2019; Arif et al., 2020; Mushtaq et al., 2020; Alkharabsheh et al., 2021), provocando danos à morfologia e fisiologia, inibindo a fotossíntese e desencadeando estresse oxidativo (Munns & Tester, 2008; Hasanuzzaman et al., 2021).

Entretanto, quando o estresse ocorre de maneira recorrente, o organismo pode adquirir resistência a eventos subsequentes (Bruce et al., 2007; Pastor et al., 2013), bem como desenvolver uma resposta aprimorada frente a condições ambientais adversas (Amaral et al., 2020a,b). Esse processo baseia-se na capacidade das plantas de estabelecer algum tipo de “memória do estresse”, a qual é definida como a habilidade de responder de forma mais eficiente e/ou mais rápida quando novamente expostas ao estímulo estressor (Avramova, 2015; Crisp et al., 2016; Fleta-Soriano & Munné-Bosch, 2015; Galviz et al., 2020; Calvo et al., 2020; Mantoan et al., 2020; Segundo-Ortin & Calvo, 2022; Rossatto et al., 2023; Pegorin et al., 2025).

Dessa forma, vias de sinalização sistêmica foram desenvolvidas pelas plantas permitindo a comunicação de diferentes sinais de estresse, partindo de uma parte específica da planta que detecta o estresse (tecido local), para toda a planta (sistêmico) em minutos (Kollist et al., 2019; Devireddy et al., 2018). Essa resposta sistêmica, denominada como aclimação sistêmica adquirida (*systemic acquired acclimation* - SAA), promove a ativação de mecanismos de aclimação (Karpinski et al., 1999) e é fundamental para a sobrevivência da planta sob condições de estresse abiótico (Suzuki et al., 2013; Devireddy et al., 2018; Zandalinas et al., 2019, 2020), uma vez que tecidos não diretamente expostos ao estresse local tornam-se capazes de resistir a tais condições estressantes (Suzuki et al., 2013; Zandalinas et al., 2019, Devireddy et al., 2018). A SAA é regulada por sinais sistêmicos de propagação rápida, como as espécies reativas de oxigênio (ERO), sinais elétricos, cálcio e ondas

hidráulicas, sendo transportados em minutos e mediados via sinalização elétrica (Fromm & Lautner, 2007; Zimmermann et al., 2009; Suzuki et al., 2013; Fichman & Mittler, 2020).

As ERO atuam como importantes moléculas de transdução de sinal nas respostas sistêmicas das plantas a diversos estresses abióticos, propagando-se de célula à célula por longas distâncias, conhecido como ondas de ERO (Miller et al., 2009; Gilroy et al., 2016; Choi et al., 2017; Zandalinas & Mittler, 2018; Fichman et al., 2019; Fichman & Mittler, 2020). Essas ondas de ERO desempenham um papel fundamental na coordenação de respostas metabólicas sistêmicas (Choudhury et al., 2018), na ativação de redes transcricionais fundamentais para a aclimação vegetal (Zandalinas et al., 2019) e na coordenação de respostas fisiológicas sistêmicas, como a modulação da abertura estomática (Devireddy et al., 2018, 2020). Estudos anteriores demonstraram que as ondas de ERO são determinantes no processo de aclimação bem-sucedida frente a estresses térmico e luminoso (Suzuki et al., 2013; Devireddy et al., 2018; Zandalinas et al., 2019, 2020).

Os sinais elétricos exercem um papel central na transmissão rápida de informações, os quais estão intimamente relacionados aos processos fisiológicos por meio da atividade elétrica espontânea (Fromm et al., 2013). No momento em que a planta é exposta a estímulos internos ou externos, ocorrem desequilíbrios iônicos através das membranas plasmáticas, resultando em variações de voltagem, decorrentes do fluxo de íons através de canais e bombas eletrogênicas (Johns et al., 2021; Huber & Bauerle, 2016). O ramo de estudos que se dedica a investigação de como essas perturbações elétricas afetam a fisiologia vegetal é conhecido como eletrofisiologia.

A onda de ERO encontra-se estreitamente interligada à sinalização elétrica por meio da atuação de canais de receptores de glutamato (GLRs) e de outros canais iônicos capazes de promover a despolarização de membrana, regulando assim os sinais elétricos. Esse processo pode intensificar a ativação da proteína homóloga D da oxidase do surto respiratório, cuja propagação da onda de ERO depende da sinalização de Ca^{2+} . Da mesma forma, a onda de Ca^{2+} associa-se aos sinais elétricos por intermédio de GLRs e canais de dois poros (TPC1). Sendo assim, essas três ondas — ERO, Ca^{2+} e sinais elétricos — podem se amplificar e se modular mutuamente, auxiliando a transmissão sistêmica de sinais de estresse (Gilroy et al., 2016; Yu et al., 2022).

Os genes *APX1* e *APX2* foram estabelecidos como marcadores da aclimação sistêmica adquirida (SAA) (Szechyńska-Hebda et al., 2017). Em particular, o gene ascorbato peroxidase 1 citosólica (*APX1*) é induzido em resposta ao estresse (Rizhsky et al., 2004). A *APX1* atua na regulação dos níveis de H_2O_2 e na sinalização dependente de H_2O_2 (Asada, 1999; Apel & Hirt, 2004), sendo expressa em diversos tecidos vegetais, inclusive na ausência

de estresse (Pnueli et al., 2003). Diferentemente, a *APX2* é tipicamente induzida por diferentes tipos de estresse (Panchuk et al., 2002; Chang et al., 2004; Mullineaux et al., 2006). Adicionalmente, estudos mostraram que a *APX1* executa um papel crucial na proteção dos cloroplastos contra ERO, de modo que, na ausência dessa enzima, a capacidade de desintoxicação de ERO nos cloroplastos é significativamente comprometida (Davletova et al., 2005; Mittler, 2006).

Para avaliar os efeitos da sinalização de longa distância induzida pelo estresse salino em plântulas de *Sorghum bicolor*, adotamos o método de split-root, uma abordagem eficiente que discrimina respostas locais e sistêmicas das plantas frente a condições estressantes (Torres et al., 2021). Este sistema possibilita a aplicação de diferentes tratamentos em porções distintas do sistema radicular, compartilhando a mesma parte aérea (Larrainzar et al., 2014; Saiz-Fernández et al., 2021). Embora alguns estudos tenham investigado o estresse salino usando o método de split-root (Redwan et al., 2017; Zhang et al., 2019), a pesquisa sobre esse tópico ainda é limitada.

Uma lacuna significativa na compreensão da natureza e função das respostas sistêmicas ao estresse em plantas, especialmente em condições de estresse salino recorrente, ainda existe. Ademais, ainda não está claramente estabelecido como as ascorbato peroxidases 1 e 2 (*APX1* e *APX2*) atuam na proteção das plantas durante o estresse salino em sorgo, dado que seus perfis de expressão frequentemente oscilam entre regulação positiva e negativa. Em paralelo, a eletrofisiologia permanece amplamente inexplorada nesse contexto, com diferentes estudos nas espécies de feijão (de Toledo et al., 2024), tomate (Reissig et al., 2023), trigo (Yudina et al., 2023), ervilha (Sukhov et al., 2015), mas ainda inexistentes especificamente para *Sorghum bicolor*. Nesta proposta, os aspectos eletrofisiológicos foram investigados sob a perspectiva do electroma, entendido como a atividade bioelétrica integrada da planta como um todo (de Toledo et al., 2019; Kozlova et al., 2025).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi verificar se o estresse salino de 120 mM de 24 horas induz SAA em *Sorghum bicolor* (L). Moench.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar as respostas sistêmicas fisiológicas, antioxidantes, elétricas e a expressão dos genes *APX1* e *APX2* em *Sorghum bicolor* (L). Moench submetido a estresse salino recorrente e não recorrente, avaliando se a SAA é desencadeada a partir da onda de ERO.

Adicionalmente, por meio da aplicação da técnica de split-root, investigar se a sinalização sistêmica difere quando o estresse é imposto a apenas um ou a ambos os compartimentos do sistema radicular.

Nossa hipótese é que o estresse salino desencadeie respostas sistêmicas rápidas, promovendo alterações na fisiologia e na sinalização elétrica das plantas, com acúmulo de ERO e aumento da expressão dos genes previamente citados, culminando no desenvolvimento de mecanismos de tolerância e aclimatação. Além disso, espera-se que as respostas avaliadas diferenciem-se entre plantas submetidas ao estresse em ambos os compartimentos do sistema radicular e aquelas expostas ao estresse em apenas um dos lados da raiz.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Espécie vegetal

A espécie escolhida foi o *Sorghum bicolor* (L.) Moench, em decorrência da sua tolerância à estresses abióticos, como a seca e a salinidade (Marsalis et al., 2010).

4.2. Condições de crescimento

As sementes de *Sorghum bicolor* (L.) Moench foram adquiridas em parceria com a Embrapa. A germinação das sementes ocorreu em casa de vegetação, possuindo sistema semi controlado com umidade relativa do ar de 50 - 70%, temperatura de 25 - 29°C e DFFF até 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no Instituto de Biotecnologia (IBTEC), UNESP - Campus de Botucatu/SP (coordenadas geográficas: 22°53'11.3"S 48°29'15.4"O). No vigésimo dia, as plântulas foram transferidas para o Instituto de Biociências de Botucatu (IBB – Unesp), para o departamento de Genética, sendo mantidas em uma sala climatizada adaptada com placas de led e ar-condicionado, apresentando temperatura variável entre 29°C e 33°C, umidade entre 45 -50% e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) próximo a 1000 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$. As mudas foram transplantadas para vasos de 500 ml com vermiculita expandida tipo médio e irrigadas com solução nutritiva nº 2 de Hoagland e Arnon (1950) com 25% de força iônica por 4 dias. Posteriormente essa força foi aumentada gradativamente até atingir 100% de força iônica, apresentando condutividade elétrica variável conforme a concentração utilizada (50% de força = 1,2 mS/cm; 100% de força iônica = 2,4 mS/cm de condutividade elétrica), enquanto o pH foi mantido entre 5,7 à 6,2. A condutividade elétrica foi medida com um condutivímetro (AK52 - Akso) e o pH aferido com um medidor de pH (AK90 – Akso).

O período total de aclimatação foi de três semanas, sendo que, apenas na terceira semana, foi aplicada a técnica de split-root. Para isso, o sistema radicular das plântulas foi cuidadosamente separado em dois vasos independentes (Figura 1), permitindo a aplicação de tratamentos distintos em cada compartimento radicular, enquanto a parte aérea permanecia

compartilhada. Essa técnica é amplamente utilizada para a distinção entre mecanismos de regulação local e sistêmica em plantas (Larrainzar et al., 2014).

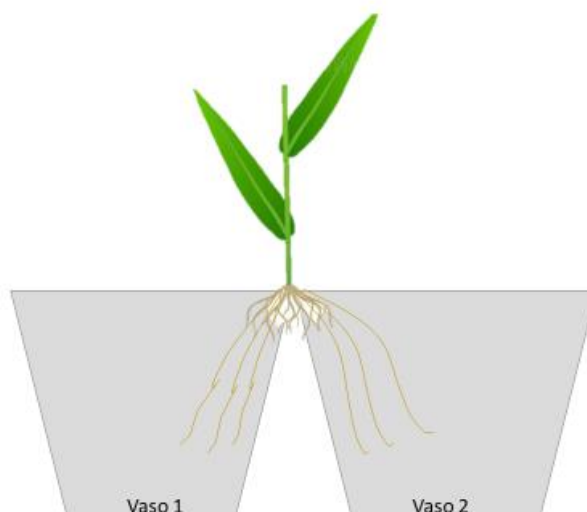


Figura 1: Modelo experimental da técnica de split-root aplicada nas plântulas de *Sorghum bicolor*, separando as raízes em dois vasos.

O modelo experimental adotado consistiu na aplicação de 0,7 g de cloreto de sódio (NaCl; massa molar = 58,44 g/mol), diluídos em 100 mL de solução, para indução do estresse salino na concentração final de 120 mM nas plantas correspondentes. Experimentos preliminares foram conduzidos para a definição da dosagem de NaCl, além de estudos prévios reportarem a utilização bem-sucedida de 120 mM de NaCl em *Sorghum bicolor* (Rajabi et al., 2024; Umair Hassan et al., 2024; Punia et al., 2021a,b). Após a aplicação do tratamento salino, a condutividade elétrica da solução ultrapassou 4 mS cm⁻¹, valor máximo de leitura suportado pelo condutivímetro utilizado (AK52 – Akso), impossibilitando a determinação exata da condutividade elétrica associada ao estresse salino imposto.

4.3. Tratamentos

O delineamento experimental compreendeu cinco tratamentos (Figura 2), dos quais dois foram submetidos ao estresse salino recorrente, caracterizado pela exposição das plantas a dois eventos consecutivos de salinidade. Outros dois tratamentos foram submetidos apenas ao segundo evento de estresse, configurando estresse não recorrente, enquanto um tratamento permaneceu como controle. Os tratamentos que configuram plantas estressadas, seja estresse salino recorrente quanto não recorrente, foram subdivididos em grupos nos quais apenas um dos compartimentos do sistema radicular foi exposto ao sal e grupos em que ambos os

compartimentos radiculares foram submetidos ao estresse. De forma mais detalhada, as plantas foram separadas por sorteio e subdivididas em:

1º Tratamento: C – C (Controle - Controle): Ambos os vasos receberam exclusivamente a solução nutritiva ao longo de todo o experimento, sem a aplicação de estresse salino.

2º Tratamento: C - S (Controle – Estresse salino): No vaso 1 foi aplicado exclusivamente a solução nutritiva, enquanto o vaso 2 teve a solução nutritiva suplementada com 120 mM de NaCl, sendo este compartimento submetido a dois eventos consecutivos de estresse salino.

3º Tratamento: S - S (Estresse salino – Estresse salino): Ambos os vasos tiveram a solução nutritiva suplementada com 120 mM de NaCl, sendo submetidos a dois eventos consecutivos de estresse salino.

4º Tratamento: C – S 2º ciclo (Controle – Estresse salino 2º ciclo): No vaso 1 foi aplicado exclusivamente a solução nutritiva, enquanto o vaso 2 teve a solução nutritiva suplementada com 120 mM de NaCl, sendo submetido exclusivamente ao segundo evento de estresse salino.

5º Tratamento: S 2º ciclo – S 2º ciclo (Estresse salino 2º ciclo – Estresse salino 2º ciclo): Ambos os vasos tiveram a solução nutritiva suplementada com 120 mM de NaCl, sendo submetidos exclusivamente ao segundo evento de estresse salino.

Entre os dois ciclos de estresse, as plantas passaram por um período de recuperação, retornando à condição não estressada. Para isso, 24 horas após a aplicação do primeiro evento salino (exclusivamente nas plantas destinadas ao estresse recorrente), o substrato foi substituído por vermiculita nova e as raízes foram cuidadosamente lavadas com água, visando à remoção do excesso de sal. A partir da troca do substrato, as plantas passaram a ser irrigadas com solução nutritiva, condição que foi mantida por três dias.

Após esse período de recuperação, o estresse salino foi reaplicado e, decorridas 24 horas da segunda aplicação, foram realizadas as medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, bem como as coletas de material vegetal para as análises bioquímicas e moleculares, encerrando o experimento. Os tempos de exposição ao estresse e os parâmetros avaliados foram definidos com base em experimentos preliminares. O experimento foi conduzido com 25 plantas por tratamento, totalizando cinco repetições por tratamento.

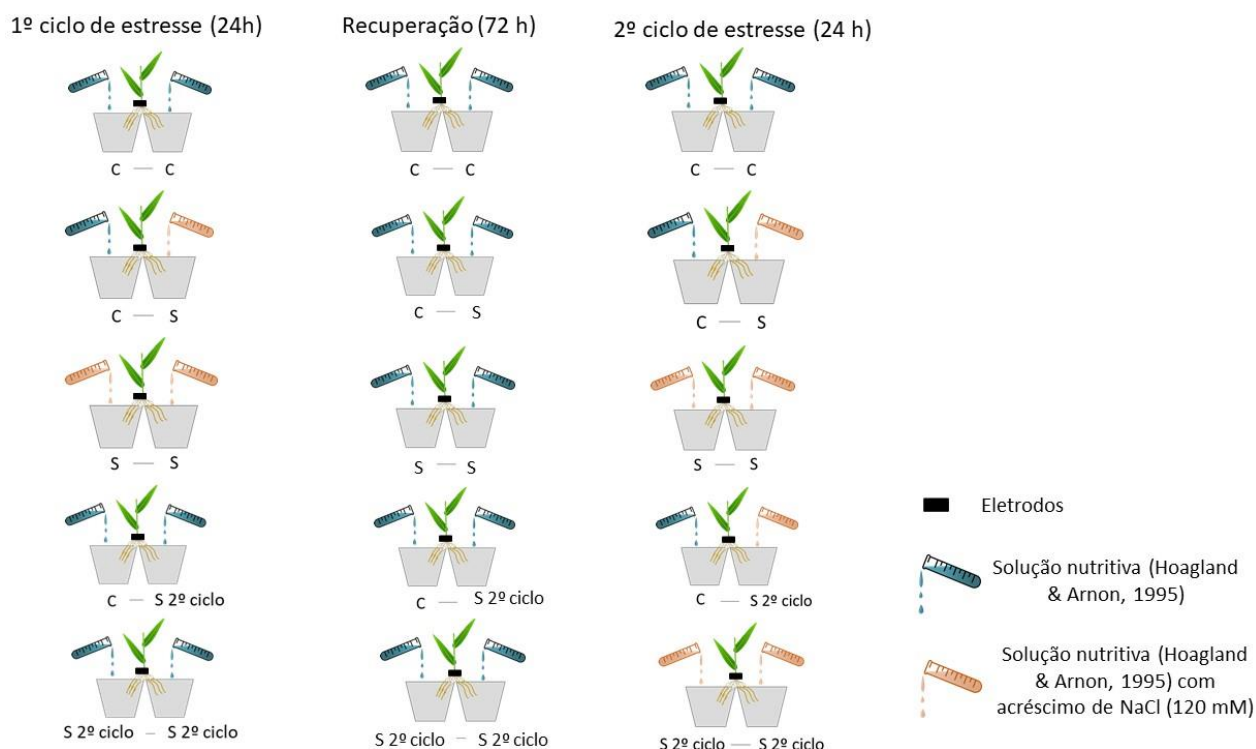


Figura 2: Delineamento experimental dos tratamentos, aplicações do primeiro e segundo ciclo de estresse salino e recuperação das plantas de *Sorghum bicolor*. O local de inserção dos eletrodos (caules das plantas) para a medição das análises de eletrofisiologia também é ilustrado nesta imagem.

4.4. Variáveis ecofisiológicas

Trocas gasosas: Geradas pelo equipamento com sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO₂ e vapor d'água por radiação infra-vermelha (Infra Red Gas Analyser – IRGA – modelo GSF 3000, Walz, Alemanha). Realizamos as medidas entre 10:00 e 11:00 horas da manhã em dia ensolarado, selecionando uma planta de cada repetição (totalizando cinco repetições), nas quais escolhemos e padronizamos as 2ª ou 3ª folhas com limbo totalmente expandido. Medimos a taxa de transpiração (E , mmol H₂O m⁻² s⁻¹), condutância estomática (g_s , mol m⁻² s⁻¹), taxa de assimilação de CO₂ (A_{Net} , μmol m⁻² s⁻¹), na intensidade de 1500 μmol/m²s de densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF). Calculamos a eficiência do uso da água (A/E , μmol CO₂ mmol⁻¹ H₂O) e a eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s , μmol CO₂ mol⁻¹ H₂O).

Fluorescência da clorofila *a*: As folhas foram cobertas com papel alumínio e mantidas no escuro durante aproximadamente 30 minutos, antes de obtermos as variáveis da fluorescência da clorofila *a* com auxílio do IRGA. Calculamos a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), rendimento quântico efetivo do PSII ($\Phi_{PSII} = \Delta F/F_m'$), taxa de transporte

de elétrons ($ETR = \Delta F/F_m' \times DFFF$), dissipação fotoquímica [$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$] e a dissipação não-fotoquímica [$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$] (Maxwell & Johnson, 2000).

Sinais elétricos - eletrofisiologia: Foram monitorados 10 eletrofitogramas distribuídos, sendo dois sensores para cada tratamento. No caule das plantas selecionadas, foram colocadas fitas metálicas e garras jacarés para a condução dos sinais. As mudas que receberam os sensores ficaram por 24 horas em aclimação após a instalação, como recomendado, descartando qualquer possibilidade do estresse mecânico gerar qualquer sinal elétrico. Os sensores bioelétricos utilizados foram desenvolvidos no Laboratório de Cognição e Eletrofisiologia Vegetal (LACEV) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) em parceria com a Stoller do Brasil Ltda. A taxa de captação de sinais de variação de microvoltagem (μV) utilizada no estudo foi de 50 Hz. A captura do sinal elétrico foi feita mediante o uso dos programas Arduino IDE e CoolTerm. A análise dos dados foi realizada em colaboração com o LACEV.

Os sinais bioelétricos foram registrados uma hora antes e três horas após a aplicação do estresse salino, tanto no primeiro quanto no segundo ciclo de estresse. Entretanto, apenas os dados referentes ao segundo ciclo de estresse salino foram incluídos nos gráficos de eletrofisiologia. Ressalta-se que, nos tratamentos C-C, C-S e C-S 2º ciclo, no momento correspondente à aplicação do estresse salino, as plantas que não receberam NaCl em um dos compartimentos radiculares ou em nenhum deles (C-C), receberam exclusivamente solução nutritiva.

Caracterização dos dados

Foi empregado o método de Análise da Dispersão das Características no Tempo (*Time Dispersion Analysis of Features* - TDAF) a fim de dividir as séries temporais em unidades menores. O TDAF utiliza todas as séries temporais registradas, realizando sua sincronização e repartição de forma perfeitamente alinhada. Para cada segmento temporal obtido, a análise de interesse é calculada e, ao final de cada recorte, é atribuída uma marcação temporal única e comum a todas as séries. Ao final, todas as marcações são reunidas e ordenadas temporalmente. Assim, cada repartição reúne as informações analisadas de todas as séries (Costa et al., 2023). A partir dessa abordagem, foram calculados:

- FFT (Transformada Rápida de Fourier - Fast Fourier Transform): técnica computacional derivada da Discrete Fourier Transform (DFT), utilizando as Séries de

Fourier e sua generalização para obter frequências de um sinal (Stone, 2007). Para este trabalho, foram utilizados o algoritmo de Bluestein (Bluestein, 1970) e o algoritmo rfft da biblioteca SciPy (Virtanen et al., 2020). Para a geração das características, foram calculados a média, o valor máximo, o valor mínimo e a variância da FFT. A frequência foi obtida pela FFT.

- ApEn (Entropia Aproximada - Approximate Entropy): mensura a regularidade e a imprevisibilidade dos dados em uma série temporal (ST). Valores menores indicam maior regularidade e processos fisiológicos mais comprometidos, enquanto valores maiores indicam dinâmicas mais irregulares e complexas (Pincus, 1991; Souza et al., 2005). Para a geração da característica, foi utilizado o método app entropy da biblioteca antropy (Richman & Moorman, 2000; Schiratti et al., 2018).

- Análise de DFA (Análise de Flutuação Destendenciada - Detrended Fluctuation Analysis): Desenvolvida por Peng et al. (1995) ao analisar alterações nos expoentes de escala que identificaram doenças cardíacas em ST de eletrocardiograma, essa análise calcula a estimativa da escala de uma lei de potência (expoente de Hurst), sendo capaz de calcular a autocorrelação de uma ST e assim, indicar seu índice de memória de longo e curto prazo. O cálculo de DFA retorna valores de α que variam da seguinte forma: $\alpha < 1$ o sinal é estacionário, logo pode ser modelado como ruído fracionário gaussiano; $\alpha = 0.5$ indica ausência de correlação ou "memória", identificando um sinal ruidoso; $0.5 > \alpha < 1$ corresponde a um sinal com memória com correlação positiva; e para $\alpha < 0.5$ a correlação é negativa; $\alpha > 1$ o sinal é não estacionário e pode ser modelado como movimento browniano fracionado como $H = \alpha - 1$ (Hardstone et al., 2012). A característica foi gerada usando o método dfa da biblioteca nolds;

- Expoentes de Lyapunov: método de quantificação do nível de imprevisibilidade na série. Descreve a taxa de separação de duas trajetórias infinitesimalmente próximas de um sistema dinâmico no espaço de fase. Para seu cálculo é necessário o sistema Jacobiano. O algoritmo de Eckmann (1987), portanto, tenta estimar este Jacobiano reconstruindo a dinâmica do sistema a partir do qual a ST foi obtida.

4.5. Análises antioxidantes

4.5.1. Prolina

O nível de L-prolina foi determinado com teste de colorímetro, de acordo com o método descrito por Bates et al. (1973). Para isso, o extrato bruto (1,0 mL) foi misturado com ninidrina ácida (1,0 mL) e ácido acético glacial (1,0 mL), sendo a mistura aquecida por 60 minutos e, posteriormente, resfriada em banho de gelo. A mistura de reação foi extraída com 4 mL de Tolueno, com agitação em *vortex* por 30 segundos. As leituras de absorbância foram realizadas a 520 nm, utilizando L-prolina p.a. A quantificação do teor de prolina foi realizada por comparação com uma curva padrão construída a partir de concentrações variando entre 20 e 100 µg de L-prolina p.a.

4.5.2. SOD (EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método proposto por Beauchamp e Fridovich (1971), citados por Bor et al. (2003). O sistema de reação foi composto de 30 µL de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 50 mmol/L⁻¹ (pH 7,8), mistura “nitroblue tetrazolium” (NBT) 33 µmol/L⁻¹ + EDTA 0,66 mmol.L-1 (5:4) e mistura L-metionina 10 mmol/L⁻¹ + riboflavina 3,3 mol/L⁻¹ (1:1), totalizando um volume de 3,0 mL. Após a exposição dos tubos à iluminação por dez minutos a 25°C, a redução do NBT a “blue formazan” foi medida por leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 560 nm. A atividade da SOD foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U mg⁻¹ de proteína), sendo uma unidade (U) correspondente à quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a razão de redução do NBT.

4.5.4. POD (EC 1.11.1.7)

A atividade da peroxidase (POD) foi determinada de acordo com o método descrito por Teisseire e Guy (2000). O sistema de reação foi composto de 30 µL de extrato enzimático diluído (1:10 em tampão de extração); tampão fosfato de potássio 50 mmol/L⁻¹ (pH 6,5); pirogalol (1,2,3-benzenotriol) 20 mmol/L⁻¹ e peróxido de hidrogênio H₂O₂ 5 mmol/L⁻¹ totalizando 1,0 mL. A reação foi conduzida à temperatura ambiente por 5 minutos. A formação de purpurogalina foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,5 mmol L⁻¹ cm⁻¹ para o cálculo da atividade enzimática. A atividade da POD foi expressa em µmol de purpurogalina min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, sendo o teor de proteínas solúveis totais determinado pelo método descrito por Bradford (1976).

4.5.5. Proteínas solúveis

O conteúdo de proteínas solúveis totais descrito por Bradford (1976) foi dissolvido 100mg de *comassie brilliant blue* G-250 em 50 ml de etanol 95%, seguido da adição de 100 ml de ácido fosfórico 85%. A solução foi dissolvida em H₂O deionizada até completar 1 L, agitada e filtrada duas vezes em papel filtro. O meio de reação utilizado para determinar o conteúdo de proteínas foi formado pela adição de 2.5 mL da solução de Bradford em tubos de ensaio de 5 mL contendo 50 µL do extrato bruto descrito anteriormente. Após 15 minutos de reação em temperatura ambiente, o meio de reação foi levado para a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm utilizando cubeta de vidro. Para o branco do equipamento, utilizamos a solução de Bradford sem o extrato bruto. A concentração de proteínas foi determinada por meio de curva padrão utilizando concentrações conhecidas de caseína (0, 20, 40, 60, 80 e 100 µg µl⁻¹). Os resultados obtidos foram utilizados para calcular a atividade específica das enzimas antioxidantes.

4.5.6. Peroxidação lipídica

A determinação do nível de peroxidação lipídica foi realizada de acordo com o método descrito por Heath e Packer (1968), conforme citado por Devi e Prasad (1998). O material vegetal foi moído em 5 ml de 0,25 de ácido tiobarbitúrico (TBA) em 10% de TCA, incubados a 95° C em banho-maria por 1 hora. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e a absorbância do sobrenadante foi determinada em 560 e 600 nm. Para os cálculos utilizamos o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (155 mmol.L⁻¹.cm⁻¹), sendo os resultados expressos como (TBARS).g⁻¹ de massa fresca (MF).

4.5.7. Peróxido de hidrogênio

O H₂O₂ foi obtido pelo método determinado por Alexieva et al. (2001). Para a extração do H₂O₂ foliar, foram utilizados 200 mg de tecido foliar macerado juntamente com 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. O material foi centrifugado (12.000 rcf) a temperatura ambiente por 15 minutos, em que, 500 µl do sobrenadante foi adicionado a uma solução composta por 500 µl de tampão de fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0) e 2 ml de iodeto de potássio a 1 M, posteriormente incubados no escuro por uma hora em temperatura ambiente. Utilizamos o espectrofotômetro no comprimento de onda 390nm para as leituras de absorbância. Para calcular o conteúdo de H₂O₂ foi utilizado uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de H₂O₂, cujos resultados foram expressos como µM de H₂O₂ g⁻¹ de MF.

4.6. Análise molecular

Os genes *APX1* e *APX2* foram selecionados em *Sorghum bicolor* com base em estudos prévios (Akbudak et al., 2018). Para as análises de expressão gênica, foram coletadas as folhas de cinco plantas por tratamento com o limbo totalmente expandido, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento da extração.

Isolamento e quantificação do RNA total: O isolamento do RNA total foi realizado utilizando TRIzol e em seguida, o RNA presente nas amostras foi quantificado com NanoDrop. A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com SYBR Green, utilizando tampão de corrida e submetido a tensão constante de 120 V.

Síntese de cDNA: Utilizamos o RNA total (1000ng/uL) como input para o tratamento com DNase (RQ1 DNase, Promega). A síntese do cDNA foi realizada com o High Capacity cDNA kit (Thermo Fisher) sendo adicionado ao RNA 0,8μL de dNTP Mix (100 mM), 2μL de primer randômico, 2μL de 10x RT Buffer, 4,2μL de H₂O nuclease free e 1 μL da enzima MultiScribe™ Reverse Transcriptase, exatamente nessa ordem. As reações foram incubadas a 25°C por 10 minutos, em seguida a 37°C por 120 minutos e finalizamos aquecendo a 85°C por 5 min, seguida do resfriamento a 4°C. Por fim, tratamos o nosso cDNA com 1μL RNase H e incubamos a 37° por 20 minutos. Armazenamos as reações a -20°C .

RT-qPCR: Realizamos as reações de amplificação qPCR com o volume final. Foram utilizados 17,5μL da enzima GoTaq qPCR mastermix (Promega), 2,4 μL de dimetilsufóxido (DMSO), 0,3μL de Primer FW e 0,3μL Primer RV dos genes *APX1*, *APX2*, *EIF4-α* e *PP2A* e completamos com 9,5μL de água nuclease free. Na montagem das placas foi adicionado 10μL do mix e 1μL de cDNA puro. A amplificação ocorreu em termociclador StepOne™ Software v2.3 (Applied Biosystems). A amplificação foi programada 95°C por 10 min e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C. Todas as reações ocorreram em triplicatas técnicas e tiveram uma amostra controle contendo somente água nuclease free. A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak & Schmittgen, 2001), com *PP2A* e *EIF4-α* sendo utilizados como genes de referência, assim como em Reddy et al. (2016). Detalhes de todos os primers utilizados para PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR) são fornecidos na tabela 1. Os valores de Ct foram convertidos em quantidades relativas normalizadas utilizando o software qBase v1.3.5 (Hellemans et al., 2007).

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos dos primers específicos dos genes *APX1* e *APX2* e dos genes endógenos *PP2A* (*Serina/treonina-Proteína Fosfatase*) e *EIF4- α* (*Fator de Iniciação Eucariótica 4 α -1*) referenciados em Reddy et al. (2016).

Primer	Sequência	Tm (°C)	GC %
APX1 FW	5'- AGAGCGGTCTGGTTTTGAGG -3'	59.9	55.0
APX1 RV	5'- GAGCTTGAGGTGGGCTTCTT -3'	59.9	55.0
APX2 FW	5'- GGTCACACCCTGGGAAGATG -3'	60.0	60.0
APX2 RV	5'- GGCGGAAGGATGGATCAGAG -3'	59.9	60.0
PP2A FW	5'-AACCCGCAAAACCCAGACTA-3'	61.9	52.3
PP2A RV	5'-TACAGGTCTGGGCTCATGGAAC-3'	61.8	57.1
EIF- 4 α FW	5'-CAACTTTGTACCCGCGATGA-3'	61.4	52.3
EIF- 4 α RV	5'-TCCAGAAACCTTAGCAGCCCA-3'	61.3	52.3

5. ANÁLISE DE DADOS

Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade e analisados por meio de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, utilizando o software SigmaPlot versão 12.5, considerando-se significância estatística em $P < 0,05$. A análise de componentes principais (PCA) foi realizada na plataforma estatística MetaboAnalyst (Xia et al., 2015).

No que se refere às análises eletrofisiológicas, todo o processamento dos dados foi conduzido utilizando a linguagem de programação Python 3 (Van Rossum & Drake, 2009). A biblioteca SciPy foi empregada para a aplicação de algoritmos de aprendizado de máquina e para a filtragem dos dados (Pedregosa et al., 2020; Virtanen et al., 2020). Os cálculos matemáticos foram realizados com a biblioteca NumPy (Harris et al., 2020), enquanto a manipulação de *DataFrames* foi efetuada com a biblioteca Pandas (McKinney, 2010). A elaboração dos gráficos foi realizada utilizando a biblioteca Matplotlib (Hunter, 2007).

A expressão gênica foi avaliada segundo o método de expressão relativa utilizando o software qBase, e a análise estatística correspondente foi realizada no GraphPad Prism 8.

6. RESULTADOS

6.1. Trocas gasosas

As variáveis de taxa de transpiração (E – gráfico 3a) e condutância estomática (g_s – gráfico 3b) apresentaram padrões de resposta semelhantes. Em ambas as variáveis, o único tratamento que diferiu estatisticamente dos demais foi o S-S, o qual exibiu valores 42,85% superiores aos observados em C-C, C-S e C-S 2º ciclo, e 150% superiores ao tratamento S 2º ciclo – S 2º ciclo para a taxa de transpiração. Para a condutância estomática, o tratamento S-S foi 45,83% maior em relação a C-C, C-S e C-S 2º ciclo, e 133,33% superior quando comparada ao tratamento S 2º ciclo – S 2º ciclo. Esses resultados sugerem a ocorrência de um efeito associado à memória do estresse salino recorrente.

Os dados de assimilação de CO_2 (A_{Net} – figura 3c) apresentaram valores semelhantes entre os tratamentos, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas. A eficiência do uso da água (A/E – figura 3d) evidenciou a semelhança dos resultados entre o grupo C-C e S 2º ciclo – S 2º ciclo, sendo maior em 88,2% do que o grupo S-S. Adicionalmente, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos C-C e C-S 2º ciclo.

Já na eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s – figura 3e) foi observado que, o maior valor apresentado entre os tratamentos foi o grupo S 2º ciclo - S 2º ciclo, revelando-se 60% maior que o grupo S-S.

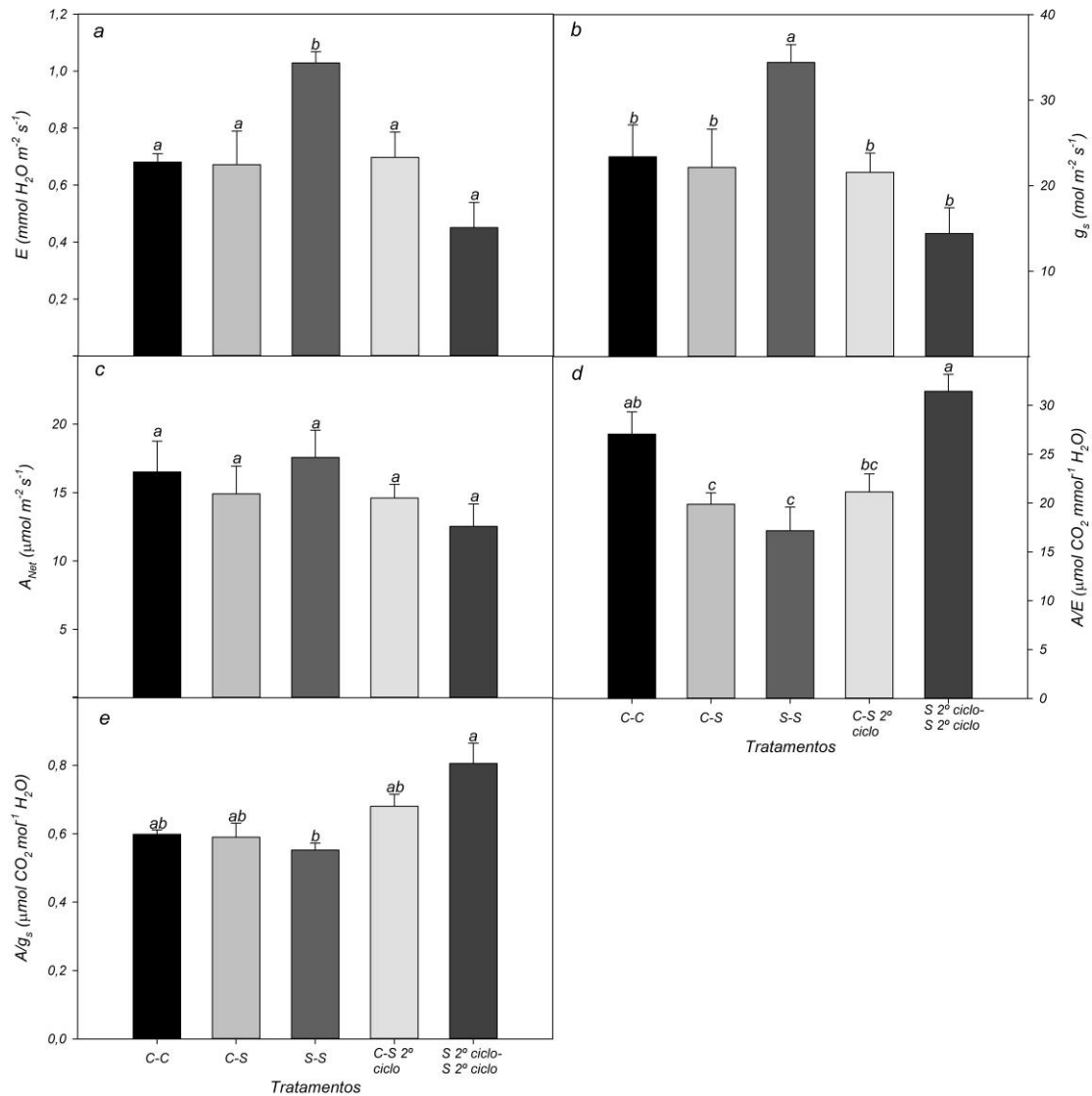


Figura 3: Taxa de transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - gráfico **a**); Condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - gráfico **b**); Assimilação de CO_2 (A_{Net} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - gráfico **c**); Eficiência do uso da água (A/E , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ - gráfico **d**); Eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ - gráfico **e**) dos tratamentos C-C, C-S, S-S, C-S 2º ciclo e S 2º ciclo - S 2º ciclo. Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.2. Fluorescência da clorofila *a*

Na figura 4, a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m - gráfico 4a) não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, uma vez que todos exibiram valores muito próximos. Em contraste, o rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII} - figura 4b), taxa de transporte de elétrons (ETR - figura 4c) e dissipação fotoquímica (qP - figura 4d) evidenciaram diferenças entre os tratamentos, com o grupo controle (C-C) apresentando os maiores valores. Detalhadamente, o tratamento C-C apresentou valores de Φ_{PSII} aproximadamente 66% superiores aos observados nos tratamentos C-S, C-S 2º ciclo e S 2º

ciclo – S 2º ciclo (Figura 4b), valores de ETR cerca de 33% superiores em relação a todos os demais tratamentos (Figura 4c) e valores de qP aproximadamente 60% maiores quando comparados aos tratamentos C–S, S–S e C–S 2º ciclo (Figura 4d).

Na dissipação não-fotoquímica (NPQ – gráfico e), notou-se a semelhança dos resultados dos grupos S-S e S 2º ciclo – S 2º ciclo, diferindo de todos os outros tratamentos, o que sugere alta dissipação energética em forma de calor nestes grupos.

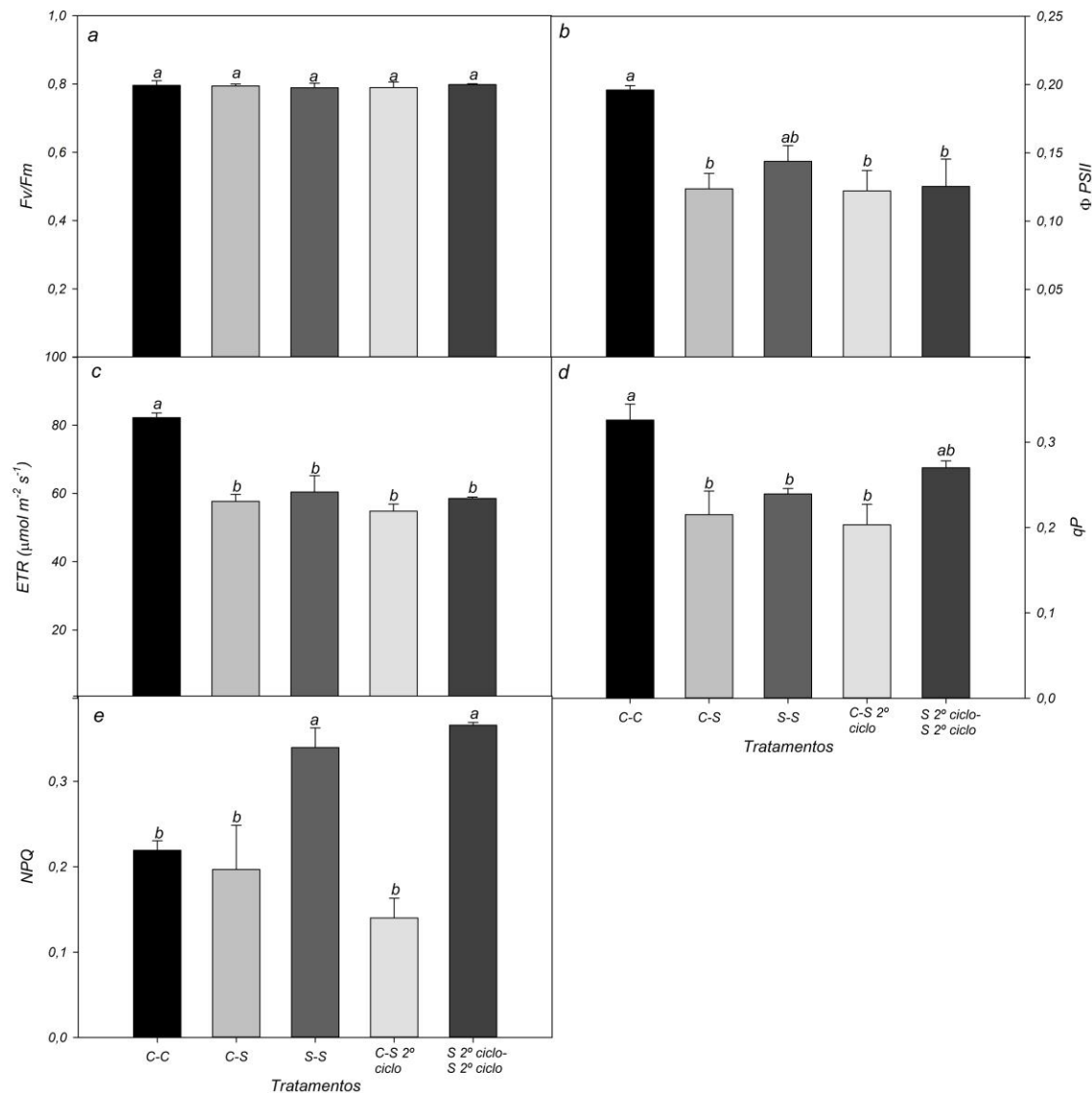


Figura 4: Eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm – gráfico **a**); Rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII} – gráfico **b**); Taxa de transporte de elétrons (ETR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ – gráfico **c**); Dissipação fotoquímica (qP – gráfico **d**); Dissipação não-fotoquímica (NPQ – gráfico **e**) dos tratamentos C-C, C-S, S-S, C-S 2º ciclo e S 2º ciclo – S 2º ciclo. Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.3. Análise antioxidante

Em relação aos dados bioquímicos, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para a peroxidação lipídica (TBARS – Figura 5a), indicando valores

semelhantes entre os grupos avaliados. Diferentemente, o conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 – figura 5b) apresentou aumento significativo nos tratamentos S–S e S 2º ciclo – S 2º ciclo, cujos valores foram aproximadamente 133% superiores em relação aos demais tratamentos. Em relação a SOD (figura 5c), o grupo S–S atingiu o valor mais alto apresentado, não exibindo diferença com o grupo C–C e C–S, porém sendo cerca de 50% superior aos tratamentos C–S 2º ciclo e S 2º ciclo – S 2º ciclo. No gráfico ao lado, a POD (figura 5d) mostrou um comportamento completamente diferente: desta vez, o maior valor apresentado foi do grupo S 2º ciclo – S 2º ciclo, o que evidenciou dados 57,1% maiores que o C–C, 83% maiores que os grupos C–S e C–S 2º ciclo e 175% maiores que o grupo S–S. Por fim, a prolina (figura 5e), revelou a semelhança dos dados exibidos pelos grupos S–S e S 2º ciclo – S 2º ciclo, cujos foram 28% maior que grupo C–C, apresentando diferença estatística.

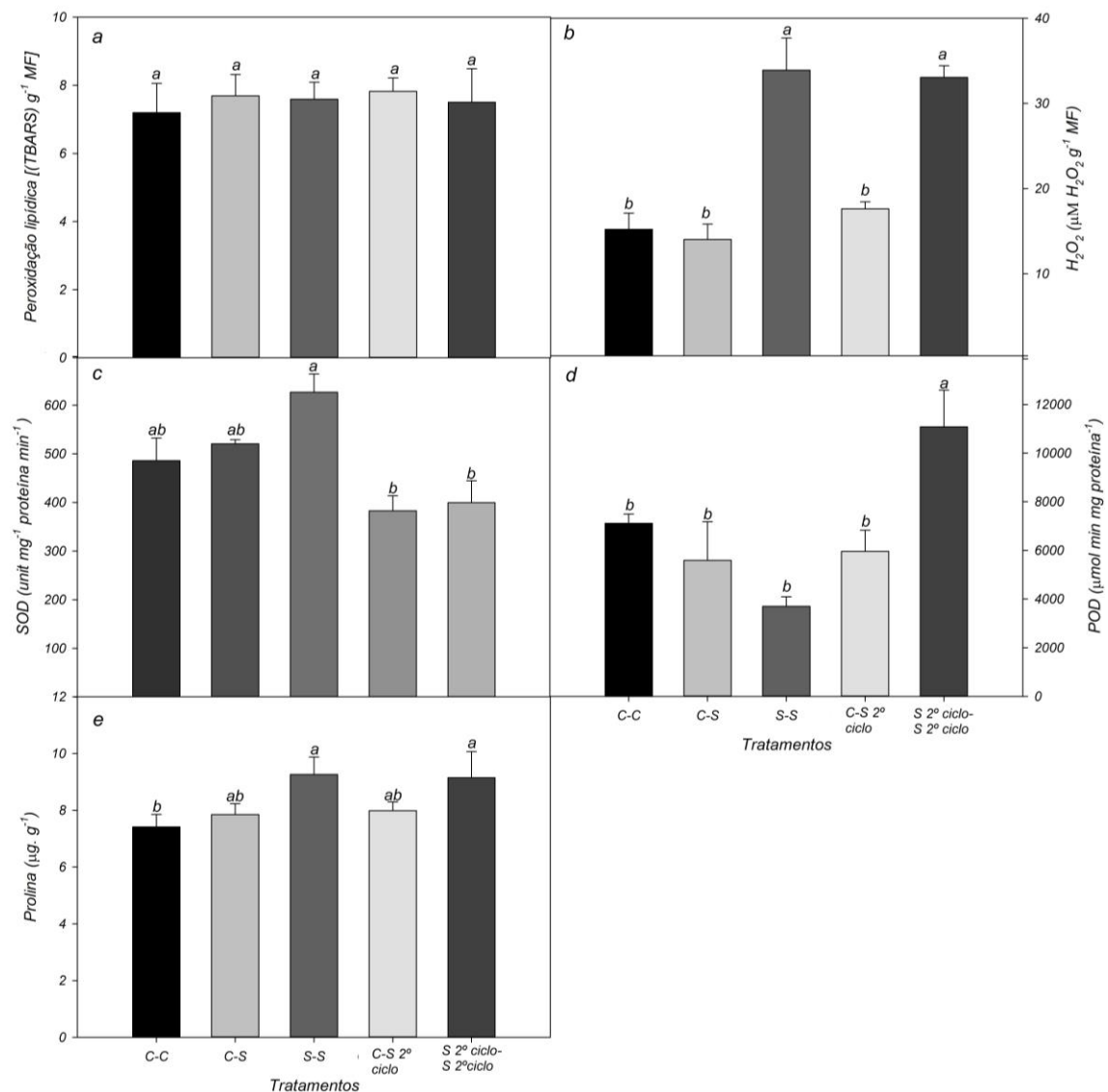


Figura 5: Peroxidação lipídica [(TBARS) g^{-1} MF] – gráfico **a**); Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (μM H_2O_2 g^{-1} MF – gráfico **b**); Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (unit mg^{-1} proteína min^{-1} – gráfico **c**); Atividade da enzima peroxidase (POD) ($\mu\text{mol min mg}$

proteína⁻¹ – gráfico **d**); Prolina ($\mu\text{g. g}^{-1}$ – gráfico **e**) dos tratamentos C-C, C-S, S-S, C-S 2º ciclo e S 2º ciclo – S 2º ciclo. Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6.4. PCA dos dados de trocas gasosas, fluorescência e bioquímica

A análise de componentes principais (PCA) realizada a partir dos dados de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e parâmetros bioquímicos, considerando duas constituintes principais (PC1 e PC2), explicou mais de 50% da variação dos dados. Foi observado que o tratamento S-S separou-se claramente do restante dos resultados, sendo fortemente associado às variáveis de *E*, *g_s*, SOD, H_2O_2 e Prolina. O grupo C-C também se posicionou de forma isolada em relação aos demais tratamentos, sendo essa separação principalmente influenciada pelas variáveis relacionadas à fluorescência da clorofila *a*. Os demais tratamentos (C-S, C-S 2º ciclo e S 2º ciclo – S 2º ciclo) apresentaram agrupamento mais próximo entre si, sendo predominantemente influenciados pelas variáveis de POD, Prolina e H_2O_2 .

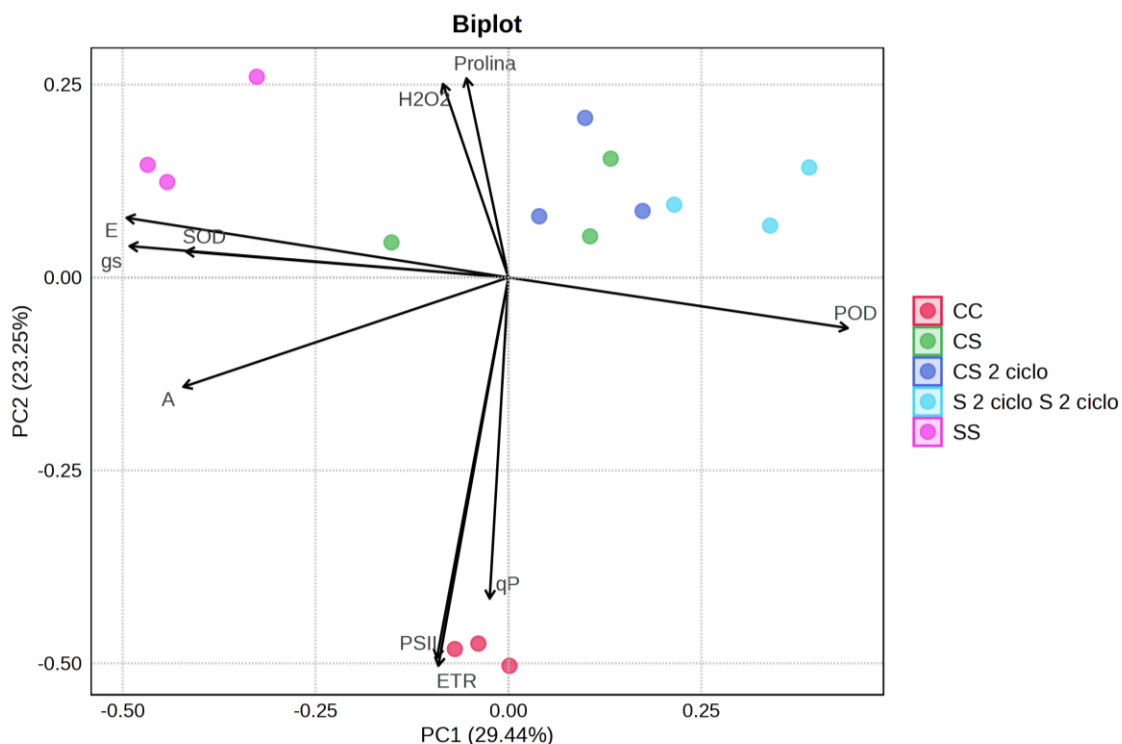


Figura 6: Análise de Componentes Principais (PCA) das respectivas análises de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e bioquímica dos tratamentos C-C, C-S, S-S, C-S 2º ciclo e S 2º ciclo – S 2º ciclo.

6.5. Sinais elétricos - Eletrofisiologia

As análises dos sinais elétricos foram organizadas em dois enfoques principais: (i) comparação dos sinais antes e após a aplicação do estímulo salino para todos os tratamentos e (ii) comparação entre estresse não recorrente e recorrente, considerando exclusivamente os sinais registrados após o estímulo, nos tratamentos C–S *versus* C–S 2º ciclo e S–S *versus* S 2º ciclo – S 2º ciclo. Inicialmente, os sinais elétricos das plantas foram registrados por um período de uma hora antes da aplicação do estímulo. Em seguida, os equipamentos de aquisição foram temporariamente interrompidos para a aplicação do estresse salino nos tratamentos correspondentes e, posteriormente, religados para a captação dos sinais elétricos após o estímulo. Ressalta-se que, durante a aplicação do sal nos tratamentos estressados, o grupo controle (C–C) recebeu apenas solução nutritiva com 100% de força iônica, assim como os compartimentos controle (C) dos tratamentos C–S e C–S 2º ciclo.

6.5.1. Antes do estímulo versus depois do estímulo

A média do electroma do grupo C-C na figura 7, evidenciou os sinais bioelétricos se mantendo por volta de 0,1 até quase os 100 minutos, decrescendo posteriormente e apresentando menor dispersão (sombreado) entre as plantas monitoradas. As análises de frequência (FFT) seguem o mesmo comportamento.

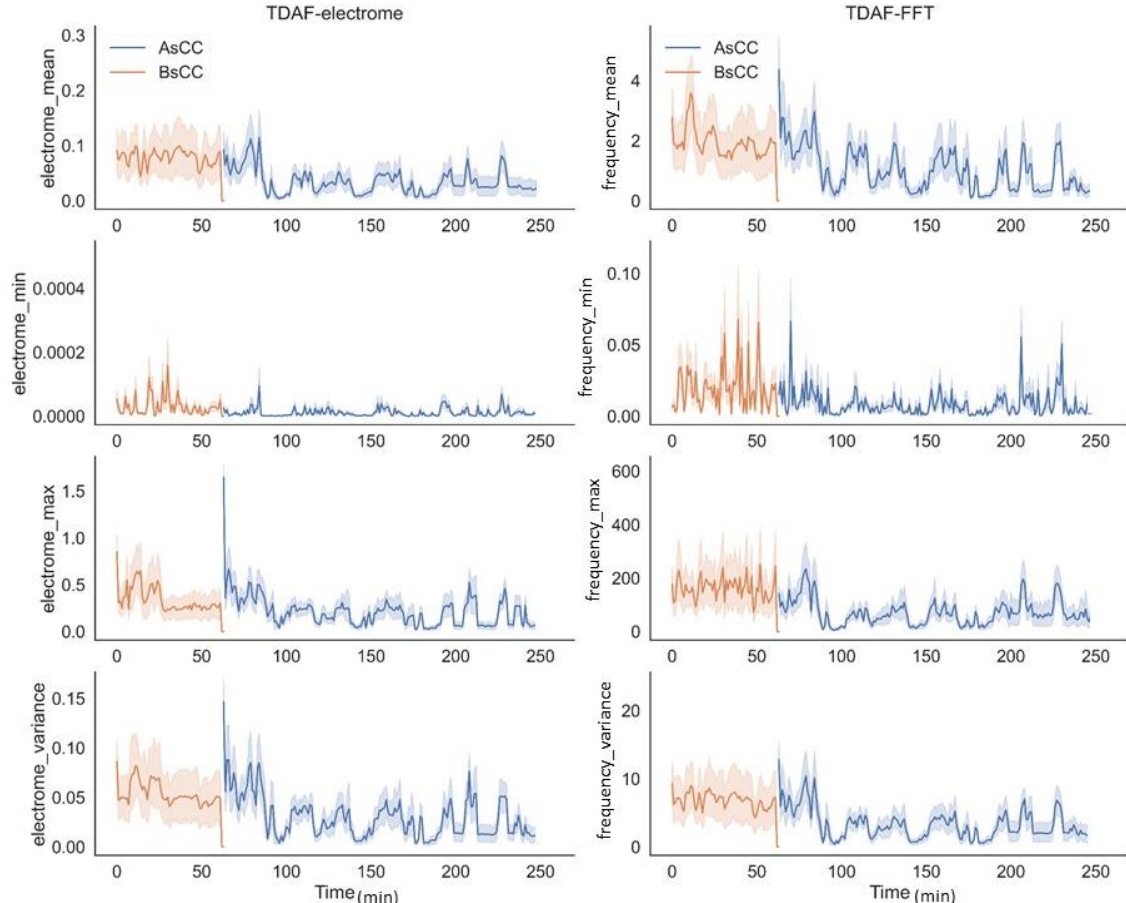


Figura 7: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores do tratamento C-C antes (BsCC) e depois do estímulo salino (AsCC), mostrando características do electroma e a direita as características da frequência obtida pela FFT. No eixo-y estão os valores para cada característica, no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

Na figura 8, foi demonstrado um valor um pouco mais alto da ApEn para o grupo C-C depois do estímulo (cor azul) a partir dos 60 minutos, em relação ao antes do estímulo, indicando maior complexidade desse sistema. As análises de DFA e Lyapunov indicaram uma semelhança das séries temporais (STs) como esperado.

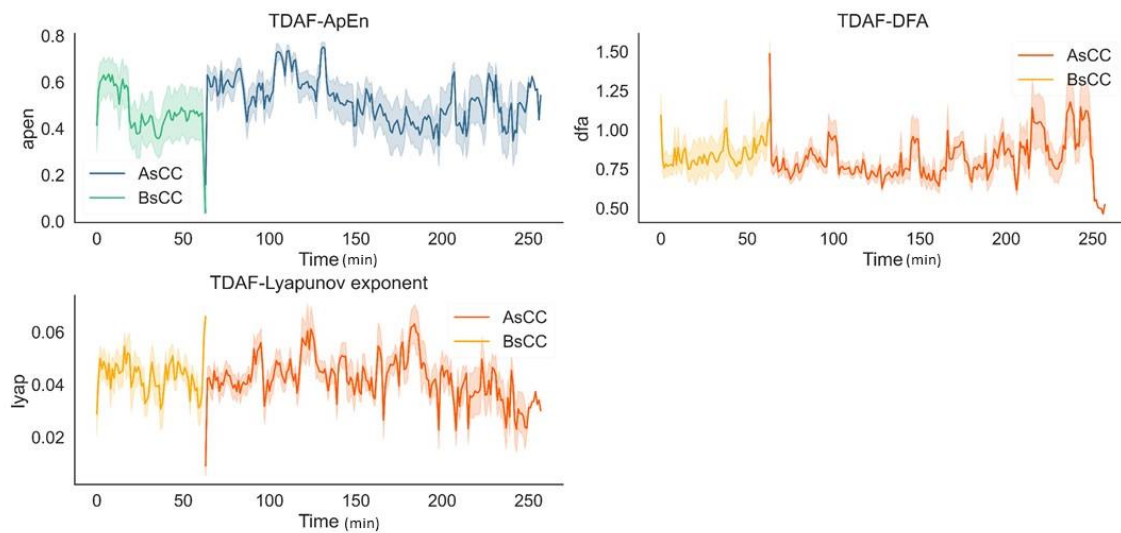


Figura 8: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores do tratamento C-C antes (BsCC) e depois do estímulo salino (AsCC) das características de ApEn, a direita estão os valores das características DFA, e por fim, abaixo da ApEn, o expoente de Lyapunov. No eixo-y estão os valores para cada característica, e no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

Sobre o tratamento C-S, os valores de média, máximo e mínimo do electroma do sinal captado, evidenciaram picos logo que o estímulo foi aplicado (cor azul), cuja oscilação se manteve até os 130 minutos de monitoramento, acompanhada de uma maior dispersão entre as plantas, indicando resposta rápida ao sal. A medição feita antes do estímulo, (cor marrom) apresenta poucas variações. O mesmo comportamento é encontrado para as análises de frequência.

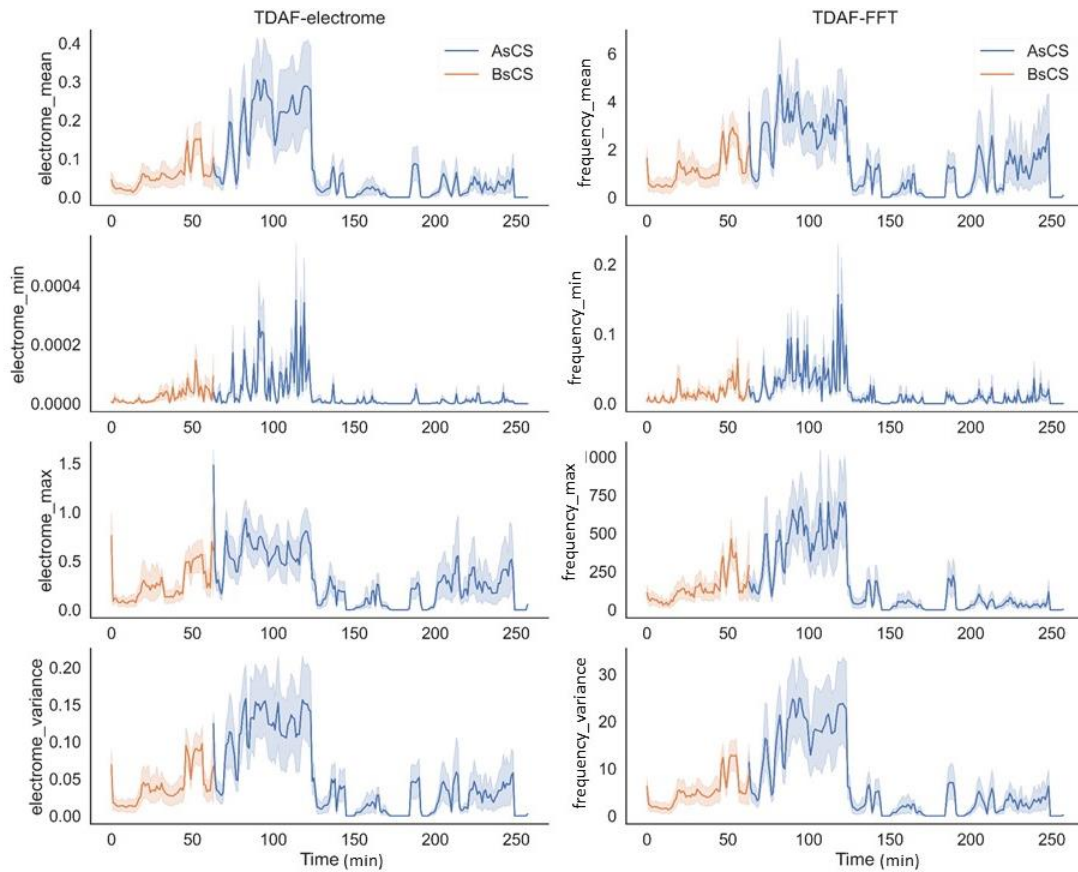


Figura 9: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores do tratamento C-S antes (BsCS) e depois do estímulo salino (AsCS), mostrando características do electroma e a direita as características da frequência obtida pela FFT. No eixo-y estão os valores para cada característica, no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

Na Figura 10, observa-se que a complexidade foi aumentada no instante em que o estímulo salino foi aplicado (60 minutos), e decresce a partir dos 150 minutos de medição, apresentando comportamento semelhante ao encontrado antes do estímulo. A análise do DFA mostrou uma queda referente aos primeiros minutos de aplicação do sal e depois se manteve próxima a 1.0. O Expoente de Lyapunov apresentou aumento progressivo ao longo do tempo, enfatizando o aumento do caos neste sistema.

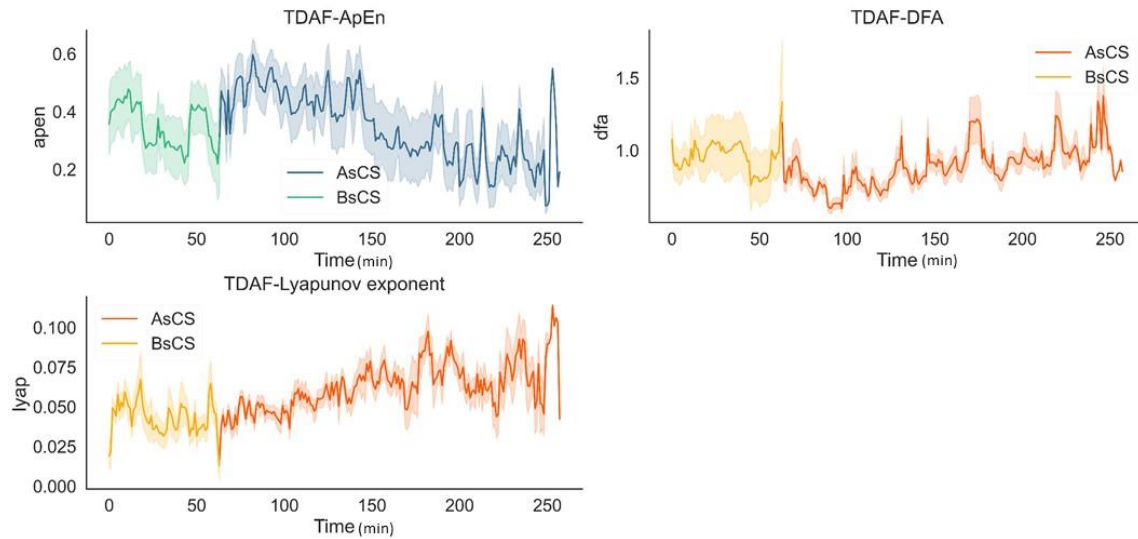


Figura 10: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores do tratamento C-S antes (BsCS) e depois do estímulo salino (AsCS) das características de ApEn, a direita estão os valores das características DFA, e por fim, abaixo da ApEn, o expoente de Lyapunov. No eixo-y estão os valores para cada característica, e no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

Para o tratamento S-S na figura 11, as análises antes do estímulo revelam uma variação rápida da atividade do electroma e frequência, seguida por um período de queda. Com a aplicação do sal, observou-se o surgimento de uma nova oscilação, promovendo o aumento dos valores para aproximadamente 0,2, os quais se mantiveram até cerca de 120 minutos. Posteriormente, os valores voltaram a decrescer, igualando-se ao comportamento antes do estímulo. Notou-se também a variabilidade das respostas das plantas monitoradas, dada pela região sombreada.

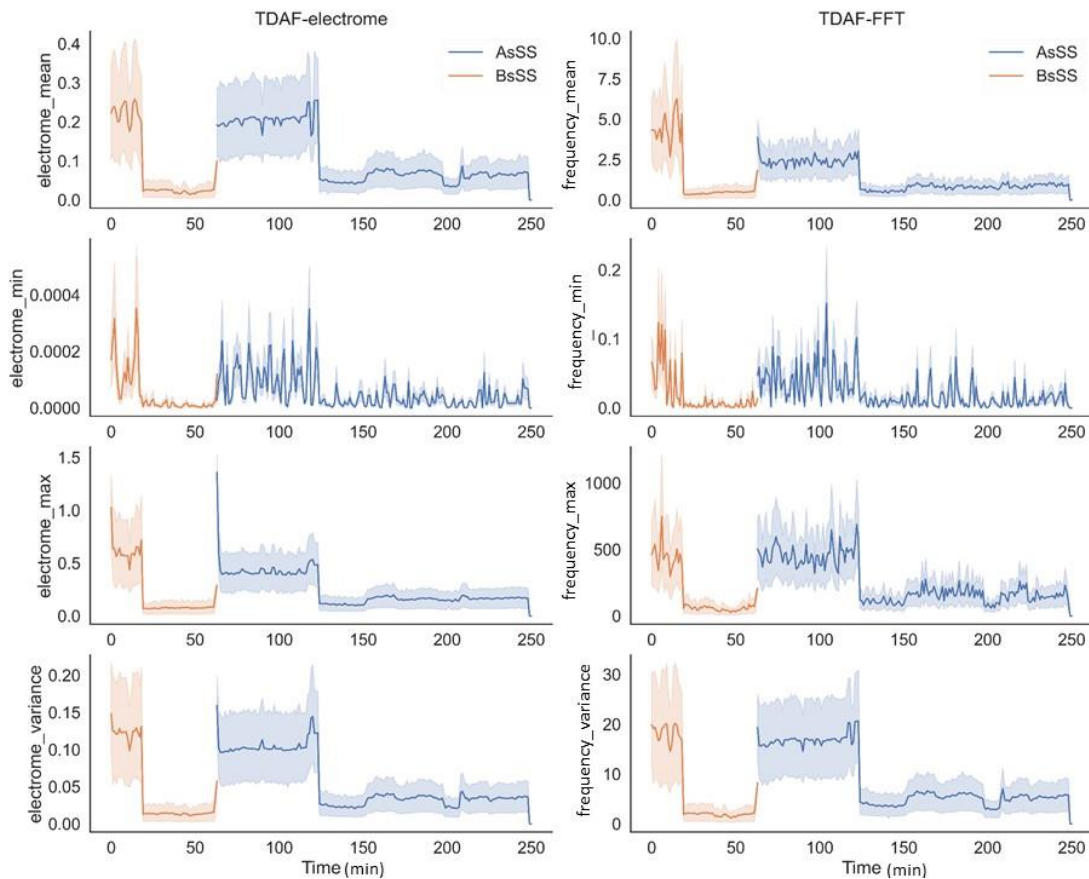


Figura 11: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores do tratamento S-S antes (BsSS) e depois do estímulo salino (AsSS), mostrando características do electroma e a direita as características da frequência obtida pela FFT. No eixo-y estão os valores para cada característica, no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

Na figura 12, foi observado que após o estímulo, os resultados para ApEn até 120 minutos apresentaram valores maiores quando comparados ao antes do estímulo, indicando um sinal mais complexo e menos previsível. No entanto, a complexidade diminuiu gradualmente ao longo do tempo, atingindo valores mais baixos ($\sim 0,3$) por volta dos 150 minutos. Apesar de um novo pico aos 200 minutos, os valores continuaram diminuindo gradativamente, com menor variação, alcançando $\sim 0,2$ ao final. Sendo assim, o estresse salino primeiramente aumentou e depois reduziu a complexidade e diminuiu a variabilidade do sinal bioelétrico, resultando em maior estabilidade ao longo do tempo após o estímulo.

Após os 25 minutos, antes do estímulo, os valores de DFA foram elevados ($\sim 1,2$ a $1,5$). Após o estímulo, vemos um pico significativo ($\sim 1,4$) seguido de uma queda até os 120 minutos. Após esse período, os valores de DFA voltaram a aumentar gradativamente, estabilizando por volta de $1,2$ - $1,5$ ao final. O estímulo salino pareceu reduzir inicialmente, mas os sinais se reorganizaram e recuperaram parte dessa característica ao longo do tempo.

Os valores baixos de Lyapunov antes do estímulo, indicaram menor comportamento caótico no sinal bioelétrico. Por volta dos 20 minutos, esse expoente teve um pequeno aumento ($\sim 0,08$), mas voltou a decair até o final do monitoramento. Após o estímulo, os valores de caos se mantiveram constantes ($\sim 0,06$) até os 120 minutos de medição, quando houve um aumento notável, seguido de vários picos com valores acima de 0,1, indicando uma dinâmica mais ativa e instável. Igualmente aos valores de ApEn, ao final da medição, o comportamento caótico foi significativamente reduzido, evidenciando valores abaixo de 0,05.

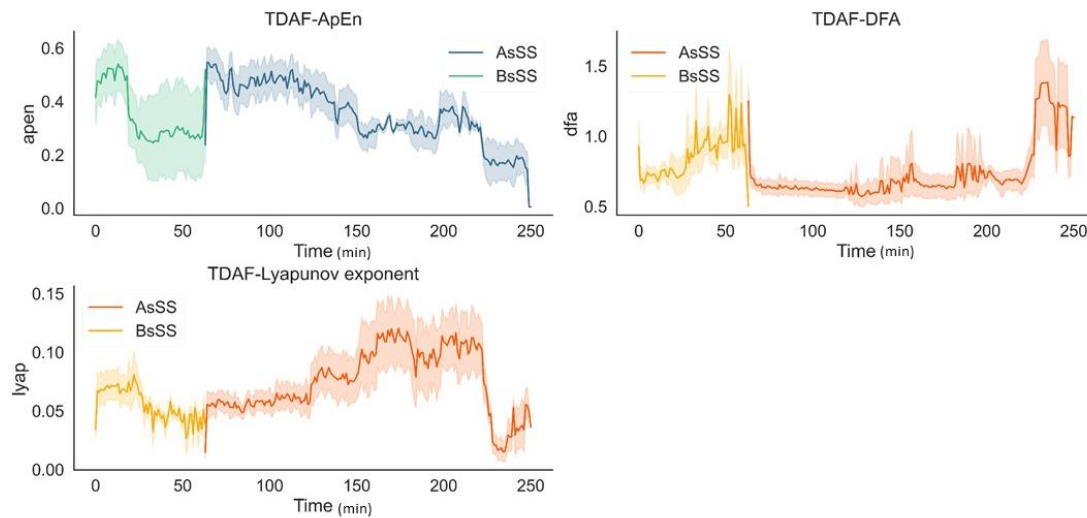


Figura 12: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores do tratamento S-S antes (BsSS) e depois do estímulo salino (AsSS) das características de ApEn, a direita estão os valores das características DFA, e por fim, abaixo da ApEn, o expoente de Lyapunov. No eixo-y estão os valores para cada característica, e no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

O gráfico de média do electroma do grupo C-S 2º ciclo representado na figura 13, evidenciou apenas um pico (cor azul) próximo dos primeiros minutos de medição seguido de uma estagnação desse sinal até 150 minutos. Somente após esse tempo, os picos se tornaram constantes e foram mantidos até o final da medição, indicando aumento da atividade elétrica da planta. Os valores de frequência seguem o mesmo comportamento. Diferentemente do que foi visto em C-S, a resposta bioelétrica ao sal ocorreu neste tratamento, porém de forma mais tardia. A amplitude do sinal elétrico diminuiu significativamente na primeira hora após o estresse, quando considerado seus valores mínimos.

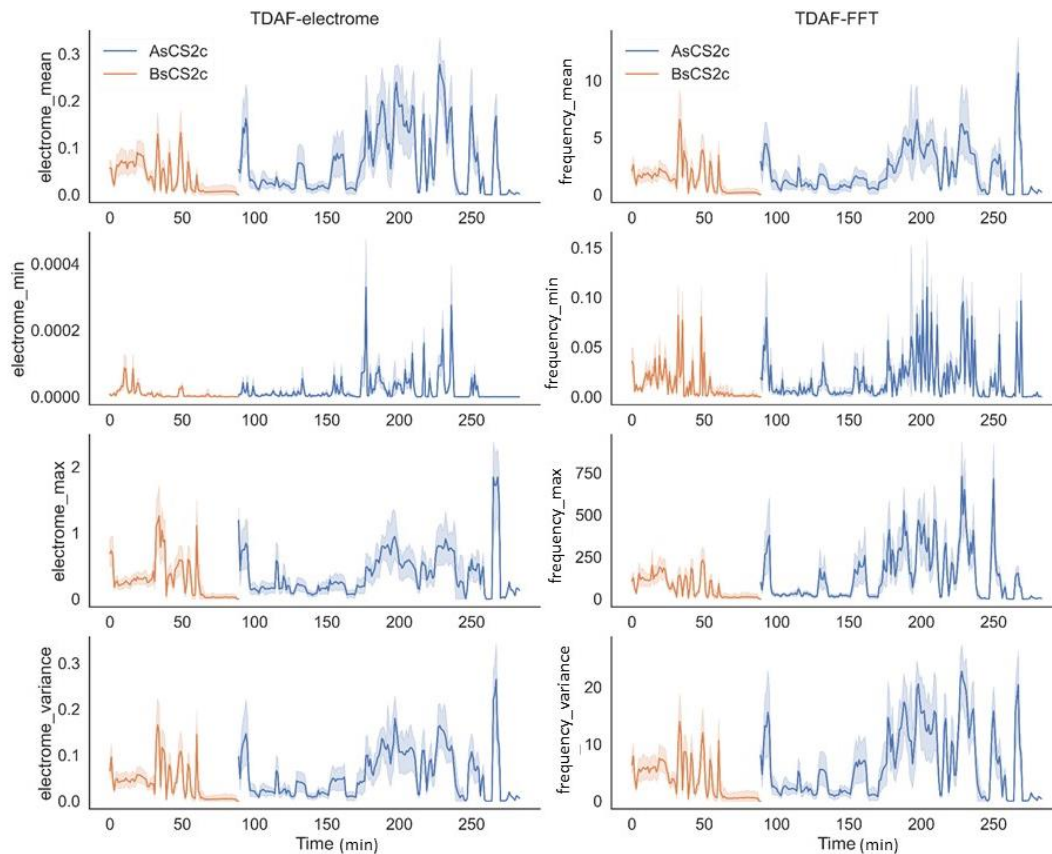


Figura 13: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores do tratamento C-S 2º ciclo antes (BsCS2c) e depois do estímulo salino (AsCS2c), mostrando características do electroma e a direita as características da frequência obtida pela FFT. No eixo-y estão os valores para cada característica, no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

O tratamento C-S 2º ciclo, na medição realizada após a aplicação do estresse, apresentou valores de ApEn inferiores aos observados antes do estímulo (figura 14). Após aproximadamente 200 minutos, ocorreu uma queda acentuada desse índice, indicando redução significativa da complexidade do sinal, com valores próximos de 0,0 aos 250 minutos. O DFA indicou um pico resultante do estímulo, mas retornou ao comportamento basal, por volta de 1 até próximo dos 240 minutos. Após esse tempo, ocorreram picos maiores de 1.5 até 2 ocorreram. Isto deixa claro que as variações futuras são fortemente influenciadas pelo passado, sugerindo um sistema que estava desenvolvendo um comportamento altamente previsível e estruturado. O Lypunov reforçou esta ideia quando a série perdeu seu caráter caótico (queda) aos 260 min.

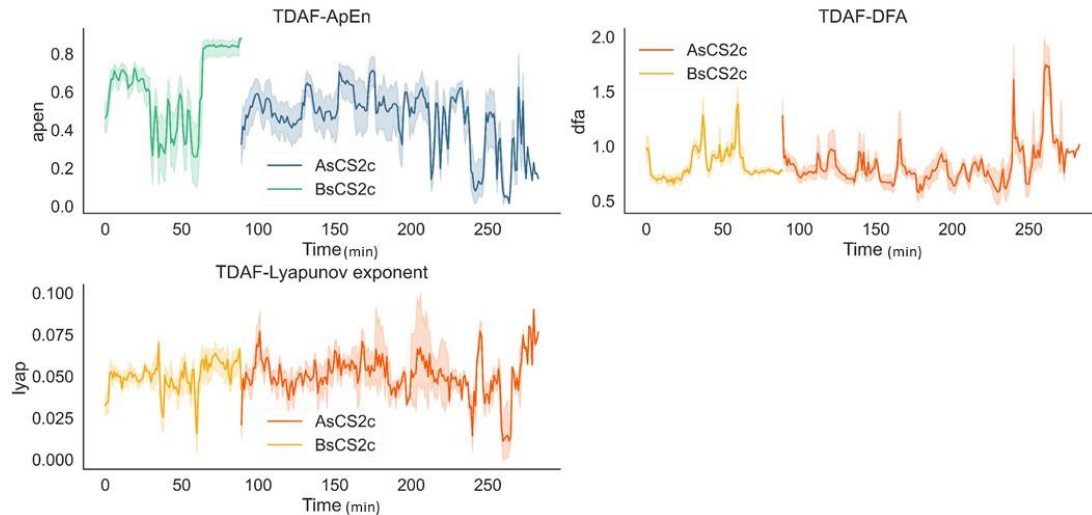


Figura 14: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores do tratamento C-S 2º ciclo (BsCS2c) antes e depois do estímulo (AsCS2c) salino das características de ApEn, a direita estão os valores das características DFA, e por fim, abaixo da ApEn, o expoente de Lyapunov. No eixo-y estão os valores para cada característica, e no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

No que se refere ao grupo S 2º ciclo – S 2º ciclo, a média do electroma (figura 15) mostrou a diminuição dos seus valores após o estímulo em todas as suas características, permanecendo em uma faixa entre 0,0 e 0,05. Observou-se, entretanto, um aumento transitório do electroma por volta dos 120 minutos, o qual não ultrapassou os valores registrados antes do estímulo, seguido por novo declínio. A frequência mimetizou este mesmo comportamento do electroma.

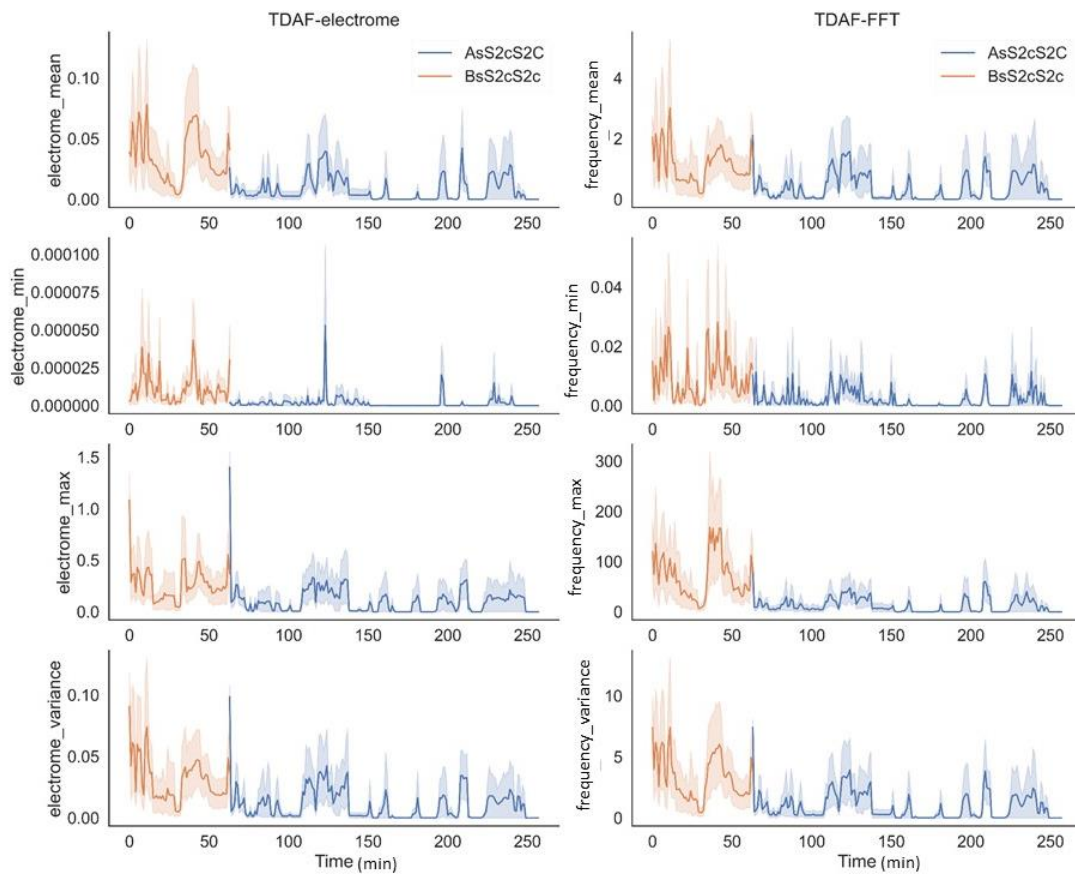


Figura 15: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores do tratamento S 2º ciclo – S 2º ciclo antes (BsS2cS2c) e depois do estímulo salino (AsS2cS2c), mostrando características do electroma e a direita as características da frequência obtida pela FFT. No eixo-y estão os valores para cada característica, no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

O grupo S 2º ciclo – S 2º ciclo (figura 16) exibiu um aumento de complexidade (ApEn) após o estímulo até os 120 minutos, quando percebeu-se a tendência de queda até o fim da medição. Em relação ao DFA, verificou-se um pico inicial em torno de 1,5 logo após o estímulo, seguido por uma redução para valores próximos de 1,0 até os 120 minutos e, posteriormente, novo aumento, atingindo valores iguais ou superiores a 1,5. Notavelmente, o decréscimo da ApEn em torno dos 120 minutos coincidiu com o aumento do DFA. Na análise do expoente de Lyapunov, o comportamento caótico revelado é maior antes do estímulo do que após o mesmo. Além disso, tanto a ApEn quanto o DFA apresentaram maior dispersão dos dados (área sombreada), sugerindo um aumento da variabilidade individual das respostas ao estresse. Para o expoente de Lyapunov, essa maior dispersão tornou-se mais evidente apenas a partir dos 120 minutos.

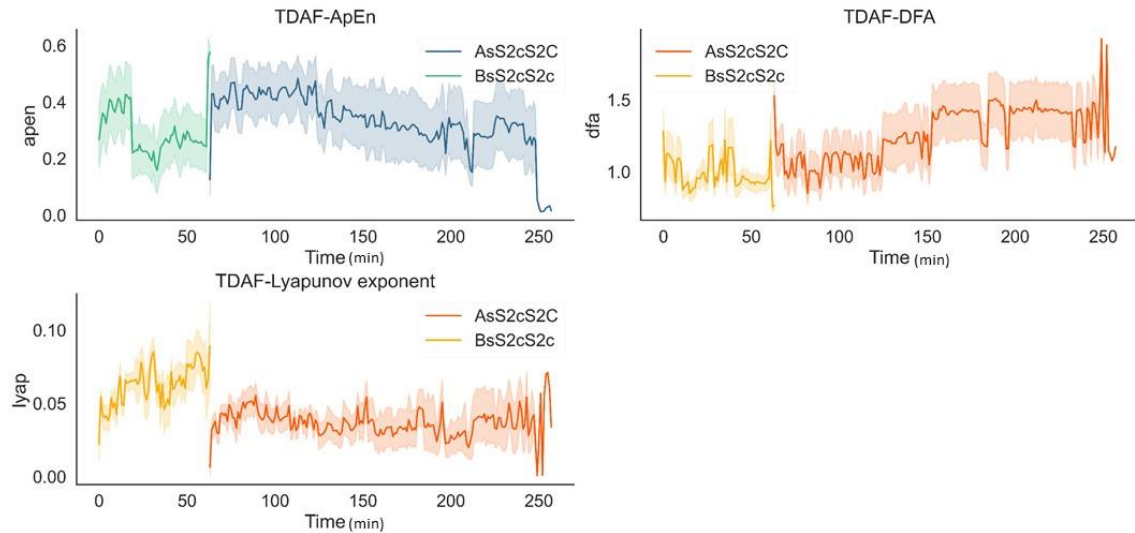


Figura 16: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores do tratamento S 2º ciclo – S 2º ciclo antes (BsS2cS2c) e depois do estímulo salino (AsS2cS2c) das características de ApEn, a direita estão os valores das características DFA, e por fim, abaixo da ApEn, o expoente de Lyapunov. No eixo-y estão os valores para cada característica, e no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

6.5.2. Recorrência versus não recorrência do estresse

Comparando os sinais elétricos do C-S e C-S 2º ciclo na média do electroma na figura 17, vemos a nítida diferença entre os tratamentos. A resposta rápida desencadeada pelo estímulo repetido de sal no C-S (azul) fez com que tivéssemos respostas desde os primeiros minutos do estresse, cuja resposta só foi atenuada a partir dos 120 minutos e posteriormente, tendeu a valores baixíssimos. Curiosamente, quando a resposta do C-S começa a ser diminuída, o grupo C-S 2º ciclo inicia seu processo de resposta, a partir dos 150 minutos, sendo captada até os 270 minutos. Isto nos mostrou que os dois grupos apresentaram respostas eletrofisiológicas, porém em tempos diferentes e distantes um do outro.

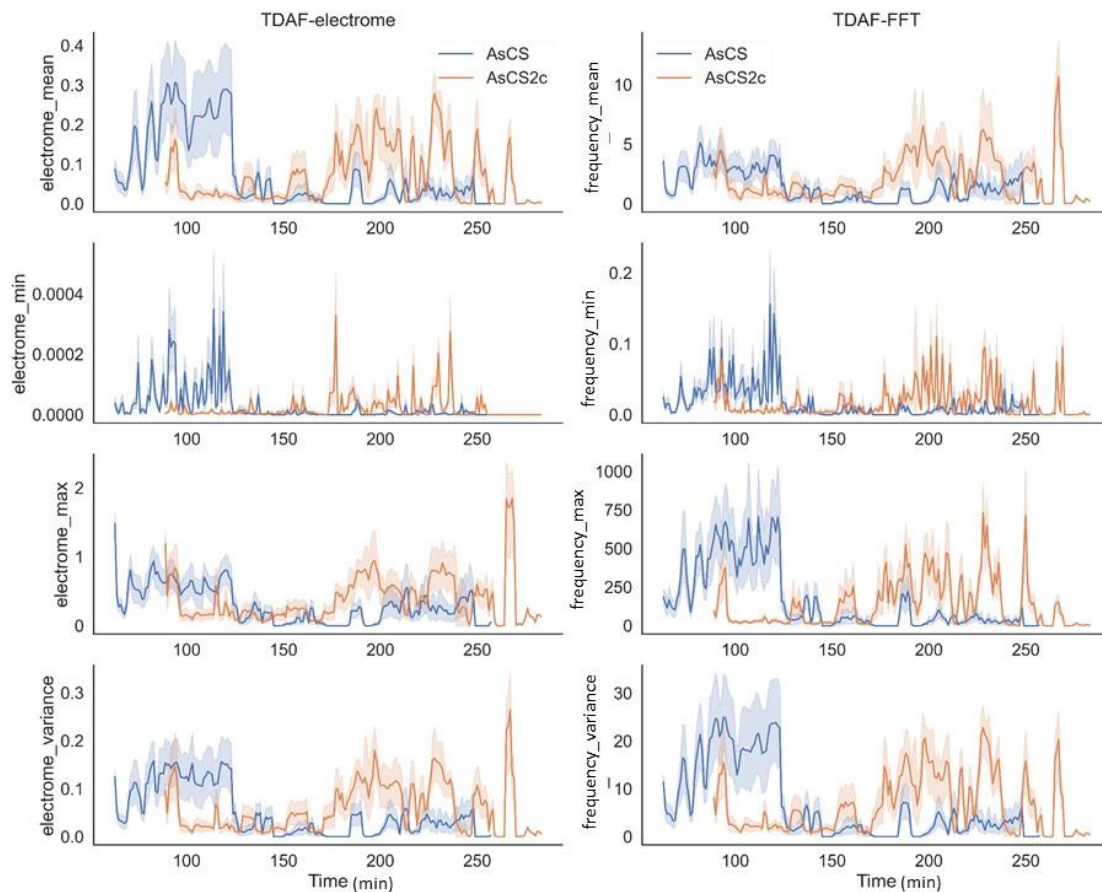


Figura 17: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores dos tratamentos C-S (AsCS) e C-S 2º ciclo (AsCS2c) depois do estímulo salino, mostrando características do electroma e a direita as características da frequência obtida pela FFT. No eixo-y estão os valores para cada característica, no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

Em relação a ApEn na figura 18, vemos que houve uma tendência de ApEn mais baixa no tratamento C-S do que no C-S 2º ciclo. Percebeu-se entretanto, que os dois tratamentos possuíam essa tendência de queda, sendo que C-S 2º ciclo apresentou de forma mais drástica uma variação de resultados com picos mais evidentes. Assim, C-S apresenta-se mais estável para a complexidade do sinal. As análises de DFA e do expoente de Lyapunov reforçaram o comportamento semelhante observado entre ambos os tratamentos, evidenciando distinções entre eles apenas a partir de aproximadamente 150 minutos.

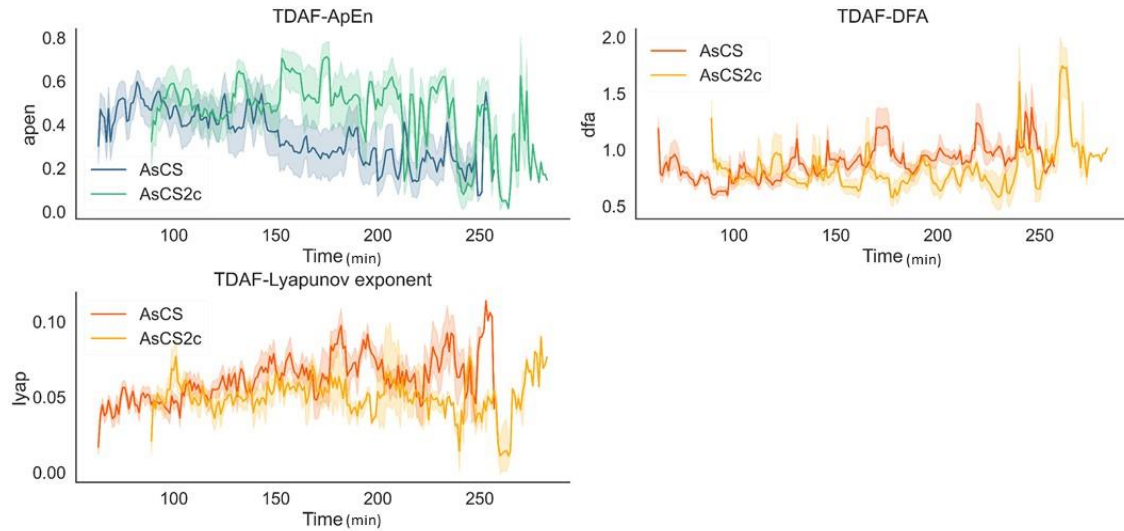


Figura 18: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores dos tratamentos C-S (AsCS) e C-S 2º ciclo (AsCS2c) depois do estímulo salino das características de ApEn, a direita estão os valores das características DFA, e por fim, abaixo da ApEn, o expoente de Lyapunov. No eixo-y estão os valores para cada característica, e no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

Na comparação entre os tratamentos S-S e S 2º ciclo – S 2º ciclo (Figura 19), evidenciou-se uma resposta bioelétrica distinta entre os grupos. O tratamento S-S manteve valores em torno de 0,2 até aproximadamente 120 minutos, seguido por uma queda progressiva da resposta bioelétrica do sorgo. Em contraste, o tratamento S 2º ciclo – S 2º ciclo apresentou valores próximos de 0,0 ao longo de todo o período de análise (250 minutos). Esses resultados sugerem que, quando o estresse é aplicado em ambos os compartimentos radiculares, a principal interferência observada está relacionada à presença do priming induzido no tratamento S-S. Ademais, observou-se novamente um aumento da dispersão dos dados no tratamento S-S, indicando maior individualidade das respostas entre as amostras. As análises de frequência apresentaram comportamento semelhante ao observado para o electroma.

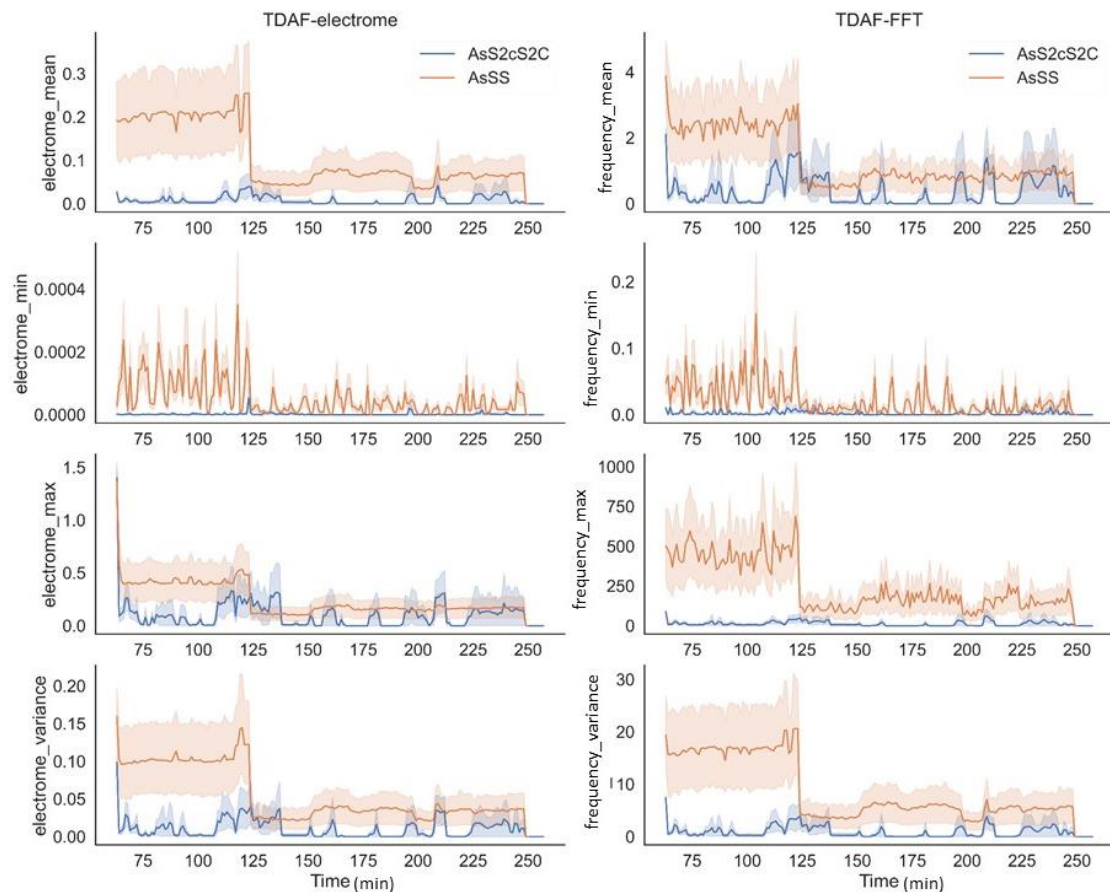


Figura 19: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores dos tratamentos S-S (AsSS) e S 2º ciclo - S 2º ciclo (AsS2cS2c) depois do estímulo salino, mostrando características do electroma e a direita as características da frequência obtida pela FFT. No eixo-y estão os valores para cada característica, no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

Na figura 20, embora os resultados de complexidade (ApEn) tenham apresentado a mesma tendência de redução após a aplicação do estresse, a análise de DFA revelou que o tratamento S-S exibiu um aumento expressivo de ruído, com valores em torno de 0,5, característicos de ruído branco. Acreditamos que esse ruído tenha origem fisiológica, uma vez que todas as plantas analisadas apresentaram comportamento semelhante, com pouca ou nenhuma dispersão entre as amostras. Posteriormente, os valores de DFA voltaram a aumentar, aproximando-se de 1,0 a partir de cerca de 125 minutos. Um aumento expressivo para esta variável foi notado após 225 minutos, exibindo a aproximação dos valores para ambos os tratamentos. Esse padrão também foi corroborado pelo expoente de Lyapunov, que indicou intensificação do comportamento caótico do S-S no mesmo intervalo temporal (125 minutos), diminuindo seus valores apenas aos 255 minutos, momento em que também se aproximaram daqueles registrados para o tratamento S 2º ciclo – S 2º ciclo.

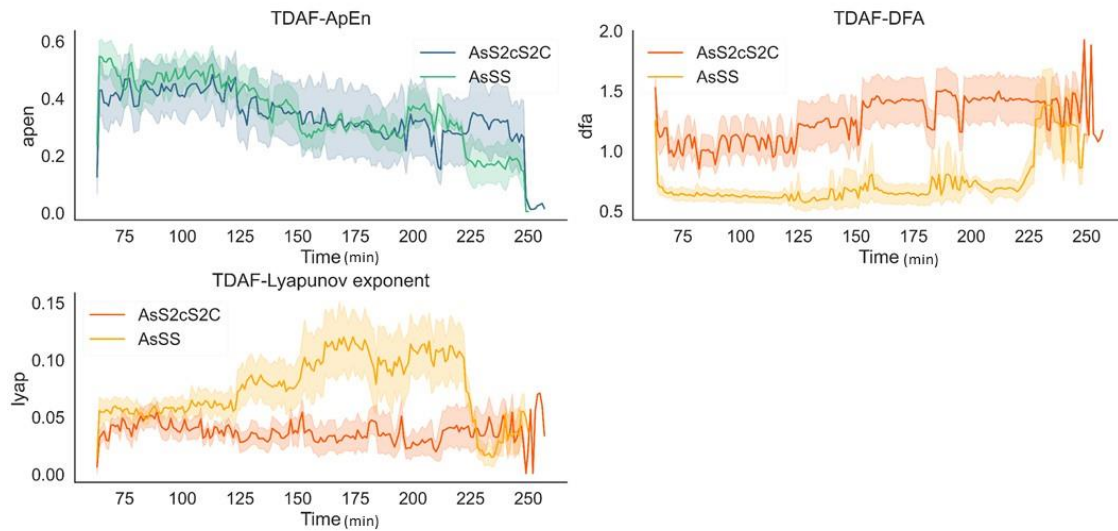


Figura 20: Gráfico de TDAF. A esquerda estão os valores dos tratamentos S-S (AsSS) e S 2º ciclo - S 2º ciclo (AsS2cS2c) depois do estímulo salino das características de ApEn, a direita estão os valores das características DFA, e por fim, abaixo da ApEn, o expoente de Lyapunov. No eixo-y estão os valores para cada característica, e no eixo-x o tempo em minutos respectivo que cada característica foi coletada na ST. A linha mais escura corresponde ao valor mediano da dispersão, o pico da área sombreada representa o maior valor obtido e o vale da área sombreada representa o menor valor obtido.

6.6. Análise molecular

A redução na expressão de *APX1* e *APX2* (figura 21) foi observada em todos os tratamentos quando comparados ao grupo controle (C-C). No entanto, diferenças marcantes nos padrões de expressão gênica foram detectadas entre os tratamentos. Para *APX1*, o tratamento S 2º ciclo - S 2º ciclo não diferiu estatisticamente do controle, enquanto o tratamento S-S apresentou níveis de transcritos significativamente menores em relação a todos os demais. Os tratamentos C-S e C-S 2º ciclo exibiram níveis intermediários de transcritos, sendo significativamente inferiores ao C-C, porém superiores aos observados no tratamento S-S. Esses resultados indicam que apenas o estresse salino recorrente aplicado de forma bilateral (S-S) desencadeou um perfil transcricional singular, claramente distinto dos demais tratamentos.

Em relação a *APX2*, todos os tratamentos apresentaram redução nos níveis de transcritos em comparação ao controle (C-C). Observou-se similaridade estatística entre os tratamentos C-S e S 2º ciclo - S 2º ciclo, C-S e C-S 2º ciclo, bem como entre S-S e C-S 2º ciclo. De modo geral, os níveis de transcritos de *APX2* foram reduzidos de forma consistente sob condições de salinidade, sem distinção evidente entre estresse recorrente e não recorrente.

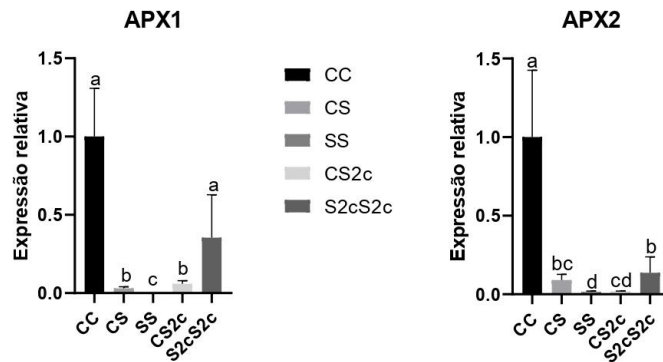


Figura 21: Expressão relativa dos genes *APX1* e *APX2* nas folhas de *Sorghum bicolor* submetido aos tratamentos C-C (CC), C-S (CS), S-S (SS), C-S 2º ciclo (CS2c) e S 2º ciclo – S 2º ciclo (S2cS2c). A expressão do tratamento controle é constante e igual a 1. Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos.

7. DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que a exposição a 120 mM de salinidade em *Sorghum bicolor* modula as respostas da planta a depender tanto da recorrência do estresse quanto da aplicação do estímulo salino em um ou ambos os lados do sistema radicular. De forma específica, o tratamento S–S exibiu um efeito de sensibilização, integrando ajustes fisiológicos (E , g_s , A/E , A/g_s), bioquímicos (SOD, POD) e eletrofisiológicos em uma resposta consistente, a qual se distinguiu claramente dos demais tratamentos na PCA (Figuras 3, 5, 6 e 11). Essa descoberta está alinhada ao conceito de memória de estresse, definido como a capacidade das plantas de apresentar respostas mais rápidas e/ou mais intensas quando reexpostas ao estresse (Bruce et al., 2007; Avramova, 2015; Crisp et al., 2016). Efeitos de sensibilização semelhantes foram relatados em arroz (Amaral et al., 2020a,b; Rossatto et al., 2023), milho (Vennam et al., 2024) e tomate (Kamanga et al., 2020), mas as evidências em sorgo ainda são escassas. Nossos resultados, portanto, ampliam o conhecimento existente e fornecem a primeira evidência integrada de que o sorgo pode expressar sensibilização ao estresse sob salinidade, com a dinâmica do electroma emergindo como um novo e promissor marcador de memória ao estresse.

Neste trabalho, o tratamento de estresse não recorrente S 2º ciclo – S 2º ciclo evidenciou queda significativa em E e g_s quando comparado ao tratamento recorrente de sal S-S (Figura 3a e 3b). Dado que a primeira exposição ao estresse promove uma marca na planta (Liu et al., 2022), a recorrência do estresse pode desencadear respostas diferentes em relação as plantas submetidas ao estresse não recorrente. Nesse sentido, outros autores

também encontraram redução nessas variáveis (E e g_s) quando o sorgo (Rajabi et al., 2024) e o milho (Vennam et al., 2024) foram submetidos a eventos não recorrentes de sal, corroborando com os nossos resultados encontrados em S 2º ciclo – S 2º ciclo. De forma contrária, plantas pré-aclimatadas frequentemente mantêm valores de g_s mais elevados sob estresse recorrente, como observado em tomate (Kamanga et al., 2020) e sorgo (Yan et al., 2015), sugerindo que a recorrência desencadeia este estado de sensibilização e atenua as limitações estomáticas. Os valores mais altos de E e g_s no tratamento S–S indicam, portanto, um estado de sensibilização, refletindo em aumento da responsividade da planta à percepção do estresse salino.

No que se refere aos resultados com a aplicação do split-root, Redwan et al. (2017) encontraram a diminuição significativa de g_s no pepino quando o estresse salino foi aplicado em apenas um lado da raiz, em comparação ao grupo estressado dos dois lados do sistema radicular, o que também foi visto e corrobora com os nossos dados, uma vez que os tratamentos C-S e C-S 2º ciclo mantiveram valores de g_s menores do que o S-S (figura 3a e 3b). No entanto, Zhang et al. (2019) relataram um padrão oposto em sorgo, de maneira que o estresse salino uniforme (ambos os lados da raiz com acréscimo de 100 mM de NaCl) causou uma inibição de g_s mais forte do que o estresse salino não uniforme (200 mM de NaCl em um lado). Ademais, os grupos C-S, C-S 2º ciclo e S 2º ciclo – S 2º ciclo não diferiram do ponto de vista estatístico nas variáveis de E e g_s (figura 3a e 3b), e por isso, constatamos que algumas características implicam na resposta de regulação estomática: a quantidade de raiz exposta à salinidade, a recorrência do estresse e as características intrínsecas de cada espécie.

Sobre os dados de eficiência do uso da água (A/E e A/g_s - figuras 3d e 3e), o S 2º ciclo – S 2º ciclo apresentou a maior capacidade de regulação estomática, com g_s diminuído e maior eficiência do uso da água, uma estratégia que foi observada em arroz (Moradi & Ismail, 2007) e milho (Stefanov et al., 2024) sob estresse salino. Em contrapartida, o tratamento S–S apresentou g_s elevado, mas índices de eficiência reduzidos, podendo ser explicados em razão do priming, que desencadeou uma maior abertura estomática dada pelo equilíbrio do uso da água. Isto evidencia duas estratégias distintas: uso conservador da água em condições de não recorrência de estresse e maior responsividade com certas compensações em condições de recorrência. Portanto, nossos resultados reforçam que a recorrência do estresse e a exposição das raízes à salinidade são determinantes nas trocas gasosas do sorgo.

O estresse salino diminuiu as variáveis de $\Phi PSII$ (figura 4b), ETR (figura 4c) e qP (figura 4d), enquanto aumentou NPQ dos tratamentos S-S e S 2º ciclo – S 2º ciclo (figura 4e) indicando que tanto o estresse bilateral recorrente quanto o não recorrente prejudicaram o aparato fotossintético e promoveram maior dissipação de energia na forma de calor.

Resultados semelhantes foram reportados por Netondo et al. (2004), que observaram redução de qP e ETR associado ao aumento significativo de NPQ em sorgo submetido a 200 mM de NaCl. Em milho, o ETR também foi reduzido sob estresse salino a partir de 150 mM (Stefanov et al., 2024), enquanto em arroz a diminuição do ETR foi acompanhada do aumento do NPQ sob estresse de 120 mM (Moradi & Ismail, 2007). Em conjunto, esses achados indicam que a redução da eficiência fotoquímica constituiu uma resposta típica ao estresse iônico, refletindo em um mecanismo fotoprotetor associado ao desvio do excesso de energia de excitação.

Notou-se ainda na variável de NPQ, que os tratamentos C-S e C-S 2º ciclo foram semelhantes estatisticamente ao C-C, indicando que a exposição parcial do sistema radicular mitigou o impacto nos mecanismos de fotoproteção. Isso está de acordo com observações em sorgo sob salinidade heterogênea em um sistema radicular dividido, em que a exposição não uniforme ao sal atenuou as reduções na fotossíntese e no teor de clorofila em comparação com a salinidade uniforme (Zhang et al., 2019). No entanto, os tratamentos que apresentaram aumento das taxas de NPQ (S-S e S 2º ciclo – S 2º ciclo), sugerem que o estresse mais severo ou espacialmente homogêneo promoveu aumento da dissipação de energia.

O aumento de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos tratamentos S-S e S 2º ciclo – S 2º ciclo perante os demais tratamentos (figura 5b) foi verificado. Aumentos semelhantes nos níveis de H_2O_2 foram previamente relatados em arroz exposto a 200 mM de NaCl (Rahman et al., 2016), em milho sob salinidade de 150 mM (Stefanov et al., 2024) e em genótipos de sorgo submetidos a 120 mM de NaCl (Rajabi et al., 2024). Em contraste, os tratamentos C-S e C-S 2º ciclo, nos quais apenas um dos compartimentos radiculares foi exposto ao estresse, mantiveram níveis de H_2O_2 semelhantes ao grupo C-C, sugerindo que a exposição parcial do sistema radicular não foi suficiente para desencadear um acúmulo de ERO. Esses resultados ressaltam a importância da área radicular exposta na modulação da sinalização oxidativa.

As respostas enzimáticas sustentaram ainda mais essa distinção, uma vez que no tratamento S-S, a atividade da SOD aumentou significativamente em comparação com os tratamentos não recorrentes (Figura 5c), assim como em outros estudos que mostram que o priming ao estresse salino aumenta a atividade da SOD em sorgo (Guo et al., 2022) e arroz sob déficit hídrico recorrente (Auler et al., 2021). Por outro lado, a atividade da POD atingiu o pico no tratamento S 2º ciclo – S 2º ciclo (Figura 5d), alinhando-se com o aumento da POD sob estresse salino agudo e não recorrente em sorgo (Punia et al., 2021b; Wang et al., 2022) e milho (Hu et al., 2022). Dessa forma, esses resultados sugerem que a SOD é preferencialmente aumentada durante as respostas de condicionamento ao estresse recorrente,

enquanto a POD predomina sob estresse não recorrente, evidenciando estratégias antioxidantes distintas.

O acúmulo de prolina também seguiu esse padrão, apresentando níveis significativamente mais elevados tanto no tratamento S-S quanto no S 2º ciclo – S 2º ciclo em comparação ao controle (Figura 5e). Esse aumento é sustentado por outros trabalhos em sorgo (Reddy et al., 2015; Guo et al., 2022) e milho (Köşkeroglu & Tuna, 2010) quando comparados grupos tratados e não tratados com sal. Yan et al. (2015) encontraram que o estresse salino aumentou o teor de prolina tanto nas plantas pré-tratadas quanto não pré-tratadas com o sal, o que justifica o acúmulo de prolina nos dois tratamentos, independente da recorrência do estresse. Além disso, a prolina é conhecida como um marcador fisiológico na resposta ao estresse salino, que quando acumulada, exerce um papel de proteção contra danos oxidativos (Abdelhamid et al., 2013). Em nossa pesquisa, sua elevação pareceu refletir uma resposta mais generalizada ao estresse do que um ajuste específico associado ao priming. Nos tratamentos C-S e C-S 2º ciclo, os níveis de prolina não diferiram estatisticamente nem do controle (C-C) nem das plantas totalmente estressadas (Figura 5e), sugerindo que as condições impostas pelo split-root promovem um acúmulo sistêmico parcial, porém insuficiente. É notável a falta de estudos que corroborem ou não com os dados obtidos utilizando o método split-root, sendo interessante alvo de pesquisas futuras.

A expressão reduzida de *APX1* nas folhas de sorgo em resposta ao sal (Figura 21), também foi vista nas folhas de tomate, cujos autores indicaram que essa expressão negativa de *APX1* estar relacionada a manutenção dos níveis altos de ERO, assim desencadeando uma resposta de tolerância ao sal (Rubio et al., 2017). Isto corrobora com os nossos achados, uma vez que no tratamento S-S houve forte aumento da concentração de H_2O_2 (figura 5b). É importante ressaltar que apesar do aumento de H_2O_2 também visto em S 2º ciclo – S 2º ciclo, para a expressão da *APX1*, este grupo não diferiu em relação aos níveis de expressão do tratamento C-C e, portanto, evidencia a diferença causada a partir do priming do estresse. Além disso, o gene *APX2* também teve sua expressão reduzida pelo estresse de salinidade em nosso trabalho, assim como em *Populus trichocarpa* (Leng et al., 2021).

Quanto aos sinais elétricos (figura 7 - 20), de maneira geral, os resultados das análises eletrofisiológicas revelaram padrões distintos de resposta ao estresse salino, considerando tanto a aplicação do NaCl de um ou ambos os lados da raiz, quanto a recorrência ou não do estresse. Destacou-se a diferença entre os tratamentos que passaram pelo estresse recorrente, exibindo respostas nos primeiros minutos de medição do electroma como no S-S e C-S, enquanto o C-S 2º ciclo apresentou resposta tardia ao sal e o S 2º ciclo – S 2º ciclo apresentou

baixa atividade bioelétrica, como se a planta estivesse sobrecarregada pelo estresse sem o efeito do priming quando aplicado de ambos os lados da raiz.

Alterações no eletroma, na frequência e na complexidade (ApEn) também foram observadas no tratamento C–C (figura 7), que não foi submetido ao estresse salino, mas permaneceu irrigado durante todo o experimento com solução nutritiva a 100% de força iônica, inclusive nos minutos que antecederam as medições do eletroma. Modificações semelhantes na complexidade bioelétrica já foram descritas em estudos com feijão sob solução nutritiva a 50% de força iônica, indicando que mesmo estímulos comuns e rotineiros, sem caráter estressante, podem desencadear alterações na atividade bioelétrica das plantas, as quais se refletem nos padrões do electroma (de Toledo et al., 2024).

No tratamento C–S, os resultados evidenciaram um pico imediato após a aplicação de NaCl, tanto na média do electroma quanto na média da FFT (figura 9). No entanto, por volta de 120 minutos, essa resposta apresentou tendência de queda, sugerindo um possível retorno da planta ao seu estado basal. Esse comportamento foi corroborado pela análise de ApEn, que indicou aumento da complexidade do sinal aproximadamente 25 minutos após a aplicação do estresse, seguido pelo restabelecimento da estabilidade após cerca de uma hora. Esse padrão sugere que, embora a planta responda prontamente ao estímulo salino inicial, ela dispõe de mecanismos regulatórios capazes de reestabelecer, ao longo do tempo, um estado eletrofisiológico mais próximo ao observado no controle.

Para o tratamento S–S (figura 11), observou-se que, após a aplicação do estresse, os valores médios se estabilizaram rapidamente, apresentando menor oscilação ao longo do tempo. Além disso, a atividade eletrofisiológica retornou ao estado basal após aproximadamente uma hora. Esses resultados indicam que, independentemente da aplicação do estresse em um ou em ambos os compartimentos radiculares, a resposta da planta ao estresse salino seguiu um padrão de adaptação relativamente rápido, sem alterações expressivas na dinâmica eletrofisiológica após o período inicial de ajuste. Esse achado corrobora a hipótese de que a planta é capaz de desenvolver um ajuste homeostático, modulando sua resposta frente a um segundo evento de estresse.

A dinâmica mais irregular e complexa observada nos tratamentos C-S e S-S foi corroborada por um estudo com feijões sob déficit hídrico, que sugeriu que sistemas que apresentam maior irregularidade em sua dinâmica podem possuir maior tolerância a perturbações ambientais, contribuindo para a estabilidade geral do sistema (Souza et al., 2005). Essa potencial estabilidade pode ter se refletido em nosso estudo pela tendência de diminuição da complexidade do sinal nesses tratamentos (Figuras 10 e 12), aproximando-se gradualmente dos valores observados antes da aplicação do estímulo.

Curiosamente, no grupo C-S 2º ciclo (figura 13), a resposta eletrofisiológica apresentou um padrão único e diferenciado dos demais tratamentos. Observou-se que a planta só passou a exibir uma resposta clara após aproximadamente 75 a 85 minutos da aplicação do sal. Esse atraso na resposta também foi visto de maneira evidente nas análises de complexidade (figura 14), indicando um atraso maior para o aumento da complexidade do sinal.

Contrariamente ao que foi visto no C-S 2º ciclo (figura 13), foi observada a redução drástica na atividade eletrofisiológica global, tanto no electroma quanto na frequência do tratamento S 2º ciclo – S 2º ciclo (figura 15). Embora os valores médios tenham se mantido próximos dos demais tratamentos, a dispersão dos dados foi menor, indicando uma menor variabilidade na resposta elétrica. Além disso, entre 70 e 100 minutos após a aplicação do estresse, a variabilidade do electroma reduziu-se significativamente, sugerindo uma estabilização da resposta. No entanto, as análises baseadas em complexidade (figura 16) não indicaram grandes alterações na complexidade do sinal, reforçando a ideia de que a dinâmica eletrofisiológica da planta manteve um padrão relativamente consistente mesmo que a dinâmica iônica tenha se modificado. Em outras palavras, apesar das características físicas do sinal se alterarem, a informação contida não se alterou.

Ao fazer o comparativo entre os tratamentos C-S (figura 9) e C-S 2º ciclo (figura 13), tornou-se clara a alteração no comportamento eletrofisiológico: no estresse recorrente (C-S), foi verificado aumento imediato da atividade eletrofisiológica logo após a aplicação do NaCl, enquanto no estresse não recorrente (C-S 2º ciclo) a resposta só se tornou evidente após aproximadamente 80 minutos. Esse atraso reitera a hipótese de uma resposta adaptativa ao segundo evento de estresse, sugerindo que a planta respondeu imediatamente ao estresse recorrente.

Por fim, ao comparar os tratamentos S-S e S 2º ciclo – S 2º ciclo (figura 11 e 15), verificou-se que a atividade eletrofisiológica inicial foi maior no S-S, sugerindo um impacto mais acentuado na dinâmica elétrica da planta nos primeiros minutos após a aplicação do sal. Em contrapartida, no S 2º ciclo – S 2º ciclo, a resposta inicial foi extremamente baixa, mas apresentou picos mais expressivos após aproximadamente 50 minutos, especialmente na amplitude máxima do electroma. Tais respostas evidenciam a diferença entre os tratamentos de estresse recorrente e não recorrente. Esse padrão confirmou que a recorrência do estresse do tratamento S-S pode modificar a responsividade inicial da planta, como também foi visto em C-S.

Portanto, nossos resultados bioelétricos precoces e estruturados dos grupos S-S e C-S após a aplicação de sal, incluíram aumento na complexidade do sinal (ApEn) e modulações na autocorrelação temporal (DFA) e na imprevisibilidade do sistema (expoente de Lyapunov)

(Figuras 9,10,11 e 12). Esses padrões foram retardados (C-S 2º ciclo) ou suprimidos (S 2º ciclo – S 2º ciclo), indicando que tanto a recorrência do estresse quanto a exposição bilateral das raízes foram necessárias para desencadear respostas bioelétricas rápidas e complexas.

Ao entrelaçar todos os dados, em situações de estresse recorrente, respostas elétricas mais rápidas foram acompanhadas por maior condutância estomática e transpiração (Figura 3), aumento da atividade da SOD (Figura 5c) e agrupamento distinto na PCA (Figura 6). Por outro lado, em situações de estresse não recorrente, respostas elétricas tardias ou atenuadas foram paralelas a reduções em E e g_s , aumento da atividade da POD (Figura 5d) e maior acúmulo de prolina (Figura 5e), o que é consistente com a percepção do estresse sem sensibilização prévia. A adaptação eletrofisiológica ocorrida propôs a existência de um mecanismo de memória, que influenciou na forma como a planta respondeu ao estresse recorrente, antecipando a resposta inicial, mas mantendo a complexidade estrutural da atividade elétrica ao longo do tempo. Volkov et al. (2008) foram os primeiros e únicos a encontrarem memória, neste caso na dioneia (*Venus flytrap*), ao aplicarem repetidamente estímulos elétricos. Por isso, nosso trabalho torna-se relevante ao indicar que um efeito de priming/memória, tornando a planta mais sensível, também pode ter sido vista em *Sorghum bicolor* apontada pelos sinais elétricos nos tratamentos de estresse salino recorrente. Novos trabalhos tornam-se cruciais para o crescimento da área de eletrofisiologia, bem como trabalhos que possuam a proposta de analisar os efeitos do estresse recorrente, tanto resposta local quanto sistêmica.

8. CONCLUSÃO

Nosso estudo revelou que o estresse salino recorrente e aplicado de ambos os lados da raiz do sorgo pode ter gerado priming no tratamento S-S, sensibilizando principalmente as variáveis de trocas gasosas e então promovendo ajustes fisiológicos, bioquímicos e elétricos para eventos posteriores. Essa responsividade gerada pela recorrência do estresse pode desencadear um processo de aclimação. A aplicação da técnica de split-root nos outros tratamentos trouxe a possibilidade da atenuação dos efeitos da salinidade pela porção da raiz não estressada.

REFERÊNCIAS

- Abbasi, H., Jamil, M., Haq, A., Ali, S., Ahmad, R., Malik, Z., & Parveen, Z. (2016). Salt stress manifestation on plants, mechanism of salt tolerance and potassium role in alleviating it: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*, 103(2), 229-238.
- Abdelhamid, M. T., Rady, M. M., Osman, A. S., & Abdalla, M. A. (2013). Exogenous application of proline alleviates salt-induced oxidative stress in *Phaseolus vulgaris* L. plants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(4), 439-446.
- Akbudak, M. A., Filiz, E., Vatansever, R., & Kontbay, K. (2018). Genome-wide identification and expression profiling of ascorbate peroxidase (APX) and glutathione peroxidase (GPX) genes under drought stress in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 37, 925-936.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12), 1337-1344.
- Alkharabsheh, H. M., Seleiman, M. F., Hewedy, O. A., Battaglia, M. L., Jalal, R. S., Alhammad, B. A., ... & Al-Doss, A. (2021). Field crop responses and management strategies to mitigate soil salinity in modern agriculture: A review. *Agronomy*, 11(11), 2299.
- Amaral, M. N., Auler, P. A., Rossatto, T., Barros, P. M., Oliveira, M. M., & Braga, E. J. B. (2020a). Long-term somatic memory of salinity unveiled from physiological, biochemical and epigenetic responses in two contrasting rice genotypes. *Physiologia plantarum*, 170(2), 248-268.
- Amaral, M. N., Arge, L. W. P., Auler, P. A., Rossatto, T., Milech, C., Magalhães, A. M. D., & Braga, E. J. B. (2020b). Long-term transcriptional memory in rice plants submitted to salt shock. *Planta*, 251, 1-16.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55(1), 373-399.

Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 64-77.

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*, 50(1), 601-639.

Auler, P. A., Souza, G. M., da Silva Engela, M. R. G., do Amaral, M. N., Rossatto, T., da Silva, M. G. Z., ... & Braga, E. J. B. (2021). Stress memory of physiological, biochemical and metabolomic responses in two different rice genotypes under drought stress: The scale matters. *Plant Science*, 311, 110994.

Avramova, Z. (2015). Transcriptional ‘memory’ of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *The Plant Journal*, 83(1), 149-159.

Balasubramaniam, T., Shen, G., Esmacili, N., & Zhang, H. (2023). Plants’ response mechanisms to salinity stress. *Plants*, 12(12), 2253.

Bates, L.S., Waldern, R.P., Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207.

Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.

Begcy, K., Mariano, E. D., Mattiello, L., Nunes, A. V., Mazzafera, P., Maia, I. G., & Menossi, M. (2011). An *Arabidopsis* mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants. *PloS one*, 6(8), e23776.

Bluestein, L. (1970). A linear filtering approach to the computation of discrete Fourier transform. *IEEE Transactions on Audio and Electroacoustics*, 18(4), 451-455.

Bor, M., Özdemir, F., & Türkan, I. (2003). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant science*, 164(1), 77-84.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Bruce, T. J., Matthes, M. C., Napier, J. A., & Pickett, J. A. (2007). Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant science*, 173(6), 603-608.

Calvo, P., Gagliano, M., Souza, G. M., & Trewavas, A. (2020). Plants are intelligent, here’s how. *Annals of botany*, 125(1), 11-28.

Chang, C. C. C., Ball, L., Fryer, M. J., Baker, N. R., Karpinski, S., & Mullineaux, P. M. (2004). Induction of ASCORBATE PEROXIDASE 2 expression in wounded *Arabidopsis* leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *The Plant Journal*, 38(3), 499-511.

Choi, W. G., Miller, G., Wallace, I., Harper, J., Mittler, R., & Gilroy, S. (2017). Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with Ca^{2+} , ROS and electrical signals. *The Plant Journal*, 90(4), 698-707.

Choudhury, F. K., Devireddy, A. R., Azad, R. K., Shulaev, V., & Mittler, R. (2018). Local and systemic metabolic responses during light-induced rapid systemic signaling. *Plant physiology*, 178(4), 1461-1472.

Considine, M. J., Goodman, M., Echtay, K. S., Laloi, M., Whelan, J., Brand, M. D., & Sweetlove, L. J. (2003). Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is

related to the activity of uncoupling protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22298-22302.

Costa, Á. V. L., Oliveira, T. F. D. C., Posso, D. A., Reissig, G. N., Parise, A. G., Barros, W. S., & Souza, G. M. (2023). Systemic signals induced by single and combined abiotic stimuli in common bean plants. *Plants*, 12(4), 924.

Crisp, P. A., Ganguly, D., Eichten, S. R., Borevitz, J. O., & Pogson, B. J. (2016). Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science advances*, 2(2), e1501340.

Davletova, S., Rizhsky, L., Liang, H., Shengqiang, Z., Oliver, D. J., Coutu, J., ... & Mittler, R. (2005). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 17(1), 268-281.

Devi, S. R., & Prasad, M. N. V. (1998). Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L.(Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant science*, 138(2), 157-165.

Devireddy, A. R., Zandalinas, S. I., Gómez-Cadenas, A., Blumwald, E., & Mittler, R. (2018). Coordinating the overall stomatal response of plants: rapid leaf-to-leaf communication during light stress. *Science Signaling*, 11(518), eaam9514.

Devireddy, A. R., Arbogast, J., & Mittler, R. (2020). Coordinated and rapid whole-plant systemic stomatal responses. *The New Phytologist*, 225(1), 21-25.

Eckmann, J. P. (1987). Liapunov exponents from time series. *Physical Review A*, 4(9), 973-977.

Fichman, Y., Miller, G., & Mittler, R. (2019). Whole-plant live imaging of reactive oxygen species. *Molecular Plant*, 12(9), 1203-1210.

Fichman, Y., & Mittler, R. (2020). Rapid systemic signaling during abiotic and biotic stresses: is the ROS wave master of all trades?. *The Plant Journal*, 102(5), 887-896.

Fleta-Soriano, E., & Munné-Bosch, S. (2016). Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7, 143.

Fromm, J., Hajirezaei, M. R., Becker, V. K., & Lautner, S. (2013). Electrical signaling along the phloem and its physiological responses in the maize leaf. *Frontiers in Plant Science*, 4, 239.

Fromm, J., & Lautner, S. (2007). Electrical signals and their physiological significance in plants. *Plant, cell & environment*, 30(3), 249-257.

Galviz, Y. C., Ribeiro, R. V., & Souza, G. M. (2020). Yes, plants do have memory. *Theoretical and experimental plant physiology*, 32(3), 195-202.

Gilroy, S., Białasek, M., Suzuki, N., Górecka, M., Devireddy, A. R., Karpiński, S., & Mittler, R. (2016). ROS, calcium, and electric signals: key mediators of rapid systemic signaling in plants. *Plant physiology*, 171(3), 1606-1615.

Guo, X., Zhi, W., Feng, Y., Zhou, G., & Zhu, G. (2022). Seed priming improved salt-stressed sorghum growth by enhancing antioxidative defense. *Plos one*, 17(2), e0263036.

Hardstone, R., Poil, S. S., Schiavone, G., Jansen, R., Nikulin, V. V., Mansvelder, H. D., & Linkenkaer-Hansen, K. (2012). Detrended fluctuation analysis: a scale-free view on neuronal oscillations. *Frontiers in physiology*, 3, 450.

Harris, C. R., Millman, K. J., Van Der Walt, S. J., Gommers, R., Virtanen, P., Cournapeau, D., ... & Oliphant, T. E. (2020). Array programming with NumPy. *Nature*, 585(7825), 357-362.

Hasanuzzaman, M., Raihan, M. R. H., Masud, A. A. C., Rahman, K., Nowroz, F., Rahman, M., ... & Fujita, M. (2021). Regulation of reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under salinity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9326.

Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.

Helleman, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2).

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.

Hu, D., Li, R., Dong, S., Zhang, J., Zhao, B., Ren, B., ... & Liu, P. (2022). Maize (*Zea mays* L.) responses to salt stress in terms of root anatomy, respiration and antioxidative enzyme activity. *BMC plant biology*, 22(1), 602.

Huber, A. E., & Bauerle, T. L. (2016). Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. *Journal of Experimental Botany*, 67(7), 2063-2079.

Hunter, J. D. (2007). Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in science & engineering*, 9(03), 90-95.

Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. (2019). Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Frontiers in plant science*, 10, 80.

Johns, S., Hagihara, T., Toyota, M., & Gilroy, S. (2021). The fast and the furious: rapid long-range signaling in plants. *Plant Physiology*, 185(3), 694-706.

Kamanga, R. M., Echigo, K., Yodoya, K., Mekawy, A. M. M., & Ueda, A. (2020). Salinity acclimation ameliorates salt stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings by triggering a cascade of physiological processes in the leaves. *Scientia Horticulturae*, 270, 109434.

Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., & Mullineaux, P. (1999). Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *science*, 284(5414), 654-657.

Kollist, H., Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Nuhkat, M., Kangasjärvi, J., & Mittler, R. (2019). Rapid responses to abiotic stress: priming the landscape for the signal transduction network. *Trends in plant science*, 24(1), 25-37.

Köşkeroğlu, S., & Tuna, A. L. (2010). The investigation on accumulation levels of proline and stress parameters of the maize (*Zea mays* L.) plants under salt and water stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32, 541-549.

Kozlova, E., Yudina, L., Sukhova, E., & Sukhov, V. (2025). Analysis of Electrome as a Tool for Plant Monitoring: Progress and Perspectives. *Plants*, 14(10), 1500.

Larrainzar, E., Gil-Quintana, E., Arrese-Igor, C., González, E. M., & Marino, D. (2014). Split-root systems applied to the study of the legume-rhizobial symbiosis: What have we learned?. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(12), 1118-1124.

Leng, X., Wang, H., Zhang, S., Qu, C., Yang, C., Xu, Z., & Liu, G. (2021). Identification and characterization of the APX gene family and its expression pattern under phytohormone treatment and abiotic stress in *Populus trichocarpa*. *Genes*, 12(3), 334.

- Liu, H., Able, A. J., & Able, J. A. (2022). Priming crops for the future: rewiring stress memory. *Trends in plant science*, 27(7), 699-716.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Marsalis, M. A., Angadi, S. V., & Contreras-Govea, F. E. (2010). Dry matter yield and nutritive value of corn, forage sorghum, and BMR forage sorghum at different plant populations and nitrogen rates. *Field Crops Research*, 116(1-2), 52-57.
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345), 659-668.
- McKinney, W. (2010). Data structures for statistical computing in Python. *SciPy*, 445(1), 51-56.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., ... & Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science signaling*, 2(84), ra45-ra45.
- Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science*, 11(1), 15-19.
- Moradi, F., & Ismail, A. M. (2007). Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and ROS-scavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. *Annals of botany*, 99(6), 1161-1173.

- Mullineaux, P. M., Karpinski, S., & Baker, N. R. (2006). Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants. *Plant Physiology*, 141(2), 346-350.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New phytologist*, 167(3), 645-663.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59(1), 651-681.
- Mushtaq, Z., Faizan, S., & Gulzar, B. (2020). Salt stress, its impacts on plants and the strategies plants are employing against it: A review. *J. Appl. Biol. Biotechnol*, 8(3), 81-91.
- Netondo, G. W., Onyango, J. C., & Beck, E. (2004). Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop science*, 44(3), 806-811.
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., & Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. *Environmental and experimental botany*, 94, 46-56.
- Panchuk, I. I., Volkov, R. A., & Schöffl, F. (2002). Heat stress-and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 129(2), 838-853.
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., ... & Duchesnay, É. (2011). Scikit-learn: Machine learning in Python. *the Journal of machine Learning research*, 12, 2825-2830.
- Pegorin, P., Rabelo Schley, T., Rossini, B. C., Araújo Júnior, J. P., & de Almeida, L. F. R. (2025). Stress priming enhances drought response in *Sorghum bicolor* potentially involving PIP2; 5. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 37(1), 1-17.
- Peng, C. K., Havlin, S., Stanley, H. E., & Goldberger, A. L. (1995). Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos: an interdisciplinary journal of nonlinear science*, 5(1), 82-87.

Pincus, S. M. (1991). Approximate entropy as a measure of system complexity. *Proceedings of the national academy of sciences*, 88(6), 2297-2301.

Pnueli, L., Liang, H., Rozenberg, M., & Mittler, R. (2003). Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (Apx1)-deficient Arabidopsis plants. *The Plant Journal*, 34(2), 187-203.

Punia, H., Tokas, J., Malik, A., Sangwan, S., Rani, A., Yashveer, S., ... & El-Sheikh, M. A. (2021b). Genome-wide transcriptome profiling, characterization, and functional identification of NAC transcription factors in sorghum under salt stress. *Antioxidants*, 10(10), 1605.

Punia, H., Tokas, J., Malik, A., Singh, S., Phogat, D. S., Bhuker, A., ... & Sheokand, R. N. (2021a). Discerning morpho-physiological and quality traits contributing to salinity tolerance acquisition in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *South African Journal of Botany*, 140, 409-418.

Rahman, A., Nahar, K., Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2016). Calcium supplementation improves Na⁺/K⁺ ratio, antioxidant defense and glyoxalase systems in salt-stressed rice seedlings. *Frontiers in plant science*, 7, 609.

Rajabi Dehnavi, A., Zahedi, M., & Piernik, A. (2024). Understanding salinity stress responses in sorghum: exploring genotype variability and salt tolerance mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1296286.

Reddy, P. S., Jageswar, G., Rasineni, G. K., Maheswari, M., Reddy, A. R., Varshney, R. K., & Kishor, P. K. (2015). Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 104-113.

Reissig, G. N., de Carvalho Oliveira, T. F., Parise, A. G., Costa, Á. V. L., Posso, D. A., Rombaldi, C. V., & Souza, G. M. (2023). Approximate entropy: a promising tool to understand the hidden electrical activity of fruit. *Communicative & Integrative Biology*, 16(1), 2195236.

Redwan, M., Spinelli, F., Marti, L., Bazihizina, N., Azzarello, E., Mancuso, S., & Masi, E. (2017). Investigation of root signaling under heterogeneous salt stress: A case study for *Cucumis sativus* L. *Environmental and Experimental Botany*, 143, 20-28.

Richman, J. S., & Moorman, J. R. (2000). Physiological time-series analysis using approximate entropy and sample entropy. *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*, 278(6), H2039-H2049.

Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., & Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant physiology*, 134(4), 1683-1696.

Rossatto, T., Souza, G. M., do Amaral, M. N., Auler, P. A., Pérez-Alonso, M. M., Pollmann, S., & Braga, E. J. B. (2023). Cross-stress memory: Salt priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought stress during grain-filling in rice plants. *Environmental and Experimental Botany*, 206, 105187.

Rubio, M. B., Hermosa, R., Vicente, R., Gómez-Acosta, F. A., Morcuende, R., Monte, E., & Bettioli, W. (2017). The combination of *Trichoderma harzianum* and chemical fertilization leads to the deregulation of phytohormone networking, preventing the adaptive responses of tomato plants to salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 8, 294.

Saiz-Fernández, I., Černý, M., Skalák, J., & Brzobohatý, B. (2021). Split-root systems: detailed methodology, alternative applications, and implications at leaf proteome level. *Plant Methods*, 17, 1-19.

Schiratti, J. B., Le Douget, J. E., Le Van Quyen, M., Essid, S., & Gramfort, A. (2018, April). An ensemble learning approach to detect epileptic seizures from long intracranial EEG recordings. In *2018 IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing (ICASSP)* (pp. 856-860). IEEE.

Segundo-Ortin, M., & Calvo, P. (2022). Consciousness and cognition in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, 13(2), e1578.

Souza, G. M., Pincus, S. M., & Monteiro, J. A. F. (2005). The complexity-stability hypothesis in plant gas exchange under water deficit. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 363-373.

Stefanov, M. A., Rashkov, G. D., Borisova, P. B., & Apostolova, E. L. (2024). Changes in photosystem II complex and physiological activities in pea and maize plants in response to salt stress. *Plants*, 13(7), 1025.

Stone, H. S. (1966). R66-50 an algorithm for the machine calculation of complex fourier series. *IEEE Transactions on Electronic Computers*, (4), 680-681.

Sukhov, V., Surova, L., Sherstneva, O., Bushueva, A., & Vodeneev, V. (2015). Variation potential induces decreased PSI damage and increased PSII damage under high external temperatures in pea. *Functional Plant Biology*, 42(8), 727-736.

Suzuki, N., Miller, G., Salazar, C., Mondal, H. A., Shulaev, E., Cortes, D. F., ... & Mittler, R. (2013). Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants. *The Plant Cell*, 25(9), 3553-3569.

Szechyńska-Hebda, M., Lewandowska, M., & Karpiński, S. (2017). Electrical signaling, photosynthesis and systemic acquired acclimation. *Frontiers in physiology*, 8, 684.

de Toledo, G. R., Reissig, G. N., Senko, L. G., Pereira, D. R., da Silva, A. F., & Souza, G. M. (2024). Common bean under different water availability reveals classifiable stimuli-specific signatures in plant electrome. *Plant Signaling & Behavior*, 19(1), 2333144.

- Teisseire, H., & Guy, V. (2000). Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant science*, 153(1), 65-72.
- Torres, L. F., de Andrade, S. A. L., & Mazzafera, P. (2021). Split-root, grafting and girdling as experimental tools to study root-to shoot-to root signaling. *Environmental and Experimental Botany*, 191, 104631.
- Ullah, A., Bano, A., & Khan, N. (2021). Climate change and salinity effects on crops and chemical communication between plants and plant growth-promoting microorganisms under stress. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 618092.
- Umair Hassan, M., Chattha, M. U., Khan, I., Khan, T. A., Nawaz, M., Tang, H., ... & Guoqin, H. (2024). Zinc seed priming alleviates salinity stress and enhances sorghum growth by regulating antioxidant activities, nutrient homeostasis, and osmolyte synthesis. *Agronomy*, 14(8), 1815.
- Van Rossum, G.; Drake, F. L. (2009). *Python 3 Reference Manual*; CreateSpace. Scotts Valley, CA: CreateSpace.
- Vennam, R. R., Bheemanahalli, R., Reddy, K. R., Dhillon, J., Zhang, X., & Adeli, A. (2024). Early-season maize responses to salt stress: Morpho-physiological, leaf reflectance, and mineral composition. *Journal of Agriculture and Food Research*, 15, 100994.
- Virtanen, P., Gommers, R., Oliphant, T. E., Haberland, M., Reddy, T., Cournapeau, D., ... & Van Mulbregt, P. (2020). SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature methods*, 17(3), 261-272.
- Volkov, A. G., Carrell, H., Adesina, T., Markin, V. S., & Jovanov, E. (2008). Plant electrical memory. *Plant signaling & behavior*, 3(7), 490-492.

- Wang, Z., Wei, Y., Zhao, Y., Wang, Y., Zou, F., Huang, S., ... & Hu, H. (2022). Physiological and transcriptional evaluation of sweet sorghum seedlings in response to single and combined drought and salinity stress. *South African Journal of Botany*, 146, 459-471.
- Xia, J., Sinelnikov, I. V., Han, B., & Wishart, D. S. (2015). MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic acids research*, 43(W1), W251-W257.
- Yan, K., Xu, H., Cao, W., & Chen, X. (2015). Salt priming improved salt tolerance in sweet sorghum by enhancing osmotic resistance and reducing root Na⁺ uptake. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1-10.
- Yudina, L., Sukhova, E., Popova, A., Zolin, Y., Abasheva, K., Grebneva, K., & Sukhov, V. (2023). Hyperpolarization electrical signals induced by local action of moderate heating influence photosynthetic light reactions in wheat plants. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1153731.
- Yu, B., Liu, N., Tang, S., Qin, T., & Huang, J. (2022). Roles of glutamate receptor-like channels (GLRs) in plant growth and response to environmental stimuli. *Plants*, 11(24), 3450.
- Zandalinas, S. I., & Mittler, R. (2018). ROS-induced ROS release in plant and animal cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 21-27.
- Zandalinas, S. I., Fichman, Y., Devireddy, A. R., Sengupta, S., Azad, R. K., & Mittler, R. (2020). Systemic signaling during abiotic stress combination in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(24), 13810-13820.
- Zandalinas, S. I., Sengupta, S., Burks, D., Azad, R. K., & Mittler, R. (2019). Identification and characterization of a core set of ROS wave-associated transcripts involved in the systemic acquired acclimation response of Arabidopsis to excess light. *The Plant Journal*, 98(1), 126-141.
- Zhang, H., Wang, R., Wang, H., Liu, B., Xu, M., Guan, Y. A., ... & Zhou, Y. (2019). Heterogeneous root zone salinity mitigates salt injury to *Sorghum bicolor* (L.) Moench in a split-root system. *PLoS One*, 14(12), e0227020.

Zhao, S., Zhang, Q., Liu, M., Zhou, H., Ma, C., & Wang, P. (2021). Regulation of plant responses to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4609.

Zimmermann, M. R., Maischak, H., Mithöfer, A., Boland, W., & Felle, H. H. (2009). System potentials, a novel electrical long-distance apoplastic signal in plants, induced by wounding. *Plant physiology*, 149(3), 1593-1600.