

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal



Tese

**Memória do estresse em plantas de arroz (BRS-AG) submetidas a
estresse recorrente (sal) e cruzado (sal e seca)**

Tatiana Rossatto

Pelotas, 2021

Tatiana Rossatto

Memória do estresse em plantas de arroz (BRS-AG) submetidas a estresse recorrente (sal) e cruzado (sal e seca)

Tese apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Fisiologia Vegetal da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Doutora em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Co-orientadores: Dr. Gustavo Maia Souza

Dr. Luciano da Silva Pinto

Dr. Stephan Pollmann

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R111m Rossatto, Tatiana

Memória do estresse em plantas de arroz (BRS-AG) submetidas a estresse recorrente (sal) e cruzado (sal e seca) / Tatiana Rossatto; Eugenia Jacira Bolacel Braga, orientadora; Gustavo Maia Souza, Stephan Pollmann, coorientadores. — Pelotas, 2021.

186 f.: il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Estresse abiótico. 2. Fonte-dreno. 3. Hormônios. 4. Metabolômica. 5. *Oryza sativa* (L). 6. Tolerância cruzada. I. Braga, Eugenia Jacira Bolacel, orient. II. Souza, Gustavo Maia, coorient. III. Pollmann, Stephan, coorient. IV. Título.

CDD: 633.18

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Tatiana Rossatto

Memória do estresse em plantas de arroz (BRS-AG) submetidas a estresse recorrente (sal) e cruzado (sal e seca)

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Fisiologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 14/05/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr^a. Eugenia Jacira Bolacel Braga (Orientador)

Doutora em Biotecnologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Raul Antonio Sperotto

Doutor em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr^a. Vanessa Galli

Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Luciano do Amarante

Doutor em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas

Agradecimentos

A Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

A minha família, pelo apoio incondicional, por sempre me incentivarem, e entenderem as minhas faltas e momentos de afastamento. Sem vocês eu não teria chagado até aqui, muito obrigada por tudo.

Agradeço a Professora Dr^a Eugenia Jacira Bolacel Braga pelos ensinamentos, por sempre estar disposta a me ajudar e por sempre ter me incentivado a buscar sempre mais. E principalmente pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho. Aos meus co-orientadores, Professor Gustavo Maia Souza e Luciano da Silva Pinto, pelos ensinamentos, e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Agradeço de forma imensa o Dr. Stephan Pollmann por ter aceitado que eu fizesse meu doutorado sanduíche no Centro de Biotecnologia e Genômica de Plantas (CGBP), pelos ensinamentos e acompanhamento das atividades, que contribuíram para o meu crescimento e amadurecimento científico e pessoal. Além disso, agradeço às amigadas que se formaram ao longo desse período: Bruna Fernanda, Vero Jiménez e Ivan Vite. Ter conhecido e convivido com vocês fez esse período ser ainda mais enriquecedor.

Aos colegas e amigos do PPGFV da UFPel por todo apoio intelectual e psicológico ao longo dessa caminhada. Em especial, agradeço a Cristini Milech, Priscila Ariane Auler e Elsa Kunh Klumb, pela amizade, ensinamentos e pelos momentos de apoio nas fases difíceis. Obrigada por tudo gurias, vocês são muito importantes pra mim. Ao meu amigo Marcelo Nogueira do Amaral, pela ajuda nos experimentos e nas trocas de conhecimentos, obrigado por ter me ensinado tanto. A Simone, Renata, Chris e Lili pelo ótimo convívio em ambiente de trabalho e pela amizade que se criou.

Ao meu namorado Geovandro Wolfart, pela amizade, amor, apoio e incentivo ao longo dessa caminhada. Principalmente por entender os momentos de afastamento e pela paciência em momentos em que eu estava com altos níveis de ansiedade. Tua ajuda, mesmo que indireta, contribuiu muito para esse momento.

Agradeço também a Daiane Machado Souza por ter sido uma grande amiga que cruzou meu caminho, tua amizade e apoio contribuíram muito para esse momento. Agradeço a minha amiga de longa data Camila Besold, teu apoio e incentivo fizeram toda a diferença para que os momentos difíceis fossem mais leves.

A todos os colegas e professores da Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pelos estudos, conselhos e amizade. E à agência CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

Resumo

ROSSATTO, Tatiana. **Memória do estresse em plantas de arroz (BRS-AG) submetidas a estresse recorrente (sal) e cruzado (sal e seca)** 2021. 186f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Estresses abióticos estão entre os fatores mais limitantes do crescimento e da produtividade de plantas, sendo a salinidade e o déficit hídrico dois dos principais responsáveis por essa limitação. A maioria desses estímulos é transitório, e uma vez passados, as plantas podem se recuperar. No entanto, a recuperação pode não ser completa e ocorrer uma reorganização do metabolismo. Estudos sugerem que o armazenamento de informações sobre um evento de estresse passado pode beneficiar as plantas preparando-as para estímulos recorrentes, ou de naturezas diferentes (cruzados), fenômeno associado à produção de memória em plantas. Alguns mecanismos moleculares que sustentam a memória das plantas já foram elucidados. O primeiro ocorre pelo acúmulo de metabólitos de sinalização ou fatores de transcrição, conhecido como memória fisiológica/molecular, e o segundo mecanismo se refere à memória epigenética. Com isso, objetivou-se com esse trabalho avaliar a estabilidade de dez genes de referência, de modo a identificar os mais adequados para a normalização da transcrição em plantas de arroz da cv. BRS AG, além de desvendar mecanismos moleculares, bioquímicos, ômicos e fisiológicos associados à memória somática de longo prazo em plantas de arroz submetidas a diferentes condições de estresse recorrente (sal) e estresse cruzado (sal x déficit hídrico). No primeiro estudo, foi demonstrado que em plantas de arroz submetidas a diferentes condições de estresse salino, os genes *UBC-E2* e *GAPDH* podem ser usados como genes normalizadores em folhas, *UBQ5* e *UBQ10* em bainha, *TIP41* e *UBQ10* em ráquis e *TIP41* e *cyclophilin* para os grãos em todas as condições testadas. Por outro lado, os genes *cyclophilin*, *β-tubulin*, *EeF1α* e *ACT11* não apresentam estabilidade de expressão, não sendo indicados. No segundo estudo foi observado que plantas de arroz da cv. BRS AG, expostas a estresse salino recorrente, apresentam respostas fisiológicas, bioquímicas, moleculares e anatômicas distintas de plantas submetidas à salinidade pela primeira vez, no estágio de enchimento de grãos, ou seja, reagem de forma distinta quanto à capacidade de transportar e utilizar a sacarose nos grãos, e quanto à capacidade de mitigar os efeitos ocasionados pelo estresse salino. No terceiro estudo, observamos que o estresse prévio (sal) altera as respostas transcricionais, fisiológicas e hormonais a um segundo evento com seca em plantas de arroz, relacionado com possíveis respostas de tolerância cruzada de longo prazo. Os resultados dos três estudos permitiram novos *insights* sobre os mecanismos de memória e/ou tolerância cruzada em plantas de arroz, além de uma melhor compreensão dos processos envolvidos na tolerância à seca e à salinidade.

Palavras-Chave: Estresse abiótico. Fonte-dreno. Hormônios. Metabolômica. *Oryza sativa* (L). Tolerância cruzada

Abstract

ROSSATTO, Tatiana. **Stress memory in rice plants (BRS-AG) subjected to recurrent (salt) and cross stress (salt and drought)** 2021. 186f. Thesis (doctoral) – Graduate Program in Plant Physiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Abiotic stresses are among the most limiting factors of plant growth and productivity, being salinity and water deficit the main factors responsible for this limitation. Most of these stimuli are transient and, once passed, the plants can recover. However, recovery may not be complete and metabolism may be reorganized. Studies suggest that storing information about a past stress event can benefit plants by preparing them for recurrent or different (crossover) stimuli, a phenomenon associated with the production of memory in plants. Some molecular mechanisms that support the plants memory have already been elucidated. The first is the accumulation of signaling metabolites or transcription factors, known as physiological/molecular memory, and the second mechanism refers to epigenetic memory. The aims of this work was to evaluate the stability of ten reference genes, in order to identify the most suitable for the normalization of transcription in rice plants, cv. BRS AG, submitted to different salt stress conditions, besides the present study focused on the discovery of, molecular, biochemical, omic and physiological mechanisms associated with long-term somatic memory in rice plants submitted to recurrent salt stress and cross stress (salt x drought). In the first study, it was demonstrated that in rice plants subjected to different salt stress conditions, the *UBC-E2* and *GAPDH* genes can be used as normalizing genes in leaves, *UBQ5* and *UBQ10* in sheaths, *TIP41* and *UBQ10* in rachis and *TIP41* and *cyclophilin* for grains in all conditions tested. On the other hand, the *cyclophilin*, β -*tubulin*, *EeF1 α* and *ACT11* genes, showed no stability expression, and they are not indicated. In the second study it was observed that rice plants, cv. BRS AG, exposed to recurrent salt stress present different physiological, biochemical, molecular and anatomical responses of plants submitted to salinity for the first time in the grain filling stage, that is, they react differently in terms of the ability to transport and use sucrose in the grains, and the ability to mitigate the effects caused by salt stress. In the third study, we observed that previous stress (salt) alters transcriptional, physiological and hormonal responses to a second drought event in rice plants, related to possible long-term cross-tolerance responses. The results of the three studies allowed new insights into memory mechanisms and/or cross-tolerance in rice plants, as well as a better understanding of the processes involved in the tolerance to salinity and drought stress.

Keywords: Abiotic stress. Cross-stress tolerance. Hormones. Metabolomics. *Oryza sativa* (L). Source-sink

Lista de Figuras

Artigo I - Selection of Reference Genes for RT-qPCR Studies in Different Organs of Rice Cultivar BRS AG Submitted to Recurrent Saline Stress

- Figure 1 Stability of expression of ten candidate reference genes in leaves of rice, cv. BRS AG, submitted to different treatments, according to comparative ΔCt (a), BestKeeper (b), NormFinder (c), geNorm (d) and RefFinder (e). The treatments were: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage.....55
- Figure 2 Stability of expression of ten candidate reference genes in the sheath of rice, cv. BRS AG, submitted to different treatments, according to comparative ΔCt (a), BestKeeper (b), NormFinder (c), geNorm (d) and RefFinder (e). The treatments were: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage.....56
- Figure 3 Stability of expression of ten candidate reference genes in the rachis of rice, cv. BRS AG, submitted to different treatments, according to comparative ΔCt (a), BestKeeper (b), NormFinder (c), geNorm (d) and RefFinder (e). The treatments were: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage.....57

Figure 4 Stability of expression of ten candidate reference genes in the grain of rice, cv. BRS AG, submitted to different treatments, according to comparative ΔC_t (a), BestKeeper (b), NormFinder (c), geNorm (d) and RefFinder (e). The treatments were: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage.....58

Figure 5 RT-qPCR quantification cycle values of ten candidate reference genes in leaves (a), sheaths (b), rachises (c) and grains (d) of rice cv. BRS AG, under the different treatments: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage. The lower quartile is the value for 25% of the sample. The upper quartile is the value for 75% of the sample. The edges indicate the maximum and minimum values. The bigger the box, the greater the variation.....59

Figure 6 Pairwise variation (V) calculated by the geNorm algorithm to determine the minimum number of reference genes for proper normalisation in leaves (a), sheaths (b), rachises (c) and grains (d) of rice cv. BRS AG, under the different treatments: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, Irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, Irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, Irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage.....60

Figure 7 Expression profile of the *CMO* (a) *TPT1* (b) *TPT1* (c) and *BT1-1* (d) genes in leaves, sheaths, rachises and grains, respectively, of rice cv. BRS AG, submitted to the different treatments: T1, control

(irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage. The combinations of the two best reference genes for leaves (*UBC-E2* + *GAPDH*), sheaths (*UBQ5* + *UBQ10*), rachises (*TIP41* + *UBQ10*), and grain (*TIP41* + *cyclophilin*) are shown in black, while those of the reference genes with the least stable expression for leaves (*EeF-1 α* + *ACTIN 11*), sheaths (*EeF-1 α* + *β -tubulin*), rachises, (*β -tubulin* + *ACT11*) and grain (*UBQ5* + *EeF1 α*) are represented in gray. Data are presented as means $\pm$ standard deviation, calculated from three biological replicates. The upper case letters indicate a significant difference ($p \leq 0.05$) between the most and least appropriate reference genes in each treatment.....61

Artigo II - O *priming* com estresse salino no estágio vegetativo melhora a tolerância à salinidade durante o estágio de enchimento de grãos em plantas de arroz

Figura 1 Condutância estomática (gs) em plantas de arroz, cv. BRS AG, em diferentes condições de estresse salino, após seis dias de aplicação de 150 mM de NaCl no estágio reprodutivo (R7-R8). Os valores são representados pela Média $\pm$ EP para cada condição (n = 9). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições. T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8)78

Figura 2 Esquema demonstrando o desenho experimental que constituem as quatro condições de estresse a que as plantas de arroz, cv. BRS AG, foram submetidas: T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio

reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8). No estágio reprodutivo foram realizadas coletas após sete dias (primeira coleta) de aplicação do estresse. Após a primeira coleta, todas as condições foram irrigadas novamente e uma segunda coleta foi realizada após dois dias de recuperação. V5: estágio fenológico com cinco folhas maduras; R7-R8: estágio de enchimento de grãos. As tesouras representam o momento em que as coletas foram realizadas.....79

Figura 3 Concentração de Na^+ (a), K^+ (b) e razão de Na^+/K^+ (c) em raízes e folhas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino no estágio reprodutivo. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição ($n = 3$). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições de estresse (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os órgãos (raízes e folhas), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)87

Figura 4 Seções transversais de folhas (a-d e f-i) e raízes (k-n), área do floema da folha (e), área do metaxilema da folha (j) e área do metaxilema da raiz (o) de plantas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias da aplicação de 150 mM de NaCl no estágio de reprodutivo. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição ($n = 6$). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)88

Figura 5 Índice de clorofila (a), e extravasamento de eletrólitos (b) em folhas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação no estágio reprodutivo. Os valores são

representados pela média $\pm$ EP para cada condição (n = 3). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)89

Figura 6 Ânion superóxido (a), peróxido de hidrogênio (b), peroxidação lipídica (c) em folhas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação no estágio reprodutivo. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição (n = 3). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições de estresse (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no estágio vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)90

Figura 7 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (a), ascorbato peroxidase (APX) (b) e a catalase (CAT) (c) em folhas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois de recuperação no estágio reprodutivo. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição (n = 3). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no estágio vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....91

Figura 8 Expressão do gene *TPT1* que codifica para o translocado de fosfato/triose fosfato em folhas (a), bainha (b), e ráquis (c) da cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição (n = 3). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)93

Figura 9 Expressão do gene *SUT4* que codifica para o transportador de sacarose (SUT) em folhas (a), bainha (b), e ráquis (c) da cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição (n = 3). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)94

Figura 10 Expressão do gene *SUT5* que codifica para o transportador de sacarose (SUT) em folhas (a), bainha (b), e ráquis (c) da cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição (n = 3). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)95

Figura 11 Expressão dos genes *BT1-1* (a), *BT1-2* (b), e *BT1-3* (c) que codifica para o transportador de ADP-glicose em grãos de plantas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição (n = 3). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)97

Figura 12 Atividade das enzimas invertase ácida de parede (CIN) (a), neutra (NIN) (b), vacuolar (VIN) (c), sacarose sintase (SuSy) (d) em grãos de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois de recuperação no estágio reprodutivo. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição (n = 3). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições de estresse (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem

entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo o teste de Tukey ($P \leq 0,05$)99

Figura 13 *Heatmap* com genes que codificam para enzimas que clivam sacarose: invertase ácida de parede (*CIN*), neutra (*NIN*), ácida do vacúolo (*VIN*) e sacarose sintase (*SUSY*) em grãos de plantas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois de recuperação no estágio reprodutivo. A escala de cor é referente à quantificação relativa (QR). T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8)101

Figura 14 Dimensão 1 (Dim1) versus dimensão 2 (Dim2) com base nos parâmetros analisados (genes de transportadores, genes de enzimas e atividade das enzimas *CIN*, *NIN*, *VIN* e *SuSy*) em plantas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino no reprodutivo. T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8)103

Figura 15 Um modelo explicativo para o possível efeito do *priming* na síntese, translocação e utilização dos fotoassimilados nos grãos de plantas de arroz submetidas a um segundo evento de estresse durante o estágio reprodutivo (R7-R8). Os resultados ilustrados na figura são das plantas T4 (recorrente) em comparação com T3 (estresse somente no reprodutivo) e com as plantas controle após sete dias de estresse salino (150 mM de NaCl). Nas plantas T4 foi observado um aumento na área do floema nas folhas que pode ter contribuído para um acúmulo de amido na bainha no estágio vegetativo, assim como a translocação de assimilados para os grãos. Nessas plantas, a expressão de *TPT1* e *SUT4* nas folhas foi maior, indicando que elas conseguiram manter a fotossíntese e transporte de sacarose da folha para outros órgãos, enquanto na bainha a expressão de

TPT1 foi maior em T3 em comparação com T4. Para *SUT4* e 5 não foi observado diferença nos valores de expressão entre T3 e T4 na bainha. No entanto, em comparação ao controle, as plantas T4 tiveram valores iguais ou superiores ao controle, ao contrário do observado para T3. Isso sugere que as plantas pré-estimuladas poderiam estar remobilizando reservas previamente armazenadas da bainha para o grão. No ráquis não foi observado diferença de expressão entre T3 e T4 para os genes *TPT1*, *SUT4* e *SUT5*. Nos grãos as plantas pré-estimuladas tinham atividade aumentada de CIN e SuSy, bem como expressão dos genes *CIN2*, *CIN8*, *SUSY2*, *SUSY3*, *BT1-1*, *BT1-2* e *BT1-3* regulados exclusivamente nessas plantas, o que indica que as plantas foram capazes de manter a síntese de amido no grão sob salinidade. Suc: sacarose, CIN: invertase ácida de parede, NIN: invertase neutra, VIN: invertase vacuolar, SuSy: sacarose sintase, Fru: frutose, Glc: glicose, SUT: transportador de sacarose, TPT: transportador de triose fosfato/fosfato, BT1: transportador de ADPglicose, PD: plasmodesmas, TP: triose fosfato, Pi: fosfato inorgânico, Linhas pontilhadas indicam rotas possíveis, mas não confirmadas, assim como o ponto de interrogação. A ausência de setas indica que não houve diferença entre as condições T3 e T4.....112

Artigo III - Cross-stress memory: salt *priming* at vegetative growth stages improves tolerance to drought stress during grain-filling in rice plants

Figure 1 Scheme showing the experimental design that constituted the four conditions to which rice plants cv. BRS AG were submitted: Control: irrigation with nutrient solution and water throughout the plant cycle; V-salt: pre-treatment with salt (nutrient solution + 150 mM NaCl) in V5 for four days and without water deficit in R7–R8; R-drought: without pre-treatment in V5 and with water deficit only in R7–R8 for 16 days; V-salt + R-drought: pre-treatment with salt in the vegetative stage (V5) (nutrient solution + 150 mM NaCl) for four days and water deficit in the reproductive stage (R7–R8) for 16 days. Phenological

stage V5: collar formation on the fifth leaf; reproductive stage R7–R8: grain-filling. The scissors indicate the moment when the leaves were collected.....156

Figure 2 Electrolyte leakage (a), and relative water content (b) in rice cv. BRS AG leaves analyzed after 16 days of stress and five days of recovery. Means $\pm$ SE (n = 4) followed by the same uppercase letters are not statistically different among the stress conditions, and equal lowercase letters do not differ between times ($P \leq 0.05$, Tukey's test)129

Figure 3 Leaf CO₂ assimilation (a), stomatal conductance (b), intercellular CO₂ concentration (c), and potential quantum efficiency of photosystem II (d) in rice cv. BRS AG leaves analyzed after 16 days of stress and five days of recovery. Means $\pm$ SE (n = 6) followed by the same uppercase letters are not statistically different among stress conditions, and equal lowercase letters do not differ between times ($P \leq 0.05$, Tukey's test)130

Figure 4 Water use efficiency (a) and instantaneous carboxylation efficiency (b) in rice cv. BRS AG leaves analyzed after 16 days of stress and five days of recovery. Means $\pm$ SE (n = 6) followed by the same uppercase letters are not statistically different among stress conditions, and equal lowercase letters do not differ between times ($P \leq 0.05$, Tukey's test)131

Figure 5 Absciscic acid (ABA) (a), indole-3-acetic acid (IAA) (b), salicylic acid (SA) (c) and jasmonic acid (JA) (d) in rice cv. BRS AG leaves analyzed after 16 days of stress and five days of recovery. Means $\pm$ SE (n = 6) followed by the same uppercase letters are not statistically different among stress conditions, and equal lowercase letters do not differ between times ($P \leq 0.05$, Tukey's test)133

Figure 6 Graph showing the number of differentially expressed genes (DEGs) that were upregulated and downregulated (a) and a Venn diagram

showing the distribution of DEGs (b) comparing stress conditions versus the control after 16 days of stress in rice plants (cv. BRS AG)134

Figure 7 Graph showing the number of differentially expressed genes (DEGs) that were upregulated and downregulated (a) and a Venn diagram showing the distribution of DEGs (b) by comparing stress conditions versus the control after five days of recovery in rice plants (cv. BRS AG)135

Figure 8 Graph showing the number of differentially expressed genes (DEGs) that were upregulated and downregulated (a), and a Venn diagram showing the distribution of DEGs that were downregulated (b) and upregulated (c) by comparing stress conditions during recovery (T1R= control; T2R = V-salt; T3R = R-drought, and T4R= V-salt + R-drought) versus the same conditions after 16 days of stress in rice plants (cv. BRS AG)136

Figure 9 Overview of the altered metabolism and cellular function using the Mapman software for 1,249 exclusive genes of the V-salt + R-drought versus control comparison in rice plants (cv. BRS AG) after 16 days of water stress at the grain filling stage.....138

Figure 10 Overview of the altered metabolism and cellular function using the Mapman software for 1,437 exclusive genes of the T4R versus V-salt + R-drought comparison in rice plants (cv. BRS AG) after five days of recovery at the grain filling stage.....139

Figura S1 Venn diagram showing the distribution of exclusive differentially expressed genes at the time of recovery.....168

Figura S2 Graphical visualization of the generated protein-protein interaction network (PPI) including proteins encoded by differentially expressed genes in rice plants (cv. BRS AG) subjected to saline stress in the vegetative stage and water stress in the grain filling stage (primed plants) after 16 days of water stress. Nodes (circles) represent

proteins, while straight lines represent known or inferred interactions. The network was built with 1,249 exclusive genes from the V-salt + R-drought versus control comparison.....169

Figura S3 Graphical visualization of the generated protein-protein interaction network (PPI) including proteins encoded by differentially expressed genes in rice plants (cv. BRS AG) subjected to saline stress in the vegetative stage and water stress in the stage of grain filling stage (primed plants) after five days of recovery. Nodes (circles) represent proteins, while straight lines represent known or inferred interactions. The network was built with 1,437 exclusive genes from the T4R versus V-salt + R-drought comparison.....171

Figura S4 Correlation between the Log₂FC and the relative quantification of the data obtained by RNA-seq and RT-qPCR, respectively.....173

Figura S5 Routes planned to regulate the memory response to cross-stress (primed plants: V-salt + R-drought). Based on the results of this study, we believe that the responses of plants to the first stress salt V5 were mediated by the increase of both abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) acids and that the stable levels of JA in the subsequent stress contributed to the increase of ABA. In the subsequent stress event (water deficit) we believe that ABA was synthesized in the roots and transported to the aerial part where, together with JA, auxin (IAA), and high calcium levels (Ca²⁺), it participated in the transcriptional reprogramming that contributed to improved membrane stability, better photoprotection, reduced stomatal conductance, alteration in the enzymatic antioxidant system, biosynthesis and regulation of flavonoids, and the glyoxylate cycle. Through the transcriptional results, we believe that an increase in flavonoids in these plants may have contributed to better membrane stability and less reactive oxygen species. In addition, the memory responses of the prepared plants are possibly a reflection of the transcriptional behavior of different transcription factors found in the nucleus that are capable of regulating different

metabolism pathways. Primed plants showed an increase in root growth possibly due to increased ABA in the roots and the transport of IAA to this organ. Dotted lines indicate possible but not confirmed routes. Solid lines represent the routes that have been demonstrated in previous studies. Blue represents positive regulation and red represents negative regulation; boxes show the result of expression and circles show quantification/activity.....174

Lista de Tabelas

Artigo I - Selection of Reference Genes for RT-qPCR Studies in Different Organs of Rice Cultivar BRS AG Submitted to Recurrent Saline Stress

Table S1	Description of the reference genes and three candidate reference genes for the qRT-PCR reactions in rice plants, cv. BRS AG, under salt stress.....	71
----------	---	----

Artigo II - O *priming* com estresse salino no estágio vegetativo melhora a tolerância a salinidade durante o estágio de enchimento de grãos em plantas de arroz

Tabela 1	Parâmetros de crescimento (altura, comprimento de raiz, diâmetro do caule, massa seca de raiz e parte aérea) em plantas de arroz, cv. BRS AG avaliados no estágio R9 (maturação dos grãos) nas diferentes condições experimentais.....	102
Tabela S1	Lista de primers utilizados para análise de expressão por RT-qPCR.....	120
Tabela S2	Quantificação relativa de genes que codificam para enzimas envolvidas na clivagem de sacarose como a invertase ácida (<i>CIN</i>), neutra (<i>NIN</i>), vacuolar (<i>VIN</i>) e sacarose sintase (<i>SUSY</i>) em grãos de plantas de arroz, cv. BRS AG, nos dois momentos de coleta: sete dias após a aplicação de 150 mM de NaCl e após dois dias de recuperação no estágio reprodutivo (R7 – R8)	122

Artigo III - Cross-stress memory: salt *priming* at vegetative growth stages improves tolerance to drought stress during grain-filling in rice plants

Table 1	Growth parameters evaluated in rice plants, cv. BRS AG, at the grain maturation stage - R9, under different experimental conditions.....	132
---------	--	-----

Table S1	Characteristic precursor and product ions used for the detection of indole-3-acetic acid, methylated jasmonic, salicylic acid and abscisic acid.....	176
Table S2	Primers used for RT-qPCR.....	177
Table S3	Differentially expressed genes exclusive at the time of recovery.....	178
Table S4	Exclusive genes (1,249 genes) from the comparison of V-salt + R-drought versus the control in rice plants (cv. BRS AG) after 16 days of water stress at the grain-filling stage.....	181
Table S5	Unique genes (1,437 genes) from the T4R versus V-salt + R-drought comparison in rice plants (cv. BRS AG) after five days of recovery at the grain-filling stage.....	181
Table S6	Genes ID, annotation, functional category and Log ₂ FC of DEGs of plants rice cv. BRS AG unique to of the comparison V-salt + R-drought vs control after rehydration (recovery collection). The functional category was extracted from MapMan analysis using the list of DEGs that show Log ₂ FC ≥ 1 or ≤ -1 and q-value < 0.05.....	182

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	24
1.1 Importância da Cultura do Arroz	24
1.1.1 Cultivar BRS AG	24
1.2 Dinâmica fonte-dreno e produtividade	27
1.3 Estresse abiótico: salinidade e déficit hídrico	31
1.3.1 Causas do estresse hídrico e salino nas plantas	31
1.3.2 Efeitos da salinidade e déficit hídrico nas plantas	33
1.3.3 Como que as plantas percebem e respondem ao estresse hídrico e salino?	34
1.4 <i>Priming</i> e memória	39
1.5 Hipótese Geral	41
1.5.1 Objetivo geral	42
Referências Bibliográficas	42
 Artigo I - Selection of Reference Genes for RT-qPCR Studies in Different Organs of Rice Cultivar BRS AG Submitted to Recurrent Saline Stress	48
Abstract	48
Introduction	49
Materials and methods	51
Results	54
Discussion	62
Conclusion	66
References	66
Supporting information	71
 Artigo II - O <i>priming</i> com estresse salino no estágio vegetativo melhora a tolerância a salinidade durante o estágio de enchimento de grãos em plantas de arroz	72
Resumo	72
Introdução	74
Material e métodos	77
Resultados	86
Discussão	103

Conclusão	110
Referências	114
Material suplementar.....	120
 Artigo III - Cross-stress memory: salt <i>priming</i> at vegetative growth stages improves tolerance to drought stress during grain-filling in rice plants	124
Summary.....	124
Introduction	126
Results	128
Discussion.....	145
Experimental procedures	155
References.....	160
Supporting Information	168
 2 CONSIDERAÇÕES FINAIS	185

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Importância da cultura do arroz

O arroz é o segundo cereal mais cultivado no mundo, ocupando área aproximada de 161 milhões de hectares (SOSBAI, 2018). Aproximadamente 90,2% da produção mundial de arroz ocorre na Ásia, sendo que China, Índia e Indonésia são os maiores produtores. O Brasil é o nono maior produtor mundial de arroz e destaca-se como o maior produtor fora do continente asiático (FAO, 2018). No Brasil, o Rio Grande do Sul (RS), se destaca como o maior produtor nacional de arroz irrigado, sendo responsável por aproximadamente 70% do total produzido no Brasil, seguido por Santa Catarina (SC). A média de produtividade no Estado do RS na safra 2019/2020 foi de aproximadamente 8.402 kg ha⁻¹ (IRGA, 2020).

Dentre os cereais mais cultivados e consumidos no mundo, o arroz merece destaque especial. Primeiro por ser um alimento em que o grão sai do campo e é consumido praticamente sem processo de industrialização. Segundo, por ser um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, capaz de fornecer cerca de 20% da energia, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas (SOSBAI, 2018). Além disso, o grão do arroz apresenta conteúdo significativamente maior de amido que o grão do milho (MONTESINOS; NAVARRO, 2000), representando uma fonte de matéria prima para a produção de etanol. O amido é utilizado como fonte de carboidrato para produção de etanol em alguns países como Estados Unidos e França. Baseado nisso, associado com a falta de matéria prima para a produção animal na metade sul do RS e a elevada produção de arroz nas últimas safras, a Embrapa, através de seu Programa de Melhoramento Genético, foi demandada por um padrão de arroz diferenciado, com características próprias para produção de etanol, e para alimentação animal, retirando parte do grão longo fino de oferta ao mercado consumidor (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2017). Foi nesse contexto que surgiu a cultivar BRS AG.

1.1.1 Cultivar BRS AG

A cv. BRS AG é o resultado de um simples cruzamento entre a cultivar americana de arroz irrigado Gulfmont e a linhagem SLG1, de origem japonesa, realizado em 1994/1995. Essa linhagem, por não ter interesse quanto aos padrões exigidos pela preferência nacional (que é por grãos do tipo longos e finos, de aspecto vítreo e que fiquem soltos após cocção), foi mantida no programa como fonte de variabilidade genética. Na safra 2010/11, em função de um excedente de produção na cadeia produtiva do arroz, a Embrapa atendeu a demanda de arroz de um padrão diferenciado, buscando viabilizar economicamente a atividade arrozeira (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2017). Esta foi a primeira cultivar de arroz irrigado lançada para outros fins, que não o consumo humano, podendo ser utilizada como matéria prima para produção de etanol e/ou para alimentação animal. Uma característica marcante desta cultivar quando comparada com as demais é o peso médio de mil grãos ser de aproximadamente 52 g, enquanto a maioria das cultivares de arroz irrigado apresentam um peso médio de mil grãos de 25 g (Figura 1). Além de apresentar grãos grandes, a baixa relação amilose-amilopectina resulta em menor qualidade no cozimento, não se adequando ao padrão de consumo brasileiro (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2017).



Figura 2. Comparação dos grãos da cultivar de arroz convencional BRS Pampa (esquerda) com os grãos da cultivar BRS AG “Gigante” (direita). Figura adaptada de Magalhães Júnior et al. (2017).

As plantas da nova cultivar BRS AG (Tabela 1), possuem um ciclo biológico de cerca de 126 dias da emergência a maturação, grãos grandes com alto conteúdo de amido; altura média das plantas é de 110 cm; comprimento do

colmo é de 88 cm e a espessura é de 5 mm, o que lhe confere colmos fortes resistentes ao acamamento apesar da elevada estatura de plantas. As folhas são pilosas sendo a folha bandeira classificada como descendente. As plantas dessa cultivar apresentam moderada tolerância à toxidez por ferro, bem como para a principal doença incidente sobre a cultura (brusone). A cultivar é resistente ao degrane e as sementes perdem facilmente o poder e vigor germinativo, desse modo, não apresenta risco de tornar-se uma planta invasora e infestante da lavoura de arroz, não podendo ser comparado à principal planta daninha da lavoura: arroz vermelho (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2017).

Tabela 1 - Características das plantas da nova cultivar de arroz irrigado BRS AG em comparação com a cultivar de arroz convencional BRS Pampa.

CARACTERÍSTICAS	CULTIVARES	
	Plantas	
	BRS AG	BRS PAMPA
Tipo de planta	Intermediária	Moderno
Ciclo (dias da emergência a 50% floração)	96	88
Maturação	126 (médio)	118 (precoce)
Estatura de planta (cm)	110	96
Comprimento do colmo (cm)	88	72
Comprimento da panícula (cm)	23	24
Exserção da panícula	Média	Média
Cor da folha	Verde	Verde
Ângulo da folha bandeira	Descendente	Ereto
Cor da aurícula	Verde claro	Verde claro
Cor da lígula	Incolor a verde	Incolor a verde
Cor do internódio	Verde claro	Verde claro
Coloração de antocianina no colmo	Ausente/muito fraca	Ausente/muito fraca
Tipo de panícula	Intermediária	Intermediária
Pubescência do limbo foliar	Presente	Presente
Degrane	Resistente	Intermediário
Acamamento	Resistente	Resistente
Perfilhamento	Baixo	Alto
Toxidez indireta por ferro	Moderadamente resistente	Moderadamente resistente
Brusone na folha	Moderadamente resistente	Moderadamente resistente
Brusone na panícula	Moderadamente resistente	Moderadamente resistente
Mancha de grãos	Moderadamente sensível	Moderadamente resistente

Fonte: Magalhães Júnior et al. (2017).

Em testes comparativos realizados a campo, a cv. BRS AG apresentou produtividade média de 8.193 kg ha⁻¹, aproximando-se da produtividade média obtida pela BRS Pampa (9.215 kg ha⁻¹), que é uma das principais cultivares do Rio Grande do Sul. No entanto, além de apresentar alta produtividade, a

capacidade de tolerância das plantas de arroz a estresses ambientais é o principal ponto de interesse da agricultura, pois o arroz é cultivado em diversos ambientes caracterizados por vários climas e condições de solo-água. Estudos realizados *in vitro* com a cv. BRS AG, demonstraram que ela apresenta mecanismos de defesa e pode ser considerada tolerante ao estresse salino. A partir dos resultados obtidos pode-se aferir que as plantas da cv. BRS AG germinam até concentrações de 136mM de NaCl e que nesta concentração as plantas apresentam o crescimento pouco afetado. Destaca-se neste contexto, o aumento da atividade das enzimas antioxidantes e o incremento nos teores de prolina. Nessas condições de estresse salino em que as plantas foram submetidas, ocorreram fortes alterações na expressão dos genes referentes a todas as isoformas avaliadas, indicando uma diversificação funcional dos genes. Entretanto, esses são resultados de estudo realizado *in vitro* (ROSSATTO et al., 2017, 2018). Portanto, mais estudos precisam ser realizados com essa cultivar envolvendo outras condições de cultivo e estresses, a fim de entender o comportamento dessas plantas frente a alterações ambientais.

1.2 Dinâmica fonte-dreno e produtividade

A produtividade de uma cultura depende da relação fonte-dreno, que é influenciada pelas mudanças ambientais. Quando a fotossíntese não é limitante, a produtividade e o rendimento da planta são governados pela capacidade de sintetizar, transportar e utilizar fotoassimilados por órgãos drenos, especialmente durante o estágio reprodutivo (TUNCEL; OKITA, 2013). Essa capacidade é determinada por efeitos combinados, como a assimilação fotossintética de carbono nas folhas (fonte), o uso das reservas de carbono pré-armazenadas, o transporte da sacarose pela vasculatura, o tipo e a força dos tecidos drenos, bem como o estado metabólico dos tecidos (MATHAN et al., 2020).

O carbono assimilado durante a fotossíntese é usado na síntese de triose-fosfato (gliceraldeído-3-fosfato) no cloroplasto, que é então transportado para o citosol ou usado para a biossíntese de amido no estroma (WHITE et al., 2016). O transporte de triose fosfato para o citosol ocorre através do translocador de fosfato/triose-fosfato (TPT) em troca estrita por fosfato inorgânico (Pi). O Pi produzido durante a síntese de sacarose é transportado de volta para o

cloroplasto via TPT para ser usado na síntese de ATP. Portanto, a reciclagem do fosfato mantém o transporte fotossintético de elétrons e as vias da pentose fosfato. O transportador TPT comunica os compartimentos cloroplasto e citosol, é fundamental para a regulação da partição de carbono entre o amido e a sacarose, e constitui de 10 a 12 % do conteúdo de proteínas na membrana interna do cloroplasto (GRIFFITHS et al., 2016).

A sacarose sintetizada no citosol pode ser armazenada no vacúolo, ou ainda pode ser diretamente metabolizada, por exemplo, em oligossacarídeos da família da rafinose, clivada por invertases ou sacarose sintase (SuSy). Os produtos correspondentes podem ser usados na respiração como combustível para o fornecimento de energia celular ou ainda pode ser transportada via floema para outros órgãos (KELLER et al., 2021).

As folhas fotossintéticas são os principais tecidos-fonte de uma planta, enquanto o tipo e a eficiência dos órgãos drenos variam dependendo dos estádios de desenvolvimento e das condições ambientais. Por exemplo, os grãos são o dreno primário no estágio reprodutivo de plantas cultivadas, enquanto as raízes, caule/entrenós e folhas em crescimento funcionam como drenos no estágio vegetativo. A utilização e o armazenamento de açúcares são regulados tanto pelo período dia/noite, quanto pelo estágio de desenvolvimento da planta. Durante o crescimento vegetativo e antes da antese, em plantas de cultivo, incluindo o arroz, o caule (colmo) e a bainha são os principais órgãos de armazenamento de carboidratos. No arroz, a sacarose, depois de ser descarregada dentro da bainha e/ou do colmo, é convertida em amido, principal forma de armazenamento nessa cultura (WANG et al., 2017). Durante o estágio de enchimento de grãos, essas reservas podem ser remobilizadas, o amido é convertido novamente em sacarose, contribuindo com até metade do rendimento final de grãos (WANG et al., 2017). Nesta fase, além da sacarose provinda da folha para enchimento dos grãos, no arroz, foi sugerido que até 30 % do carboidrato no grão se origina das reservas de amido, mas varia de 20 a 40 %, dependendo da cultivar e das condições ambientais (LI et al., 2017).

Os grãos de arroz e seus ramos conectores geralmente amadurecem mais cedo que o caule e as folhas, deixando a reserva de carbono pré-armazenada nesses órgãos sem uso (YANG et al., 2001). Alguns estudos mostraram que a secagem moderada do solo após a antese (durante a fase de

enchimento dos grãos) leva à senescência precoce, reduz o período de enchimento de grãos e aumenta a remobilização da reserva de carbono do caule para o enchimento de grãos de arroz (WANG et al., 2019, 2020a, 2020b). Essa prática agrícola contribui para a economia de água nas culturas de arroz, que é urgente para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Até o momento os estudos focaram na remobilização de reservas de amido do caule sob condições de secagem do solo. Porém, será que o estresse salino aplicado após a antese também poderia acelerar esse processo? Será que um estresse osmótico aplicado no estágio vegetativo pode aumentar a alocação de carbono para ser armazenado em colmo e bainha como uma forma dessas plantas se preparem para um estresse futuro?

O movimento da sacarose da folha bandeira (fonte) para os diferentes drenos, assim como, para dentro e fora dos tecidos de armazenamento temporário e ao longo do floema até os grãos, envolve vias apoplásticas que requerem ajuda de transportadores SWEET e SUTs para facilitar o movimento da sacarose entre as células. A sacarose sintetizada em células mesofílicas difunde-se simplasticamente através dos plasmodesmas até as células do parênquima do floema. A sacarose é então exportada para o apoplasto, com ajuda de transportadores SWEETs. Na estratégia de carregamento apoplástico, o floema é simplasticamente isolado ou possui raros plasmodesmos conectando-se às células circundantes. Posteriormente, a sacarose deve ser transportada do apoplasto para as células companheiras e elementos de tubo crivados através da membrana plasmática. Nesse mecanismo de carregamento apoplástico, a função dos SUTs localizados na membrana plasmática é essencial para carregar a sacarose no floema. A força motriz de prótons gerada por H^+ -ATPases é a forma de energia usada para conduzir a sacarose no floema por SUTs contra um gradiente de concentração (KELLER et al., 2021).

Os SUTs desempenham papéis essenciais durante o carregamento do floema no tecido de origem, captação de sacarose nas células de drenos e transporte para o armazenamento de sacarose no vacúolo. No genoma do arroz foram identificados cinco genes que codificam SUTs (KÜHN; GROF, 2010). A análise de expressão gênica em plantas de arroz mostrou que o gene *OsSUT1* é expresso nas folhas, caules e grãos em enchimento (AOKI et al., 2003), enquanto o gene *OsSUT2* é expresso em níveis quase iguais em todos os

tecidos testados. Os padrões de expressão de *OsSUT3* e *5* foram considerados semelhantes: o nível de expressão é alto nas folhas e baixo nas sementes em germinação. *OsSUT4* apresentou expressão preferencial em folhas bandeiras (AOKI et al., 2003).

Após ser descarregada do floema no grão, a sacarose deve ser hidrolisada pela invertase em glicose e frutose, ou pela sacarose sintase em UDP-glicose e frutose. Com base em seu pH ideal, solubilidade e localizações subcelulares, as invertases são classificadas como três isoformas, incluindo a ácida do vacúolo (VIN), neutra do citosol (NIN) e ácida da parede (CIN) (RUAN, 2014).

Com base no seu pH ótimo de atividade, as invertases podem ser classificadas em dois tipos principais: as invertases ácidas, com um pH ótimo de 4,5 a 5,5, sendo mais eficiente nesses valores para a hidrólise da sacarose; e as invertases neutras ou alcalinas, cuja atividade hidrolítica é maximizada em pH que varie de 7,0 a 7,8 (RUAN, 2010). De acordo com a sua localização subcelular, as invertases ácidas ainda são divididas em invertase da parede celular e invertase vacuolar (RUAN, 2014). A primeira é ligada à parede celular, sendo considerada insolúvel. A segunda acumula-se como proteínas solúveis no lúmen acidificado no vacúolo (KOCH, 2004).

Segundo Gonzáles et al. (2005), acredita-se que as invertases vacuolares podem desencadear funções importantes em processos de expansão celular, aumentando a turgescência, o que pode levar a uma tolerância à baixa disponibilidade de água no solo. As invertases neutras são consideradas enzimas de manutenção, fornecendo glicose para a glicólise, e garantindo que ocorra, posteriormente, o ciclo do ácido tricarboxílico em tecidos onde a atividade da SuSy e das invertases ácidas são baixas ou insuficientes (RUAN, 2014). A isoforma CIN é a enzima responsável pela descarga via apoplasto do floema em células vegetais, e particionamento de sacarose entre os órgãos fonte e dreno (ROITSCH et al., 2003). A SuSy tem sido considerada um marcador bioquímico para a força dos órgãos drenos. O UDP-glicose gerado pela atividade da SuSy é essencial para a biossíntese de muitos compostos como celulose e amido, que são cruciais para as plantas, especialmente para o desenvolvimento tardio de sementes (RUAN, 2014). A atividade da CIN e VIN é inibida por íons de metais

pesados, e as três isoformas são inibidas por seus produtos de reação (glicose e frutose) (STURM, 1999).

A capacidade do grão de receber e assimilar está relacionada à atividade das enzimas envolvidas na conversão de sacarose em amido no grão (PINHEIRO et al., 2005). Alguns estudos relataram que o estresse hídrico em plantas de cereais que ocorre durante o enchimento de grãos pode reduzir a atividade de enzimas envolvidas na transformação de sacarose em amido em grãos (BOYER; WESTGATE, 2004; JEON et al., 2010). No entanto, outros estudos mostraram que a secagem moderada do solo pode aumentar a atividade de enzimas envolvidas na síntese de amido durante o enchimento de grãos e promover o transporte de assimilados de carbono do caule para os grãos (YANG et al., 2003; WANG et al., 2019). As respostas diferentes observadas nesses estudos mostram que as plantas reagem diferentemente de acordo com a severidade do estresse (tempo de duração e os níveis de danos ocasionados), e o estágio de desenvolvimento da planta.

Ao contrário de outros tecido vegetais, a biossíntese de amido em amiloplastos de grãos de cereais é único em sua dependência de duas isoformas da enzima ADP-glicose pirofosforilase (AGPase) (SIKKA et al., 2001), uma enzima citosólica principal e uma plastidial secundária, para gerar ADP-glicose, o nucleotídeo de açúcar utilizado pelas amido sintases no amiloplasto. A maior parte de ADP-glicose no endosperma de cereais é gerado pela AGPase citosólica, bem como pela SuSy (TUNCEL; OKITA, 2013), e subsequentemente transportado para o amiloplasto pela proteína BRITTLE-1 (BT1) localizada no envelope do plastídio. No arroz, três genes codificam proteínas BT1 (*OsBT1-1*, *OsBT1-2* e *OsBT1-3*). Apesar de alguns estudos terem demonstrado que o transporte de ADP-glicose por BT1 é essencial para a taxa normal de síntese de amido no endosperma de arroz (CAKIR et al., 2016), assim como o padrão de expressão dos genes em diferentes tecidos (TOYOTA, 2006), não há relatos de regulação em nível transcricional de BT1 em plantas expostas à estresse abiótico.

1.3 Estresse abiótico: salinidade e déficit hídrico

1.3.1 Causas do estresse hídrico e salino nas plantas

As plantas são expostas a vários estresses ambientais durante o crescimento e desenvolvimento em condições naturais e agrícolas. Entre eles, a seca é considerada um dos estresses mais severos que afetam a produtividade das plantas. Cerca de 80-95% da massa fresca de uma planta é composta de água, que desempenha um papel vital em vários processos fisiológicos, incluindo muitos aspectos do crescimento, desenvolvimento e metabolismo da planta (BRODERSEN et al., 2019). O ambiente está em constante mudança, não apenas ao longo das estações e anos, como pode-se observar atualmente com os efeitos do aquecimento global, mas também diariamente. Embora a ocorrência de chuvas esporádicas e a distribuição desigual seja geralmente o principal fator para o estresse hídrico, a perda de água dos solos por meio da evaporação, que é causada por eventos de alta temperatura, alta intensidade de luz e vento seco, pode agravar ainda mais um evento de estresse hídrico existente (COHEN et al., 2021). Juntamente com a seca, o estresse salino também é considerado uma das principais causas do déficit hídrico nas plantas.

Além da salinidade natural do solo, a quantidade de sais aumenta como resultado das práticas de irrigação e mudanças climáticas, sendo que o último atua por meio do aumento do nível do mar ou do aumento da evaporação em períodos de seca (ZELM et al., 2020). A salinidade do solo é um fator generalizado e significativo na redução da produção agrícola. A extensão da salinidade é evidente pelo fato de que mais de um terço das terras irrigadas no mundo são afetadas pela salinização (VELMURUGAN et al., 2020).

Fatores ambientais, como a seca e a salinidade, afetam mais de 10 % da terra arável, o que causa um declínio de aproximadamente 50 % na média de rendimentos das principais safras em todo o mundo. As principais culturas básicas responsáveis pela maior parte da absorção de calorias pelos humanos (por exemplo, arroz, trigo e milho) são glicófitas, sendo incapazes de completar seu ciclo de vida quando as concentrações de NaCl no solo excedem 200 mM (ZHAO et al., 2020). As plantas de arroz apresentam tolerância à salinidade na germinação, perfilhamento e estádios de maturação fisiológica, entretanto, exibem sensibilidade nos estádios iniciais (vegetativo) e reprodutivo (MORADI et al., 2007).

1.3.2 Efeitos da salinidade e déficit hídrico nas plantas

É considerado que a planta está entrando em déficit hídrico quando a absorção de água pelas raízes não consegue atender a demanda do vegetal (FAN et al., 2006), ou seja, quando ocorre a diminuição do potencial hídrico dos tecidos vegetais. Semelhante à seca, a salinidade do solo reduz a absorção de água pelas raízes das plantas, resultando em uma diminuição de água nas células, afetando assim o turgor celular, o que causa um estresse osmótico. A resposta imediata das plantas à disponibilidade de água limitada é a redução da abertura estomática, que é seguida por redução na transpiração e na assimilação de CO₂. Como resultado, o crescimento da planta é limitado pela redução da pressão de turgor, fotossíntese reduzida e mudanças no desenvolvimento, que são necessárias para a sobrevivência. Nessas condições, o crescimento das plantas é inibido em decorrência da redução da extensibilidade da parede celular e da taxa de divisão celular (SELEIMAN et al., 2019). Aumentos na taxa de senescência, enrolamento, amarelecimento e queda das folhas estão entre os sintomas mais comuns de estresse hídrico em plantas (RUEHR et al., 2019).

No entanto, além do estresse osmótico, o desequilíbrio iônico é uma das consequências do estresse salino. As plantas evoluíram para manter alta e baixa concentração de íons potássio (K⁺) e sódio (Na⁺), respectivamente, em seu citosol. Por isso, manter o equilíbrio entre as concentrações de K⁺ e Na⁺ é central. O K⁺ é um íon fundamental para uma infinidade de processos na planta, enquanto o Na⁺ é altamente tóxico e impede o crescimento, pois inibe enzimas que regulam o metabolismo e dificultam a entrada de K⁺ pelas raízes. Portanto, as plantas precisam manter um equilíbrio entre as concentrações desses íons, caso contrário, o acúmulo de Na⁺ em excesso nas plantas, particularmente nas folhas, causa clorose e necrose, além de ocasionar um desequilíbrio nutricional na planta (PARDO, 2010). No entanto, os danos que a baixa disponibilidade hídrica e/ou excesso de Na⁺ ocasionam às plantas, assim como os mecanismos e as respostas que são ativados pelas plantas frente a essas condições, dependem de diversos fatores, como a espécie e o estágio de desenvolvimento da planta, bem como a intensidade, duração e a frequência do estresse, aspectos que devem ser levados em consideração em experimentos com plantas e estresses ambientais (BUKHARI et al., 2019).

1.3.3 Como as plantas percebem e respondem ao estresse hídrico e salino?

A cascata de eventos que leva à resposta ao estresse inicia-se com o estímulo, um sinal ambiental, que pode ser de natureza mecânica, térmica, elétrica ou química; o sinal é percebido por meio de receptores de membrana, e então convertido em uma linguagem celular por meio da transdução de sinal; em seguida, por meio de mecanismos de sinalização de curta e/ou longa distância, o sinal é levado à célula-alvo, onde promoverá alterações na expressão gênica, que resultará numa resposta de curto prazo (de ordem bioquímica e fisiológica), e de longo prazo (de ordem morfológica) (ZHAO et al., 2020). Devido à complexidade das respostas das plantas às condições de limitação de água, torna-se um desafio encontrar verdadeiros sensores de déficit hídrico. Recentemente o gene *Reduced hyperosmolality-induced [Ca²⁺]_i increase 1* (OSCA1), que codifica um canal de cálcio dependente de hiperosmolaridade localizado na membrana plasmática, foi identificado como um sensor de estresse osmótico (YUAN et al., 2014). A mutação no gene OSCA1 prejudica a sinalização de Ca²⁺ induzida por estresse osmótico em células-guarda e células da raiz, o que resulta em redução do fechamento estomático e crescimento radicular em resposta ao estresse osmótico. Alto potencial osmótico extracelular ou tensão na membrana plasmática causada pelo déficit de água provavelmente desencadeia a abertura do poro e permite o influxo de Ca²⁺ segundos após a condição de estresse ser percebida (LIU et al., 2018).

Embora as mudanças osmóticas que ocorrem durante o estresse salino possam ser detectadas por meio de mecanismos semelhantes aos descritos acima para o déficit de água, recentemente foi mostrado que o mutante *osca1* não apresenta fenótipos alterados sob alta salinidade, o que levanta uma dúvida sobre o papel do OSCA1 em resposta ao estresse osmótico desencadeado por alta salinidade (ZHAO et al., 2020).

Recentemente um mecanismo de percepção de sal foi encontrado. Os pesquisadores identificaram o *Monocation-induced [Ca²⁺]_i increases 1* (MOCA1) que codifica uma glucuronosiltransferase que está envolvida na biossíntese de esfingolípídios, como a glicosil inositol fosforilceramida (GIPC), e que é

especificamente necessária para o aumento dos níveis de Ca^{2+} citosólico em resposta ao estresse iônico, mas não em resposta a estresse osmótico (JIANG et al., 2019). O mutante *moca1* não tem as ondas de Ca^{2+} de resposta inicial que ocorrem em resposta aos íons Na^+ , K^+ ou Li^+ , e as plantas apresentam redução da massa e da sobrevivência sob estresse salino. Estes GIPCs podem ligar cátions monovalentes, e após a ligação, provavelmente são capazes de se ligar e abrir um canal de Ca^{2+} para induzir respostas posteriores à salinidade. No entanto, quais canais de Ca^{2+} estão envolvidos neste processo, e como a ligação de Na^+ com GIPCs ativa os canais, permanece desconhecido (LAMERS et al., 2020).

Além disso, as alterações induzidas por Na^+ na parede celular são percebidas via Feronia (FER), membro da família quinase 1. No entanto, a sinalização à jusante deste receptor acontece várias horas após a aplicação de sal, e não durante as primeiras respostas de sinalização induzidas por NaCl, monitorando o estado e a integridade da parede celular (FENG et al., 2018). É provável que não exista um único sensor de sódio, mas sim que diferentes aspectos do estresse salino são detectados e integrados por meio de diferentes rotas de sinalização.

Os resultados desses estudos sugerem que os efeitos do estresse salino nas plantas ocorrem primeiro pela diminuição do potencial hídrico dos tecidos vegetais, e mais tarde os efeitos são devido ao estresse osmótico associado os efeitos do acúmulo de íons levando ao estresse iônico. No entanto, respostas rápidas específicas de sais, como assinaturas de cálcio específicas de Na^+ , foram identificadas nas raízes (CHOI et al., 2014). Ou seja, as plantas são capazes de perceber níveis elevados de Na^+ , antes de ele ser importado para o interior da célula, em questão de segundos após serem expostas a essas condições. Após a percepção, sinais específicos do sal são rapidamente traduzidos, como assinaturas de Ca^{2+} e espécies reativas de oxigênio (ERO), para alvos à jusante desencadeando uma resposta da planta. Logo, os efeitos continuam seguindo a ordem osmótica e depois iônica, pois somente após um tempo maior é que o Na^+ entra na raiz e pode ser transportado para a parte aérea, ocasionando os sintomas de toxicidade iônica (JIANG et al., 2019). Em seguida, o Na^+ pode entrar na raiz através de canais de cátions não seletivos, que

transportam sódio através da membrana plasmática, assim como por outros transportadores (ZHAO et al., 2020).

Após a percepção de um estresse abiótico, há uma sobreposição substancial nas moléculas de sinalização utilizadas à jusante. Estes incluem Ca^{2+} , ERO e proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs), bem como os fitohormônios auxina, ABA, giberelinas, etileno e brassinosteroides. No entanto, as plantas são capazes de usar esses componentes de sinalização semelhantes para induzir respostas transcricionais e fisiológicas específicas ao estresse.

O influxo de Ca^{2+} mediado por GIPCs é necessário para a ativação da via de sinalização SOS, que é específica do estresse salino. A via de sensibilidade excessiva ao sal (SOS) mais bem caracterizada é a via CBL-CIPK. O cálcio é detectado por SOS3/CBL4 que se liga a SOS2/CIPK24. O complexo SOS2-SOS3 fosforila o antiporter H^+ /cátion SOS1/NHX7, que pode transportar sódio para fora da célula (LAMERS et al., 2020).

Estudos recentes mostraram que o acúmulo de ROS e a produção de cálcio aumentam a indução um do outro durante condições de estresse abiótico (LAMERS, 2020). Cascata de MAPKs e ácido fosfatídico também estão envolvidos na regulação da via de sinalização do estresse salino e hídrico (ZHAO et al., 2020). Dentro de cinco minutos de exposição ao estresse salino e osmótico, vários sinais de fosfolipídios são produzidos, incluindo o ácido fosfatídico (TESTERINK E MUNNIK, 2011). De modo geral, o ácido fosfatídico influencia na sinalização hormonal e no transporte de Na^+ na célula (ZHAO et al., 2020).

À jusante da fase de sinalização inicial, os níveis de fitohormônios mudam através da biossíntese, catabolismo, conjugação e transporte na planta, e os níveis de expressão gênica são alterados de uma maneira dependente e independente de fitohormônios (ZELM et al., 2020). Os fitohormônios são sinais químicos endógenos cruciais que coordenam o crescimento e o desenvolvimento das plantas em condições ideais e durante os desafios ambientais. ABA desempenha um papel importante principalmente no fechamento estomático e na regulação do crescimento da raiz sob estresse abiótico. Durante o estresse osmótico, a expressão de genes de biossíntese de ABA pode ser verificada na epiderme, endoderme, e estelo da raiz, nas células do parênquima vascular da folha e transportado para as células-guarda, assim

como, sua biossíntese parece ocorrer de forma autônoma nas próprias células-guarda (ZELM et al., 2020).

A percepção de ABA por *pyrabactin resistance/pyrabactin resistance-like* (PYR/PYL) leva à inativação de PP2C/ABI1, que induz a atividade de fosforilação de SnRKs subclasse III (SnRK2.2, SnRK2.3 e SnRK2.6). Vários alvos de fosforilação a jusante de quinases SnRK2 medeiam processos, incluindo transporte de íons, produção de ERO, transcrição de genes e fechamento de estômatos. Além disso, a expressão de genes mediados por ABA é dependente de fatores de transcrição que atuam a jusante como substrato de SnRK2s, estes incluem fatores de transcrição do tipo bZIP, NAC, MYB/MYC, AP2-EREBP e WRKY, que são induzidos em várias espécies de plantas em resposta a estresse hídrico e salino (FUJITA et al., 2011).

Como mencionado anteriormente, o ABA é um importante regulador do fechamento estomático, mediado pelos componentes de sinalização, como cálcio e ERO. O fechamento dos estômatos influencia a transpiração, e portanto, o transporte de água pela planta. Como uma resposta ao estresse hídrico e salino, as plantas fecham os estômatos para minimizar a perda de água. O fornecimento de CO₂ à Rubisco é, portanto, prejudicado, o que predispõe o aparato fotossintético a uma maior dissipação de energia e a uma regulação negativa da fotossíntese quando as plantas são submetidas a altas temperaturas e luz. Sob estresse moderado, um pequeno declínio na condutância estomática pode ter efeitos protetores contra o estresse, permitindo a economia de água da planta e melhorando a eficiência no uso da água pela planta (CHAVES et al., 2009). Esse fechamento estomático ocasionado pela falta de água desencadeia também um desequilíbrio na etapa bioquímica da fotossíntese, devido principalmente a alterações na fotofosforilação (uma diminuição na quantidade de ATP levando a uma diminuição na regeneração da Rubisco) (CHAVES et al., 2009).

Em todos os organismos aeróbicos, processos metabólicos, como respiração e fotossíntese, inevitavelmente levam à produção de ERO nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e membranas plasmáticas. Durante períodos de estresse abiótico como seca e salinidade, ocorrem distúrbios no potencial hídrico celular, e consequentemente um aumento de ERO que podem interferir no equilíbrio entre a geração de ERO e os sistemas de defesa

antioxidante, induzindo estresse oxidativo nas plantas. Na última década, evidências crescentes têm mostrado que ERO, particularmente H_2O_2 , podem funcionar como um transdutor de sinal que ativa uma resposta de defesa local e sistêmica da planta contra o estresse (HASANUZZAMAN et al., 2020). Um acúmulo excessivo de ERO (O_2^- , $^1\text{O}_2$, H_2O_2 e $\text{OH}^\cdot$), sob restrição hídrica e salinidade, entretanto, tem efeitos prejudiciais nos tecidos vegetais. Os efeitos prejudiciais das ERO são tradicionalmente atribuídos à sua capacidade de danificar estruturas celulares importantes, incluindo peroxidação de lipídios nas membranas celulares, danos ao DNA, desnaturação de proteínas, oxidação de carboidratos, quebra de pigmentos e comprometimento da atividade enzimática.

Dessa forma, um dos mecanismos de defesa das plantas a estresses abióticos é a maquinaria antioxidante enzimática e não enzimática. Dentre as enzimas que participam da redução dos níveis de ERO, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (PRX), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR) e enzimas sintetizadoras de glutathione. A SOD realiza a conversão de radical superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , enquanto várias enzimas como a APX, CAT e PRX reduzem H_2O_2 em H_2O (HASANUZZAMAN et al., 2020). Além dos antioxidantes enzimáticos, compostos não enzimáticos como o ascorbato e a glutathione são considerados de grande importância, pois são requeridos como doadores de elétrons e compõem o ciclo Ascorbato/Glutathione. Além do ascorbato e da glutathione, são conhecidos outros antioxidantes não enzimáticos, tais como α -tocoferol, carotenoides, flavonoides e açúcares, como por exemplo a rafinose que desempenha um papel importante na eliminação de ERO em diferentes compartimentos celulares (KELLER et al., 2021).

Além da maquinaria antioxidante, para manter o volume celular e o turgor sob estresse osmótico, as plantas podem compensar as mudanças na pressão osmótica com o aumento de solutos compatíveis. Dentre as principais moléculas que atuam como solutos compatíveis estão: os açúcares (glicose, frutose, sacarose, trealose e rafinose), álcoois (sorbitol, manitol e glicerol), e aminoácidos (prolina, glutamato e glicina) (ARIF et al., 2020). Este mecanismo desempenha um papel importante durante o ajuste do metabolismo da planta às condições de salinidade e estresse hídrico.

A modulação de diferentes mudanças morfológicas em raízes e folhas está entre os mecanismos de tolerância das plantas durante a salinidade e seca. O crescimento da raiz é mais suscetível às condições salinas do que o crescimento da parte aérea, mas ambos são afetados, tornando-os indicadores razoáveis de danos por salinidade (ARIF et al., 2020). No entanto, é amplamente aceito que as mudanças no sistema radicular, incluindo tamanho, densidade, comprimento, proliferação, expansão e taxa de crescimento da raiz, representam a principal estratégia para plantas tolerantes à seca para lidar com déficits de água (TZORTZAKIS et al., 2020).

O equilíbrio celular entre sódio e potássio é importante para a sobrevivência das plantas em solos salinos. Uma infinidade de canais e transportadores desempenham um papel na manutenção da homeostase de sódio/potássio durante o estresse salino. As plantas utilizam duas estratégias principais para prevenir o acúmulo de altos níveis de Na^+ no citosol das células da raiz: exclusão de Na^+ pela raiz e sequestro vacuolar. Para células mesofílicas fotossinteticamente ativas, existem três maneiras adicionais: controle da carga de Na^+ no xilema; recuperação de Na^+ do xilema; recirculação de Na^+ do caule através do floema. É geralmente assumido que ~95% de todo o Na^+ absorvido pela raiz é exportado de volta para a rizosfera (ZHAO et al., 2020).

1.4 Priming e memória

Na natureza, o ambiente da planta é altamente variável, com estresses abióticos que podem ocorrer simultaneamente ou de forma recorrente. Portanto, as plantas são repetidamente expostas a diferentes tipos de estresse, e uma exposição anterior ao estresse pode alterar suas respostas bioquímicas, fisiológicas e transcricionais a um evento de estresse subsequente. Uma possível resposta das plantas a um primeiro evento de estresse é o desenvolvimento de tolerância a futuras exposições por meio da aquisição de memória, uma resposta referida como *hardening*, *priming*, condicionamento ou aclimação (CRISP et al., 2016). O *priming* pode ser definido como um estímulo ambiental limitado temporalmente que prepara e modifica a resposta da planta a um futuro evento de estresse. O *priming* atua sobre o fenótipo dos indivíduos,

deixando a informação genética fornecida pela sequência de DNA inalterada, mas incluindo alterações epigenéticas, celulares, hormonais e outras alterações fenotípicas (CRISP et al., 2016).

Portanto, a memória pode ser definida como a capacidade das plantas submetidas a uma exposição ao estresse de armazenar essas informações de modo que, quando são desafiadas novamente, possam responder de maneira diferente, muitas vezes desencadeando uma resposta mais eficiente. A definição de memória de estresse da planta implica que algum tipo de informação persista na planta após a retirada do estímulo e período de recuperação, influenciando sua resposta a evento de estresse subsequente (BRUCE et al., 2007; AVRAMOVA, 2015; CRISP et al., 2016). Essa recuperação pode ser crítica para a resposta de memória, visto que ela pode ser consolidada ou não nesta fase. O processo em que a memória não é consolidada é chamado de redefinição ou esquecimento (CRISP et al., 2016).

O *priming* pode preparar o organismo para uma resposta melhorada a futuras exposições ao mesmo fator de estresse. Se o estresse posterior for diferente, o termo “tolerância ao estresse cruzado” é mais apropriado (FLETA-SORIANO; MUNNÉ-BOSCH, 2016). Portanto, além de preparar o organismo para uma resposta aprimorada a um estresse recorrente (AULER et al., 2020, AMARAL et al., 2020), a pré-exposição de uma planta a uma condição não letal pode estimular a tolerância cruzada aos outros estresses abióticos ocorridos mais tarde (WANG et al. 2015; LI et al., 2015).

Apesar de os mecanismos de memória de estresse ainda não serem totalmente compreendidos, foi demonstrado que um acúmulo de compostos de sinalização e fatores de transcrição juntamente com modificações epigenéticas podem desempenhar um papel importante no armazenamento da informação. Segundo Bruce et al. (2007) e Crisp et al. (2016), existem dois mecanismos principais para a formação da memória. O primeiro ocorre pelo acúmulo de metabólitos de sinalização ou fatores de transcrição, conhecido como memória fisiológica/molecular, e explica como o metabolismo vegetal é alterado e mantido pela exposição a vários eventos de estresse. O outro mecanismo se refere à memória epigenética, ocorrendo alterações nos estados da cromatina, como modificações na cauda das histonas, metilação do DNA e pausa da RNA polimerase II (Pol II), que poderiam desempenhar um papel adicional nas

alterações coordenadas nos padrões de expressão gênica que sustentam as respostas de memória.

Além desses dois mecanismos, mudanças dramáticas nos padrões de expressão gênica podem ocorrer, ilustrando o conceito de 'memória transcricional' e revelando a existência de "genes de memória" (DING et al., 2012). O critério utilizado para a memória transcricional é que os níveis de transcrição de genes de resposta em estresses subsequentes (S2 e S3), após um período de recuperação do primeiro estresse (R1), devem ser significativamente diferentes dos níveis de transcrição produzidos durante o S1, apesar do nível e duração do estresse serem semelhantes. A recuperação é determinada pela restauração dos níveis metabólicos, transcricionais ou proteicos aos níveis pré-estresse (DING et al., 2013; AVRAMOVA, 2015). A duração dessa memória pode ser de dias a semanas para a memória somática, mas em alguns casos pode se estender até a prole. Portanto, pode se tratar de uma memória transgeracional (LÄMKE; BÄURLE, 2017).

Dessa forma, é amplamente aceito que as plantas têm a capacidade de formar uma memória de estresse. Apesar das plantas apresentarem essa capacidade de armazenar informações (memória), em muitos casos, ela não é formada, mas as razões para isso são pouco compreendidas. Da mesma forma, há uma lacuna significativa no conhecimento sobre a duração da memória e os mecanismos para dissipação da mesma, ou "esquecimento". Acredita-se que uma memória somática de longo prazo e transgeracional são reguladas por fatores epigenéticos, os quais demonstram serem estáveis na transmissão mitótica e meiótica (MOLINIER et al., 2006; CRISP et al., 2016).

1.5 Hipótese geral

A pré-exposição de plantas de arroz da cv. BRS AG à salinidade durante o estágio vegetativo, mitiga os efeitos de uma segunda exposição ao estresse salino ou a um estresse de natureza diferente (déficit hídrico), durante o estágio de enchimento de grãos. Isso acontece por meio da coordenação de diferentes processos envolvendo desde a transcrição gênica até mudanças na estrutura da planta.

1.5.1 Objetivo geral

Caracterizar respostas moleculares, bioquímicas, metabólicas, fisiológicas e anatômicas das plantas de arroz da cv. BRS AG, submetidas ou não ao estresse salino recorrente e estresse cruzado (sal x déficit hídrico), a fim de identificar os mecanismos envolvidos no processo de aquisição de memória somática de longo prazo nessas plantas.

Referências Bibliográficas

- AMARAL, M. N. DO.; AULER, P. A.; ROSSATTO, T.; BARROS, M. P. M.; OLIVEIRA M.; BRAGA, E. J. B. Long-term somatic memory of salinity unveiled from physiological, biochemical and epigenetic responses in two contrasting rice genotypes. **Physiology Plantarum**, 2020.
- AOKI, N.; HIROSE, T.; SCOFIELD, G. N.; WHITFIELD, P. R.; FURBANK, R.T. The sucrose transporter gene family in rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, p. 223–232, 2003.
- ARIF, Y.; SINGH, P.; SIDDIQUI, H.; BAJGUZ, A.; HAYAT, S. Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, p. 64–77, 2020.
- AULER, P. A.; AMARAL, M. N.; ROSSATTO, T.; CRIZEL, R. L.; MILECH, C.; CHAVES, F. C.; SOUZA, G. M.; BRAGA, E. J. B. Metabolism of abscisic acid in two contrasting rice genotypes submitted to recurrent water déficit. **Physiologia Plantarum**, 0: 0–0, 2020.
- AVRAMOVA, Z. Transcriptional ‘memory’ of a stress: Transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. **The Plant Journal**, v. 83, p. 149-159, 2015.
- BOYER, J. S.; Westgate, M. E. Grain yields with limited water. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2385-2394, 2004.
- BRODERSEN, C. R.; RODDY, A. B.; WASON, J. W.; MCELDRONE, A.J. Functional status of xylem through time. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, p. 407–433, 2019.
- BRUCE, T. J. A.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; PICKETT, J. A. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v.173, p.603-608, 2007.
- BUKHARI, S. A. H.; PEERZADA, A. M.; JAVED, M. H.; DAWOOD, M.; HUSSAIN, N.; AHMAD, S. Growth and Development Dynamics in Agronomic Crops Under Environmental Stress. **Agronomic Crops**, p. 83–114, 2019.

CAKIR, B.; SHIRAISHI, S.; TUNCEL, A.; MATSUSAKA, H.; SATOH, R.; SINGH, S.; CROFTS, N.; HOSAKA, Y.; FUJITA, N.; HWANG, S. K.; SATOH, H.; OKITA, T. W. Analysis of the Rice ADP-Glucose Transporter (OsBT1) Indicates the Presence of Regulatory Processes in the Amyloplast Stroma That Control ADP-Glucose Flux into Starch. **Plant Physiology**, v. 170, p. 1271–1283, 2016.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, p. 551–560, 2009.

CHOI, W.G.; TOYOTA, M.; KIM, S.H.; HILLEARY, R.; GILROY, S. Salt stress–induced Ca^{2+} waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, p. 6497–502, 2014.

COHEN, I.; ZANDALINAS, S.I.; HUCK, C.; FRITSCHI, F.B.; MITTLER, R. Meta-analysis of drought and heat stress combination impact on crop yield and yield components. **Physiologia Plantarum**, v. 171, p. 66–76, 2021.

CRISP, P. A.; GANGULY, D.; EICHTEN, S. R.; BOREVITZ, J. O.; POGSON, B. J. Reconsidering plant memory: intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. **Science Advances**, v.2, p.1-16, 2016.

DING, Y.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Multiple exposures to drought ‘train’ transcriptional responses in Arabidopsis. **Nature Communication**, v. 3, p.1-9, 2012.

DING, Y.; LIU, N.; VIRLOUVET, L.; RIETHOVEN, J. J.; FROMM, M.; AVRAMOVA, Z. Four distinct types of dehydration stress memory genes in Arabidopsis thaliana. **BMC Plant Biology**, v. 13, p. 1-11, 2013.

FAN, L.; LINKER, R.; GEPSTEIN, S.; TANIMOTO, E.; YAMAMOTO, R.; NEUMANN, P. M. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. **Plant Physiology**, v. 140, p. 603-612, 2006.

FENG, W.; KITA, D.; PEAUCELLE, A.; CARTWRIGHT, H.N.; DOAN, V et al. The FERONIA receptor kinase maintains cell-wall integrity during salt stress through Ca^{2+} signaling. **Current Biology**, v. 28, p. 666–75, 2018.

FLETA-SORIANO, E.; MUNNÉ-BOSCH, S. Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.1-6, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO. 2018. Fao stat database. Disponível em: <http://faostat.fao.org>; Acesso em 27 jan. 2021.

FUJITA, Y.; FUJITA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. **Journal of Plant Research**, v. 124, p. 509–25, 2001.

GONZÁLEZ, M. C. et al. Circadian and developmental regulation of vacuolar invertase expression in petioles of sugar beet plants. **Planta**, v. 222, p. 386–395, 2005.

GRIFFITHS, C. A.; PAUL, M.J.; FOYER, C.H. Metabolite transport and associated sugar signalling systems underpinning source/sink interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1857, 1715–1725, 2016.

HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M. H. M. B.; ZULFIQAR, F.; RAZA, A.; MOHSIN, S. M.; MAHMUL, A. J.; FUJITA, M.; FOTOPOULOS, V. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator, **Antioxidants**, v. 9, p. 681, 2020.

INTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ – IRGA. BOLETIM DE RESULTADOS DA LAVOURA – SAFRA 2019/2020 Condições meteorológicas e seus impactos sobre as lavouras de arroz irrigado e soja em rotação. Disponível em: <https://irga.rs.gov.br/safras-2>. Acessado em: 28 de jan. de 2021.

JEON, J. S.; RYOO, N.; HAHN, T. R.; WALIA, H.; NAKAMURA, Y Starch biosynthesis in cereal endosperm. **Plant Physiol Biochem**, v. 48, p. 383–392, 2010.

JIANG, Z.; ZHOU, X.; TAO, M.; YUAN, F.; LIU, L. et al. Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca²⁺ influx. **Nature**, v. 572, p. 341–46, 2019.

KELLER, I.; RODRIGUES, C. M.; NEUHAUS, H. E.; POMMERENIG, B. Improved resource allocation and stabilization of yield under abiotic stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 257, p. 153–336, 2021.

KOCH, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current opinion in plant biology**, v. 7, p. 235–246, 2004.

KÜHN, C.; GROF, C. P. L. Sucrose transporters of higher plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 287– 297, 2010.

LÄMKE, J.; BÄURLE, I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. **Genome Biology**, v.18, p.1–11, 2017.

LAMERS, J.; MEER, T. V. D.; TESTERINK, C. How Plants Sense and Respond to Stressful Environments. **Plant Physiology**, v. 182, p. 1624–1635, 2020.

LI, G.; PAN, J.; CUI, K.; YUAN, M.; HU, Q.; WANG, W.; MOHAPATRA, P.K.; NIE, L.; HUANG, J.; PENG, S. Limitation of unloading in the developing grains

is a possible cause responsible for low stem non-structural carbohydrate translocation and poor grain yield formation in rice through verification of recombinant inbred lines. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1369, 2017.

LI, X.; TOPBJERG, H. B.; JIANG, D.; LIU, F. Drought priming at vegetative stage improves the antioxidant capacity and photosynthesis performance of wheat exposed to a shortterm low temperature stress at jointing stage. **Plant and Soil**, v. 393, p. 307–318, 2015.

LIU, X.; WANG, J.; SUN, L. Structure of the hyperosmolality-gated calcium-permeable channel OSCA1.2. **Nature Communications**, v. 9, p. 5060, 2018.

MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; FAGUNDES, P. R. R.; FRANCO, D. F.; MORAIS, O.P.; SIQUEIRA, F. G.; STRECK, E. A.; AGUIAR, G. A.; FACCHINELLO, P. H. K. BRS AG: first cultivar of irrigated rice used for alcohol production or animal feed. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 2-77, 2017.

MATHAN, J.; SINGH, A.; RANJAN, A. Sucrose transport and Sucrose Synthase activity control the source-sink relationship for biomass and grain yield in rice, **bioRxiv preprint** doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.03.324889>; this version posted October 19, 2020.

MOLINIER, J.; RIES, G.; ZIPFEL, C.; HOHN, B. Transgeneration memory of stress in plants. **Nature**, v.442, p.1046-1049, 2006.

MONTESINOS, T.; NAVARRO, J. M. Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 362-370, 2000.

MORADI, F.; ABDELBAĞI, ISMAIL, M. Responses of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and rosscavenging systems to salt stress during seedling and reproductive stages in rice. **Annals of Botany**, v. 99, p. 1161-1173, 2007.

PARDO, J. M. Biotechnology of water and salinity stress tolerance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 185–196, 2010.

PINHEIRO, C.; RODRIGUES, A. P.; DE CARVALHO, I. S.; CHAVES, M. M.; RICARDO, C. P. Sugar metabolism in developing lupin seeds is affected by a short-term water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 2705–2712, 2005.

ROITSCH, T.; BALIBREA, M. E.; HOFMANN, M.; PROELS, R.; SINHA, A. K. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 513-524, 2003.

ROSSATTO, T.; AMARAL, M. N.; BENITEZ, L. C.; VIGHI, I. L.; BRAGA, E. J. B.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; MAIA, M. A. C.; PINTO, L. S. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in rice plants, cv. BRS AG, under saline stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, p.1 – 11, 2017.

ROSSATTO, T.; MAIA, M. A. C.; AMARAL, M. N.; AULER, P. A.; WOLOSKI, R.; MAGALHAES JUNIOR, A. M.; BRAGA, E. J. B.; DODE, L. B.; PINTO, L. S. Morphophysiological analysis and expression of proline genes in rice (*Oryza sativa* L. cv. BRS AG) subjected to in vitro salt stress. **Australian Journal of Crop Science**, v.12, p. 243 – 253, 2018.

RUAN, Y. L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 33-67, 2014.

RUAN, Y-L.; JIN, Y.; YANG, Y. J.; LI, G-J.; BOYER, J. S. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. **Molecular Plant**, v. 3, p. 942-955, 2010.

RUEHR, N. K.; GROTE, R.; MAYR, S.; ARNETH, A. Beyond the extreme: Recovery of carbon and water relations in woody plants following heat and drought stress. **Tree Physiology**, v. 39, p. 1285–1299, 2019.

SELEIMAN, M. F.; REFAY, Y.; AL-SUHAIBANI, N.; AL-ASHKAR, I.; EL-HENDAWY, S.; HAFEZ, E. M. Integrative effects of rice-straw biochar and silicon on oil and seed quality, yield and physiological traits of *Helianthus annuus* L. grown under water deficit stress. **Agronomy**, v. 9, 637, 2019.

SIKKA, V. K.; CHOI, S. B.; KAVAKLI, I. H.; SAKULSINGHARAJ, C.; GUPTA, S.; ITO, H.; OKITA, T. W. Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase. **Plant Science**, v. 161, p. 461–468, 2001.

SOSBAI - SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Cachoerinha: SOSBAI, 2018. 205 p. Acessado em: 29 de jan. de 2021.

STURM, A. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant physiology**, v. 121, p. 1-8, 1999.

TESTERINK, C.; MUNNIK, T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2349–61, 2011.

TOYOTA, K.; TAMURA, M.; OHDAN, T.; NAKAMURA, Y. Expression profiling of starch metabolism-related plastidic translocator genes in rice. **Planta**, v. 223, p. 248–257, 2006.

TUNCEL, A.; OKITA, T. W. Improving starch yield in cereals by over-expression of ADPglucose pyrophosphorylase: Expectations and unanticipated outcomes. **Plant Science**, v. 211, p. 52-60, 2013.

TZORTZAKIS, N.; CHRYSARGYRIS, A.; AZIZ, A. Adaptive response of a native mediterranean grapevine cultivar upon short-term exposure to drought and heat stress in the context of climate Chang. **Agronomy**, v. 10, p. 249, 2020.

- VELMURUGAN, A.; SWARNAM, P.; SUBRAMANI, T.; MEENA, B.; KALEDHONKAR, M. J. Water Demand and Salinity. Desalination - Challenges and Opportunities IntechOpen (2020).
- WANG, D. R.; HAN, R.; WOLFRUM, E. J.; MCCOUCH, S. R. The buffering capacity of stems: genetic architecture of nonstructural carbohydrates in cultivated Asian rice, *Oryza sativa*. **New Phytologist**, v. 215, p. 658–671, 2017.
- WANG, X.; VIGNJEVIC, M.; LIU, F.; JACOBSEN, S.; JIANG, D.; WOLLENWEBER, B. Drought priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought and heat stresses occurring during grain filling in spring wheat. **Plant Growth Regulation**, v. 75, p. 677–687, 2015.
- WANG, G. Q.; LI, H. X.; GONG, Y.L.; YANG, J. C.; YI, Y. K.; ZHANG, J. H.; YE, N. H. Expression profile of the carbon reserve remobilization from the source to sink in rice in response to soil drying during grain filling. **Food and Energy Security**, v. 9, p. 1-14, 2020a.
- WANG, G. Q.; LI, H. X.; MENG, S.; YANG, J. C.; YE, N. H.; ZHANG, J. H. Analysis of global methylome and gene expression during carbon reserve mobilization in stems under soil drying. **Plant Physiology**, v. 183, p. 1809–1824, 2020b.
- WANG, G.Q.; LI, H. X.; FENG, L.; CHEN, M. X.; MENG, S.; YE, N. H.; ZHANG, J. Transcriptomic analysis of grain filling in rice inferior grains under moderate soil drying **Journal of Experimental Botany**, v. 70, p. 1597-1611, 2019.
- WHITE, A. C.; ROGERS, A.; REES, M.; OSBORNE, C. P. How can we make plants grow faster? A source-sink perspective on growth rate. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, 31–45, 2016.
- YANG, J.; ZHANG, J.; WANG, Z.; ZHU, Q.; WANG, W. Remobilization of carbon reserves in response to water deficit during grain filling of rice. **Field Crops Research**, v. 71, p. 47-55, 2001.
- YANG, J.; ZHANG, J.; WANG, Z.; ZHU, Q.; LIU, L. Activities of enzymes involved in sucrose-to-starch metabolism in rice grains subjected to water stress during filling. **Field Crops Research**, v. 81, p. 69-81, 2003.
- YUAN, F.; YANG, H.; XUE, Y.; KONG, D.; YE, R.; LI, C.; ZHANG, J.; THEPRUNGSIRIKUL, L.; SHRIFT, T.; KRICHILSKY, B et al. OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in Arabidopsis. **Nature**, v. 514, p. 367–371, 2014.
- ZELM, E.V.; ZHANG, Y.; TESTERINK, C. Salt Tolerance Mechanisms of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 71, p. 24-31, 2020.
- ZHAO, C.; ZHANG, H.; CONG, C.; ZHU, J. K.; SHABALA, S. Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil Salinity. **The Innovation**, 2020.

Artigo I - Artigo Publicado no periódico *Russian Journal of Plant Physiology* – doi.org/ 10.1134/S1021443721020163 (Received May 11, 2020; revised June 23, 2020; accepted June 26, 2020)

Selection of Reference Genes for RT-qPCR Studies in Different Organs of Rice Cultivar BRS AG Submitted to Recurrent Saline Stress

T. Rossatto^a*, P. A. Auler^a, M. N. Amaral^a, C. Milech^a, A. M. Magalhães Júnior^b and E. J. B. Braga^a

^a Department of Plant Physiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^b Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS 96001-970, Brazil

* E-mail: tatyrossato@hotmail.com

Abstract

Quantitative real-time polymerase chain reactions (RT-qPCR) have become one of the most widely used methods for analysing gene expression, provided suitable reference genes are available to normalise the data. RNA was isolated from leaves, grain, rachises and sheaths of rice cv. BRS AG submitted to different saline stress events for seven days, and expression analysis was carried out by RT-qPCR. Expression levels of ten candidate reference genes were assessed, *actin11* (*ACT11*), *ubiquitin conjugating enzyme E2* (*UBC-E2*), *eukaryotic elongation factor1- α* (*Eef-1 α*), *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*), *β -tubulin* (*β -Tub*), *eukaryotic initiation factor 4a* (*Eif-4- α*), *ubiquitin10* (*UBQ10*), *ubiquitin5* (*UBQ5*), and *aquaporin TIP41* (*TIP41-like*). Gene expression stability was calculated using the common statistical algorithms geNorm, BestKeeper and Δ Ct method, NormFinder and RefFinder. The most stably expressed genes were *UBC2E* and *GAPDH* for leaves, *UBQ5* and *UBQ10* for sheaths, *TIP41* and *UBQ10* for rachises, and *TIP41* and *cyclophilin* for grain. Gene expression of *triose phosphate translocator* (*TPT1*), *ADP-glucose transporter* (*BT1-1*), *choline monooxygenase* (*CMO*) was used to validate the selected reference genes. The results highlighted the importance of using suitable reference gene to normalise gene expression data in rice plants.

Keywords *Oryza sativa* L, Abiotic stress, Gene expression, Plant, Real-time quantitative PCR

Abbreviations

ACT - Actin

ACT11 - Actin11

BOD - Biological Organism Development

BT1-1 - ADP-glucose transporter

CMO - Choline monooxygenase

Eef-1 α - Eukaryotic elongation factor1- α

Eif-4- α - Eukaryotic initiation factor 4a

GAPDH - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

RT-qPCR - Real time quantitative reverse transcription-polymerase

TIP41- like Aquaporin TIP41

TPT1 - Triose phosphate translocator

TUB - Tubulin

UBC-E2 - Ubiquitin conjugating enzyme E2

UBQ - Ubiquitin

UBQ10 - Ubiquitin 10

UBQ5 - Ubiquitin 5

β -Tub - β -tubulin

INTRODUCTION

Soil and water salinity, pH, flooding, drought and nutrient deficits, can have a devastating impact on plant growth and yield under field conditions. More than 6% of the total world land area, and 19.5% (45 of 230 million hectares) of irrigated land, is affected by excess salts [1]. High salinity is commonly due to high concentrations of Na⁺ and Cl⁻ in the soil solution, resulting in hyperosmotic and hyperionic conditions, which impede plant absorption of water and nutrients from the soil [2].

Rice cv. BRS AG is the result of genetic crossing performed at the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa) Temperate Climate, involving

genes of the introduced genotype SLG1 (super large grain), whose grain dimensions are larger than those of conventional rice. It has an average thousand-grain weight of 52g, while the majority of irrigated rice cultivars show lower values, such as 25.6g for BRS Pampa [3]. This cultivar differs from the traditional cultivars because besides largest grain size, was developed for others purpose other than human consumption, such as ethanol production and animal feed. Although there are already studies with salinity contrasting cultivars, which tested reference genes [4-5], including by our group, no work has been developed with the cultivar BRS AG. In addition, our previous studies were performed exclusively on leaves and in the present study other organs were analyzed. As it is a promising cultivar and these are initial studies carried out with it is necessary to test reference genes mainly on other organs besides the leaves, because the genes are not expressed in the same way in different organs and the lack of these initial studies can interfere in the results of subsequent analyzes. This can be seen in our results.

In view of this concern, it is necessary to understand whether pre-exposure of rice plants to unfavorable conditions during the vegetative stage can mitigate the effects of a second exposure to the same unfavorable conditions. Imprint or memory of stress, as described by [6], can be defined as genetic or biochemical modifications which occur as a consequence of a previous exposure to stress and which make plants generally more resistant to future exposure.

Recent understanding of plant responses to salinity has been largely been based on genetic and biochemical analysis. Gene expression patterns provide an insight into gene functioning and gene regulatory networks in plants under salt stress [7]. One wide-spread method used in gene expression analysis is real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-qPCR), because it is considered a reliable, sensitive and precise technique [8].

Experimental procedures, amount of RNA, transcriptional efficiency and amplification are among the factors that may affect the accuracy of RT-qPCR. Thus, for greater reliability of RT-qPCR data, it is essential that expression of target genes is compared to stably expressed reference genes. Therefore, selection of a reference gene is unavoidable for the normalisation of expression data [9].

In plants, many genes are known to exhibit sufficient stability to make them suitable as reference genes. The genes chosen as references are usually involved in basic cellular processes, such as cell structure maintenance and primary metabolism. Among the most studied in RT-qPCR analysis of plants are *actin* (*ACT*) [10], *tubulin* (*TUB*) [10], *ubiquitin* (*UBQ*) [4], *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) and *eukaryotic elongation factor4- α* (*eIF-4 α*) [11].

The choice of reliable reference genes as internal controls to normalise gene expression in RT-qPCR is extremely important to avoid failures in the experimental procedure and to determine the precise expression of target genes [12]. This study evaluated the stability of expression of ten genes under different treatments and in different organs of rice cv. BRS AG, in order to identify suitable reference genes for RT-qPCR analysis under these conditions and for this cultivar.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and culture conditions. The experiment was conducted using seeds of rice, cv. BRS AG, from the Estação Experimental Terras Baixas (Embrapa - Clima Temperado). The seeds were disinfested with 1% hypochlorite and then germinated on germitest paper in rolls, maintained in a Biological Organism Development (BOD) growth chamber, with a 16 h photoperiod of light and 8 h of dark at 25 ± 2 °C for 10 days. The seedlings were then transferred to plastic pots (8 L), perforated at the base and kept on trays. Substrate was sand previously washed with water and 1% hydrochloric acid. Irrigation occurred daily, alternating between water and nutrient solution.

The plants remained under these conditions reaching the V5 stage (with five fully expanded leaves). Half of the plants then received nutrient solution plus 150 mM NaCl for 96 hours. After this period, all plants remained under normal irrigation, with alternating water and nutrient solution, until reaching the reproductive stage R8. During the reproductive stage the plants belonging to treatment groups T2 and T3 received 150 mM of NaCl for seven days, while the others received only nutrient solution. In this way, there were four treatment groups:

T1 - control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle).

T2 - irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage.

T3 - irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages.

T4 - irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage.

At the end of the seven days of stress at the reproductive stage, R8 (grain filling), leaf, sheath, rachis and grain samples were collected from each treatment.

Extraction of RNA and cDNA synthesis. Each macerated plant sample (100 mg) was transferred to a 1.5 ml nuclease-free microtube. Total RNA of all organs (leaf, sheath, rachis and grain) was isolated with TRIzol (Thermo Scientific) according to the protocol of manufacturer. The quantity and purity of RNA were measured in a ND-1000 NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), while the quality and integrity of the RNA was verified by electrophoresis in 1.5% agarose gels. Total RNA samples were treated with DNase I, and then $1\mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$ RNA was subjected to reverse transcription for complementary DNA synthesis using the Super Script First Strand System for RT-PCR kit (Invitrogen).

Selection of reference gene. Ten genes that were cited in the literature as internal controls for RT-qPCR analysis, which supposedly exhibited no significant differences between treatments, were selected as possible reference genes. The genes selected were *actin11* (*ACT11*), *ubiquitin conjugating enzyme E2* (*UBC-E2*), *eukaryotic elongation factor1- α* (*Eef-1 α*), *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*), *β -tubulin* (*β -Tub*), *eukaryotic initiation factor 4a* (*Eif-4- α*), *ubiquitin 10* (*UBQ10*), *ubiquitin 5* (*UBQ5*), *aquaporin TIP41* (*TIP41-like*), and *cyclophilin* (*CYP2*) (Table 1).

RT-qPCR. RT-qPCR analyses were conducted in a Bio-Rad CFX Real-Time thermocycler, using the SYBR Green (Roche®) fluorophore system. The total reaction volume was 12 μl , which included 6.25 μl fluorophore, 0.25 μl (10 mM) of each primer (sense and antisense), 1 μl cDNA (1:5 previously defined dilution), and 4.25 μl ultrapure water. The amplification conditions were 95 °C for 10 min, and then 40 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min with the insertion of a melting curve at 65 to 95 °C, incrementing 5 °C at each fluorescence measure.

Three technical repetitions were performed for each biological repetition, including template-free controls.

Data analysis. For the analysis of the stability of expression of candidate reference genes, values obtained from all treatments and organs after seven days of stress in the reproductive period were assessed. The level of expression of the genes in each reaction was determined using the Cq cycle threshold for the different organs of the BRS AG cultivar. To analyse the variation of these reference genes the following programs were used: geNorm [13], NormFinder [14], BestKeeper [15], the Δ Ct method [16], and the RefFinder tool (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference>). The RefFinder tool used geNorm, NormFinder, BestKeeper, and the Δ Ct method to compare and classify candidate reference genes. The RT-qPCR data were exported to Excel (Microsoft Excel 2010) and graphics were generated using Origin 9.0.

Validation of the reference genes. The expression levels of selected target genes were examined, normalising the data with the most and least appropriate reference genes in order to illustrate the importance of choosing the correct reference gene. For leaf Organ, the target gene chosen was *CMO*, coding for the enzyme choline monooxygenase involved in glycine betaine biosynthesis, expression data of which was normalised with that of the two genes, *UBC-E2* and *GAPDH*, which showed the most stable expression levels, and the two with the least stable expression, *ACT11* and *EeF-1 α* . For sheath and rachis, the target gene was *TPT1* triose phosphate, involved in carbohydrate transport, expression data of which was normalised with that of two more sets of stably expressed genes, *UBQ5* and *UBQ10* for sheath Organ and *TIP41-like* and *UBQ10* for rachises, and with data for the less stably expressed genes *EeF-1 α* and *β -tubulin* for sheath Organ, and *β -tubulin* and *ACT11* for rachises. For grain, the target gene was the *BT1-1* ADP-glucose transporter, expression data of which was normalised with that of the two most stably expressed genes for this Organ, *TIP41-like* and *CYP2*, and two less stably expressed genes, *UBQ5* and *Eef-1 α* , as determined by RefFinder when all treatments were analysed together. Amplification conditions for RT-qPCR were the same as those described above.

Experimental design and statistical analysis. The experimental design was completely randomised with one cultivar (BRS AG), four treatments (T1, T2,

T3 and T4) and three replicates. The experimental unit consisted of a pot containing four plants, each pot being a biological replicate.

Expression data were submitted to analysis of variance (ANOVA; $P \leq 0.05$) and the mean values were compared by Tukey's test at 5% probability, using SAS 9.3 statistical software (SAS Institute Inc.). Statistical analysis was performed separately for each Organ, leaf, rachis, sheath and grain.

RESULTS

For leaves of rice cv. BRS AG, at the reproductive stage, the most stably expressed genes classified by the comparative ΔCT and NormFinder methods were *UBC-E2* and *eIF-4- α* (Fig. 1a, c), whereas the BestKeeper algorithm indicated that *β -tubulin* and *cyclophilin* were more stably expressed (Fig. 1b). The expression stability of the set of reference gene candidates was examined using the geNorm software, which calculated the expression stability (M) for each gene based on the average variation of one gene relative to all others tested, using a threshold of >1.5 . Therefore, a lower value of M indicated greater expression stability for the gene. For all samples evaluated, *UBC-2E* and *GAPDH* were the most stably expressed genes (Fig. 1d).

The results obtained from the comparative method ΔCT , BestKeeper, geNorm and NormFinder were confirmed by RefFinder, which integrated the four algorithms and classified the genes tested based on the geometric mean. In leaves of cv. BRS AG, at the reproductive stage, RefFinder indicated *UBC-E2* and *GAPDH* were the more stably expressed genes, and *cyclophilin* and *ACT11* were the least stably expressed (Fig. 1e)

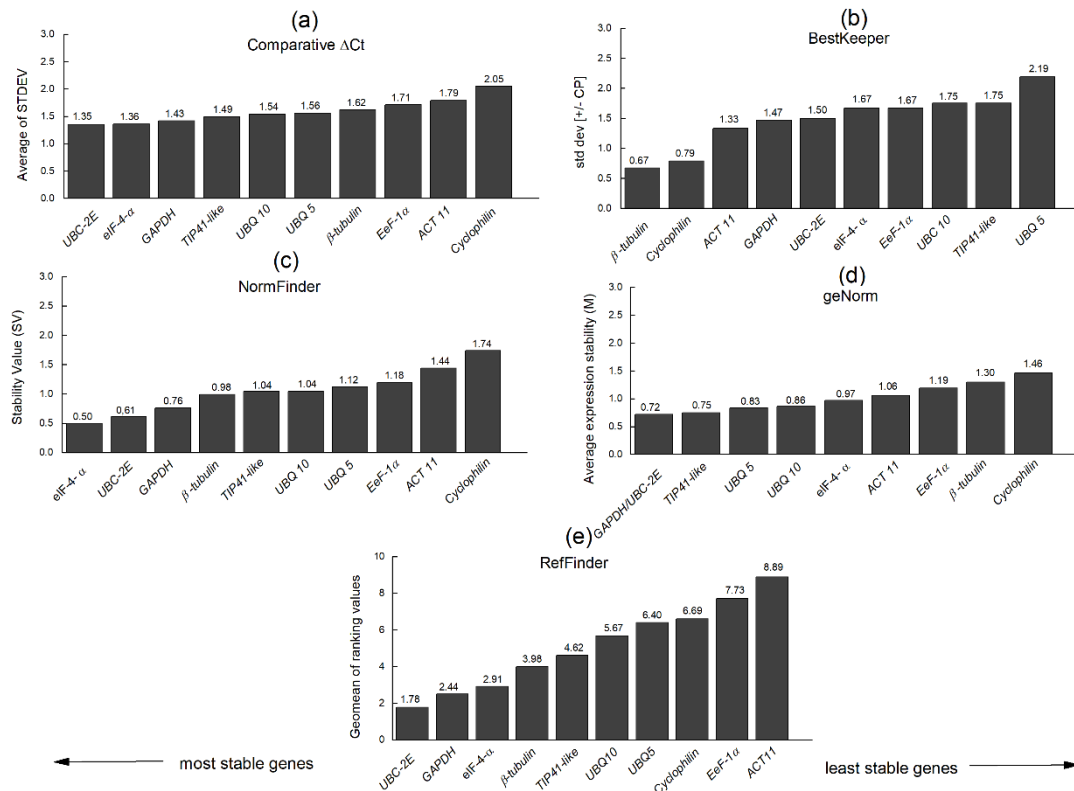


Fig. 1 Stability of expression of ten candidate reference genes in leaves of rice cv. BRS AG, submitted to different treatments, according to comparative ΔC_t (a), BestKeeper (b), NormFinder (c), geNorm (d) and RefFinder (e). The treatments were: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage.

For sheath Organ (Fig. 2), the *UBQ5* and *UBQ10* genes were the two most stably expressed, as determined by all methods except for BestKeeper, which indicated *cyclophilin* was the second most stably expressed gene for the study conditions. According to the four algorithms used and RefFinder, the *β -tubulin* gene showed the greatest variation, being the least stably expressed gene.

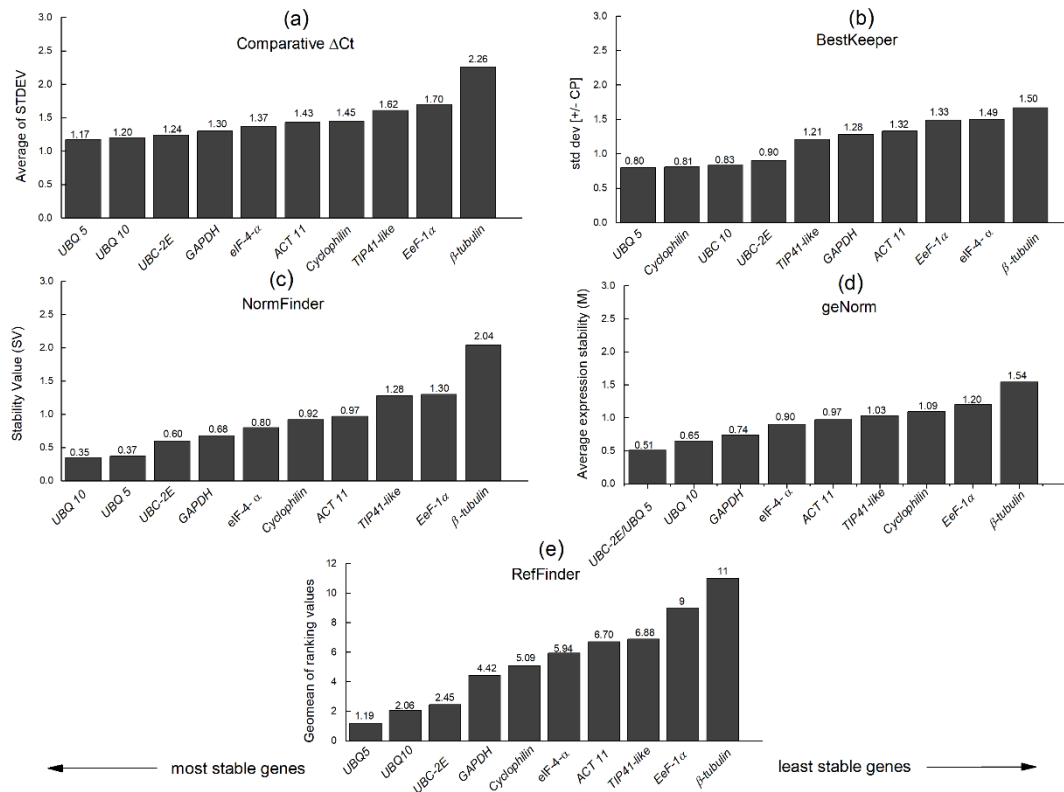


Fig. 2 Stability of expression of ten candidate reference genes in the sheath of rice cv. BRS AG, submitted to different treatments, according to comparative ΔC_t (a), BestKeeper (b), NormFinder (c), geNorm (d) and RefFinder (e). The treatments were: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage.

As shown in Fig. 3a and 3c, the genes that showed greater expression stability for rachis Organ of cv. BRS AG were *TIP41-like* and *UBC-2E* according to the comparative ΔC_t and NormFinder methods. Among the candidate genes evaluated by the BestKeeper method, the *UBQ10* and *UBQ5* genes were the most stably expressed (Fig. 3b). The *TIP41-like*, *UBQ10* and *Eif-4- α* genes were identified by geNorm and RefFinder as being the three most stably expressed genes under the treatments tested (Fig. 3d, e).

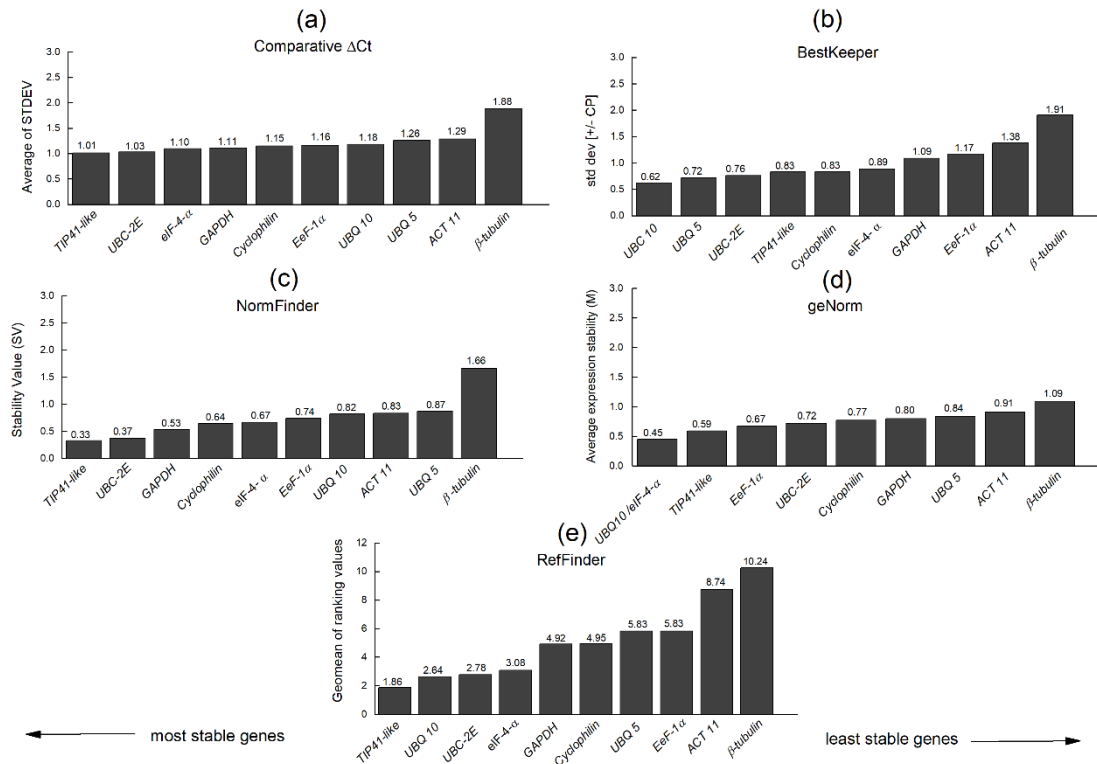


Fig. 3 Stability of expression of ten candidate reference genes in the rachis of rice cv. BRS AG, submitted to different treatments, according to comparative ΔC_t (a), BestKeeper (b), NormFinder (c), geNorm (d) and RefFinder (e). The treatments were: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage.

For grains of cv. BRS AG, *TIP41-like* and *cyclophilin* genes were the most stably expressed, as determined by all methods with the exception of the NormFinder algorithm, which selected genes *cyclophilin* and β -*tubulin*. In addition, all the software programs identified *UBQ5* and *Eef-1 α* as the least stably expressed genes for this Organ (Fig. 4).

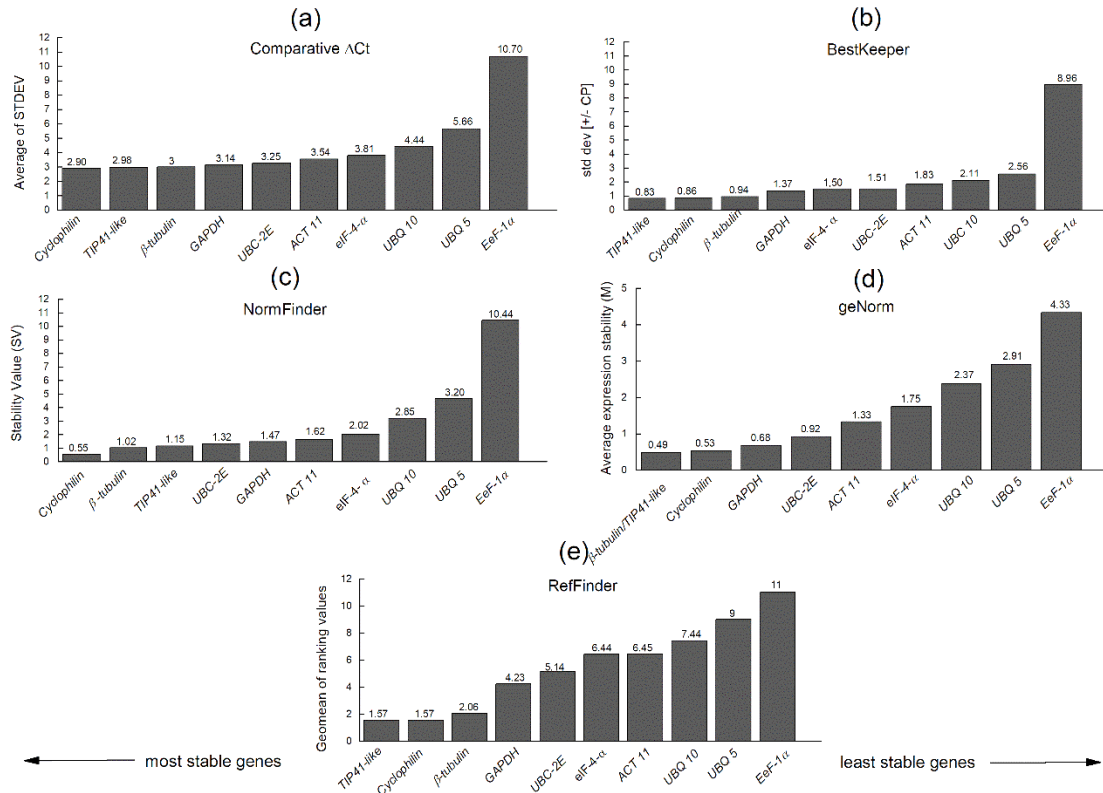


Fig. 4 Stability of expression of ten candidate reference genes in the grain of rice cv. BRS AG, submitted to different treatments, according to comparative ΔC_t (a), BestKeeper (b), NormFinder (c), geNorm (d) and RefFinder (e). The treatments were: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage.

To determine the expression levels of candidate genes the reference values of the quantification cycle (C_q) were used. For leaf Organ, the mean C_q values of the genes ranged from 23.72 to 35.54. The β -tubulin gene had the highest mean C_q in leaves of 35.54, while the lowest mean was observed for the UBQ10 gene, with a value of 23.72 (Fig. 5a). For sheath Organ, β -tubulin had the highest mean value of C_q at 35.50, while UBQ10 gene had the lowest value of 23.23 (Fig. 5b). For rachis Organ, UBC-2E gene had the highest mean C_q of 30.39, while UBQ10 had the lowest value of 22.41. Finally, for grain, cyclophilin had the highest mean value and UBQ10 the lowest value, with values of 34.23 and 22.41, respectively (Fig. 5d).

According to Fig. 5, the variation in expression was not constant among the evaluated organs. The *β-tubulin* and *EIF-4-α* genes showed the lowest variation in expression levels among the genes tested in leaf and grain, respectively. On the other hand, for the sheath and rachis organs, *UBC-2E* had the lowest variation for the study conditions. By contrast, *β-tubulin* showed higher variation of expression for both sheath and rachis organs, while *ATC11* and *Eef-1α* were the least stably expressed genes for leaf and grain Organ, respectively.

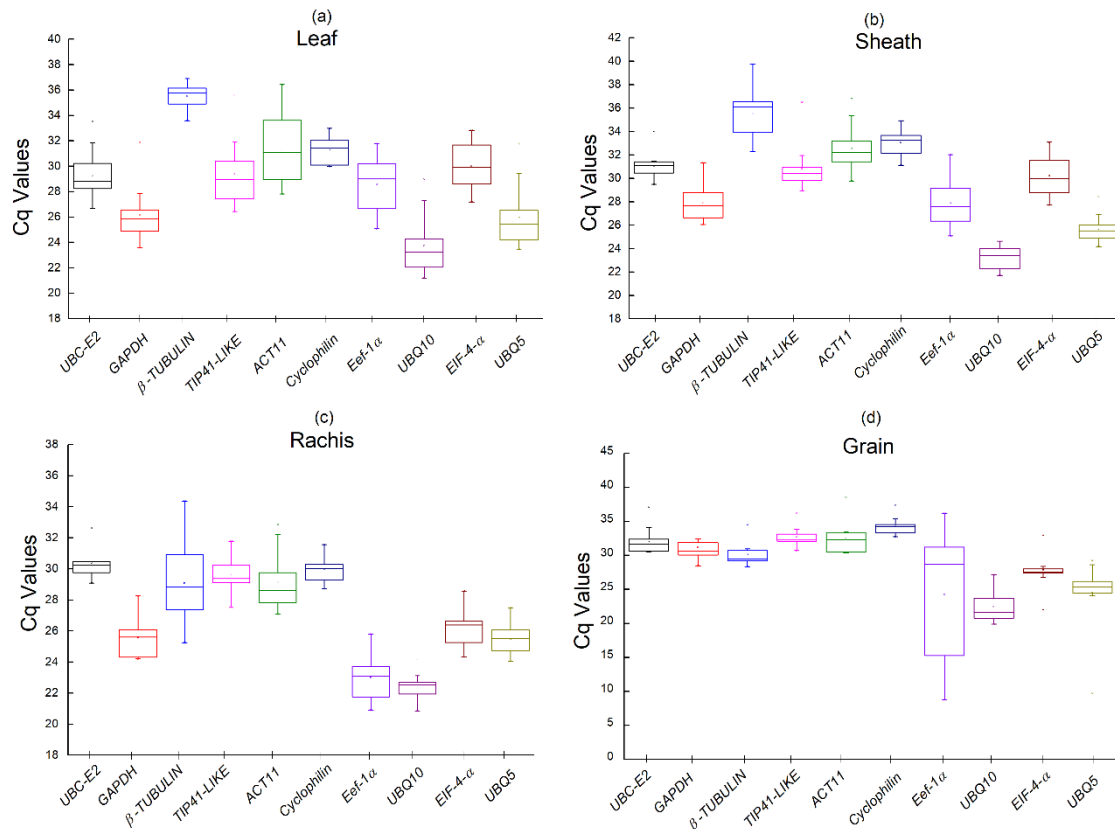


Fig. 5 RT-qPCR quantification cycle values of ten candidate reference genes in leaves (a), sheaths (b), rachises (c) and grains (d) of rice cv. BRS AG, under the different treatments: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage. The lower quartile is the value for 25% of the sample. The upper quartile is the value for 75% of the sample. The edges indicate the maximum and minimum values. The bigger the box, the greater the variation.

Calculation of the variation of pairs (V_n/V_{n+1}) with the candidate gene combinations was analysed using the geNorm program to determine the need for adding more reference genes, with a cutoff value of 0.15. According to this criterion, it was found that for all organs evaluated in this study, that the use of only two reference genes was enough to normalise the expression data. It was observed that the value of $V_{2/3}$ in the leaves of cv. BRS AG at the reproductive stage was 0.0108 (Fig. 6a). For the sheath, the value of $V_{2/3}$ corresponded to 0.0101 (Fig. 6b), for rachis Organ it was 0.0094 (Fig. 6c), while in grain the value was 0.0100 (Fig. 6d).

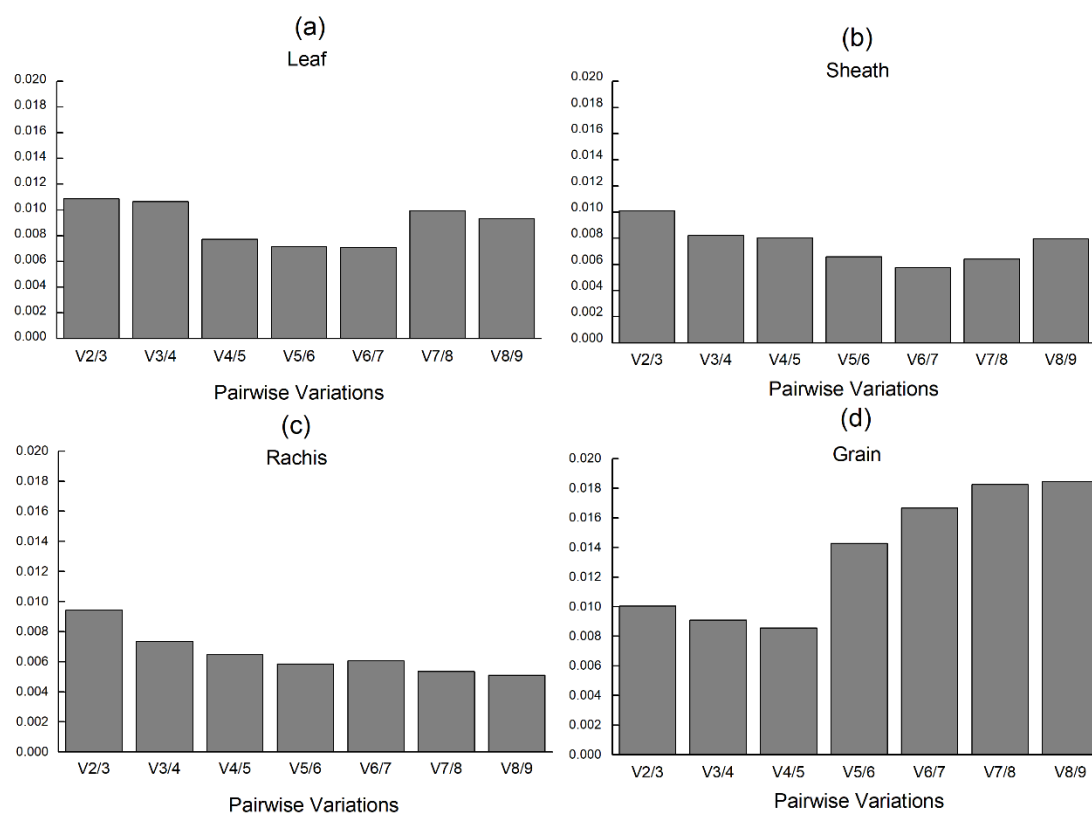


Fig. 6 Pairwise variation (V) calculated by the geNorm algorithm to determine the minimum number of reference genes for proper normalisation in leaves (a), sheaths (b), rachises (c) and grains (d) of rice cv. BRS AG, under the different treatments: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, Irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, Irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, Irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage.

To verify the stability of expression of the reference genes selected above, the relative expression of a gene involved in glycine betaine biosynthesis, CMO, was investigated in rice leaves, using the two most and least stably expressed reference genes. It was observed that the expression of the target gene in leaves differed for treatments T2 and T3 statistically when normalised with the most stably expressed reference genes, *UBC-2E* and *GAPDH* (mean values of expression of 0.05 and 0.04, respectively), compared with the least stably expressed reference genes, *Eef-1 α* and *ACT11*, (mean values of expression of 0.23 and 0.92, respectively; Fig. 7a).

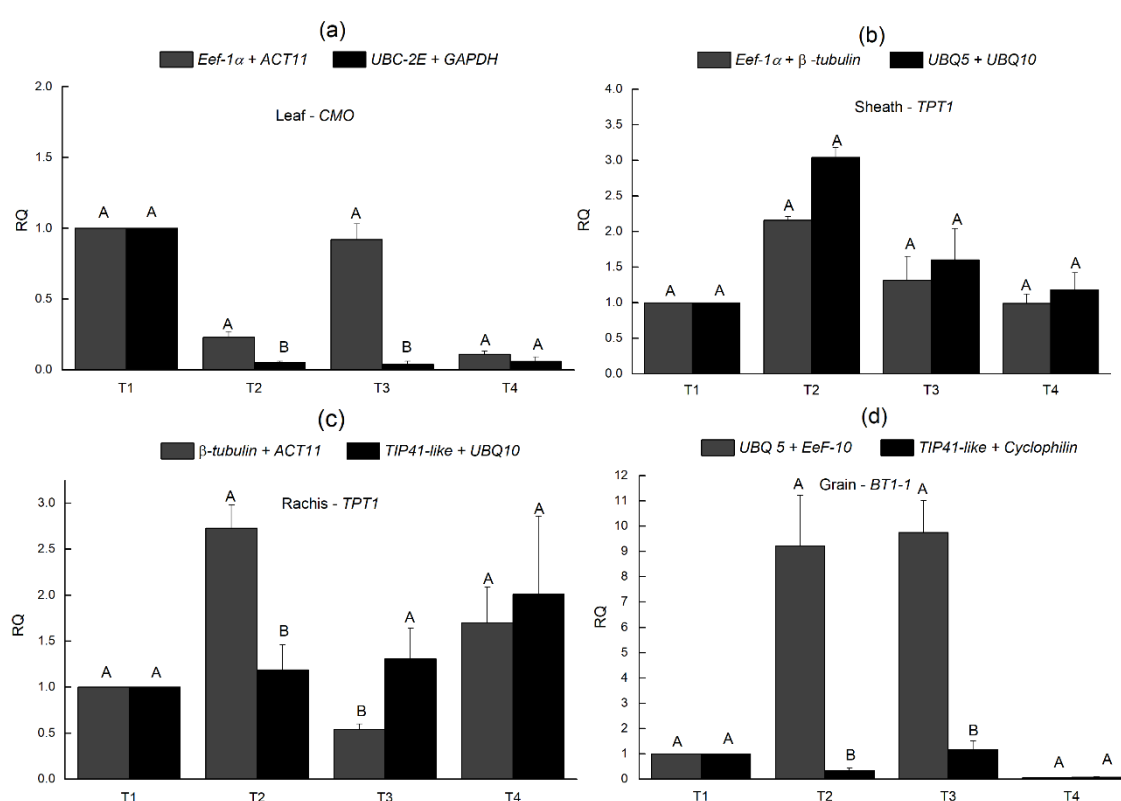


Fig. 7 Expression profile of the *CMO* (a) *TPT1* (b) *TPT1* (c) and *BT1-1* (d) genes in leaves, sheaths, rachises and grains, respectively, of rice cv. BRS AG, submitted to the different treatments: T1, control (irrigation only with nutrient solution throughout cycle); T2, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the reproductive stage; T3, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl in the vegetative and reproductive stages; and T4, irrigation with nutrient solution + 150 mM NaCl at the vegetative stage. The combinations of the two best reference genes for leaves (*UBC-E2* + *GAPDH*), sheaths (*UBQ5* + *UBQ10*), rachises (*TIP41* + *UBQ10*), and grain (*TIP41* + *cyclophilin*) are shown in black, while those

of the reference genes with the least stable expression for leaves (*EeF-1 α* + *ACTIN 11*), sheaths (*EeF-1 α* + *β -tubulin*), rachises, (*β -tubulin* + *ACT11*) and grain (*UBQ5* + *EeF1 α*) are represented in gray. Data are presented as means $\pm$ standard deviation, calculated from three biological replicates. The upper case letters indicate a significant difference ($p \leq 0.05$) between the most and least appropriate reference genes in each treatment.

To validate the results obtained for the reference genes in the sheath and rachis organs, relative expression analysis was conducted using the *TPT1* gene. For the sheath, there was not a significant difference for the evaluated treatments between data normalised with the most stably expressed reference genes and that normalised with the least stably expressed reference genes (Fig. 7b). For rachis Organ, *TPT1* was also used to validate the reference genes, with a significant difference in expression values for T2 and T3. Using the most stably expressed genes, the expression values were 1.19 and 1.31, respectively, while using the less stably expressed genes the values were 2.73 and 0.54, respectively (Fig. 7c).

For grain, for the *BT1-1* target gene, there was variation in the expression response between the less and more stably expressed reference genes. When the more stably expressed reference genes were used for normalisation, the expression values of the target gene were 0.34 and 1.1 for treatments T2 and T3, respectively, differing statistically from the expression values when normalised with the least stably expressed genes, which produced values of 9.22 and 9.72, respectively (Fig. 7d).

DISCUSSION

When carrying out gene expression analysis, particularly by RT-qPCR, it is essential that there is correct standardisation, in order to guarantee the control of non-specific variation between samples. The most commonly used method for normalising data with this technique is based on the use of one or more reference genes [17]. According to previous studies on the selection of reference genes in plants for RT-qPCR, the expression level of a reference gene may not be constant between species. In addition, variation may occur within the same species in response to various treatments or different plant organs. Thus, genes

involved in metabolism may exhibit significant variation in expression in different situations [9]. Therefore, choosing appropriate reference genes is a crucial step in experimental design, in generating data that is reliable and less likely to be misinterpreted.

In this current study, it was possible to observe that expression of potential reference genes changed in different organs in the same species. For leaves of cv. BRS AG, the most appropriate reference genes were *UBC-E2* and *GAPDH*. A study with cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.) showed that it showed that, depending on the conditions, the reference genes behaved differently, with *UBQ7*, *GAPDH*, *EFIA8* being the most appropriate genes when studying saline stress in leaves of this species [18]. Evaluation of expression levels of candidate reference genes in *Amaranthus* (*Amaranthus hypocondriacus*) indicated *AhyMDH*, *AhyGAPDH*, *AhyEF-1a* and *AhyACT* were ideal for normalisation in this species for the study conditions [19]. [20] obtained similar results studying leaves of rice plants subjected to water deficit in the vegetative and reproductive stages, showing that *UBC-E2* and *UBQ5* could be used as reference genes in all treatments tested. On the other hand, *β -tubulin*, *eIF-4 α* and *GAPDH* showed high instability of expression, as was also observed in the present study, where *β -tubulin* was the least appropriate gene, except in the case of sheath, rachis and grain organs.

The *GAPDH* gene, according to [21], is one of the most frequently used reference genes, to the extent it is considered "classical". For leaves of cv. BRS AG, *GAPDH* showed high expression stability. The enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) participates in one step of glycolysis, converting glyceraldehyde-3-phosphate to 1,3-bisphosphoglycerate, with concomitant reduction of NAD^+ to NADH [21].

In the present study, the *UBQ5* and *UBQ10* showed a relatively stable pattern of expression, and were considered the most appropriate reference genes in sheath Organ. [11] evaluated 25 samples, 7-day-old light-grown seedlings (7dL), 7-day-old dark-grown seedlings (7dD), 7dL shoots, 7dL roots, mature leaf Organ, rachises, young inflorescences (5-10 mm), pre-pollinated (PP) flowers, post-fertilised (PF) flowers and mature seed, and verified that among the most stably expressed genes was *UBQ5* gene, consistent with our results. By contrast, the same authors indicated that *UBQ10* was less stably

expressed, whereas in our study we found that it was the most appropriate reference gene for sheath and rachis organs.

For the rachis and grain, the most stably expressed genes were *TIP41-like* and *UBQ10*, and *TIP41-like* and *cyclophilin*, respectively. [22], when evaluating carrot plants under saline stress using NormFinder, indicated that *TIP41* was the most stably expressed gene. In our study, both NormFinder and BestKeeper identified the same gene as more stably expressed for both rachis and grain, while the same authors recommended *UBQ* under cold conditions. [4] also suggested *UBQ10* was more suitable for studies on rice leaves subjected to saline stress because it exhibited a continuous expression pattern. This same study indicated *eIF-4 α* , *cyclophilin* and *TIP41* as less suitable reference genes. In contrast with the current study, [23] found that the most stable genes in rice grains collected at 3, 6, 10, 15 and 20 days after flowering, and in samples from different organs, were *eIF-4 α* , *ACT1* and *UBC*.

According to [24], a well-studied function of ubiquitin is its role in selective proteolysis by the ubiquitin-proteasome system. Ubiquitination is a process involving the action of three enzymes, with ubiquitin conjugation enzyme (UBC-E2) binding ubiquitin to the substrate. Among several processes, ubiquitination is involved in plant responses to environmental stresses, such as drought, salinity, and low temperatures. Of the genes analyzed in the current study with rice cv. BRS AG, under saline stress, the genes encoding *ubiquitin 2E (UBC2E)*, *ubiquitin 10 (UBQ10)* and *ubiquitin 5 (UBQ5)* were among the most stably expressed genes in the organs investigated.

Aquaporins are membrane proteins that function as water-conducting pores in plant and animal cells. They occur on the plasma membrane (PIPs) and the tonoplast membrane (TIPs). They participate in the transport of water in the whole plant, as well as performing important functions at the cellular level, acting as buffers to osmotic fluctuations that may occur in the cytosol, especially in situations of saline and/or water stress [25]. The *TIP41* gene, coding for an aquaporin, was shown to be stably expressed under the conditions of the current study for rachis and grain Organ.

For the boxplot graph, where no selection program was used and only the Cq analysis was taken into account, differences in the expression stability of genes could be identified. This demonstrated the importance of using these

software programs, which allowed the identification of stably expressed genes in a set of samples. These tools included geNorm, NormFinder, and Bestkeeper [13-14,15], which have been widely used by researchers to find suitable reference genes. These programs allow the calculation of a normalisation factor based on multiple reference genes, improving its robustness. BestKeeper employs quantification cycle values directly for expression stability calculations, while geNorm and NormFinder have these values changed for relative quantities using the normalisation factor [13-14]. The RefFinder tool has also been used, which integrates geNorm, NormFinder, BestKeeper and the comparative ΔCt method.

The *cyclophilin* for leaves, *β -tubulin* for sheaths and rachises, and *EeF-1 α* for grains were shown to be less stably expressed in the current study. Cyclophilin proteins are involved in increased mitochondrial membrane permeability [26]. Tubulin protein has two α and β subunits, with structural functions in eukaryotic cell microtubules. In addition to the role of *eIF-1 α* in protein synthesis, it also seems to act in the organisation of the cytoskeleton [27]. [28] found that *tubulin* genes were the least stable genes in their study of different organs and development stages of *Solanum lycopersicum*, consistent in part with the current study, since *β -tubulin* and *eIF-1- α* were judged to be the least appropriate reference genes for sheath, rachis and grain Organ of cv. BRS AG.

Plant productivity and yield are governed by the ability to synthesis, transport and use photo-assimilates by sink organs, especially during the reproductive phase [29]. Plants of cultivar BRS AG have this characteristic, and thus the presence of highly effective transporters and/or enzymes involved in the metabolism and translocation of carbohydrates may be responsible for the accumulation of starch in the grain. Studies have shown that the triose phosphate translocator (TPT) family, located on the inner membrane of the chloroplast, carries out the exportation of triose phosphate into the cytosol in exchange with inorganic phosphate (Pi), and play an important role during the filling of rice grains [29]. Likewise, some previous studies have shown that the ADP glucose transporter (BT1-1) is essential during the synthesis of starch in cereals, such as rice.

Throughout their life cycle, plants are exposed to unfavourable environmental conditions, such as saline stress. Glycine betaine is an osmoprotector, which can act in reducing oxidative stress by stabilising cell

macromolecules under adverse conditions [30]. It is synthesis from choline by two stages of oxidoreduction, with choline monooxygenase (CMO) participating in the first stage of synthesis. Using *TPT1*, *BT1-1* and *CMO* to validate the candidate reference genes, we could observe changes in expression values. The results of the current study showed the importance of carefully choosing reference genes in experiments comparing the expression of target genes, due to their potential variations in expression. In fact, it was possible to observe that within the same species, the most appropriate reference genes were different depending on the Organ being analyzed.

The results presented in this study will aid in future studies involving gene expression. In addition, our work differs from others because it involves more than one stress event, as it can be observed in the experimental design, ie, how a previous stress event contributes to a better adaptive response to plants to a new unfavorable event. In the present study, it was tested in the vegetative and/or reproductive stages.

CONCLUSION

From the evaluation of ten potential reference genes in rice cv. BRS AG, under salt stress (150 mM NaCl) at different times of its cycle, we identified two appropriate reference genes for each Organ analyzed. The most appropriate genes to normalise RT-qPCR data in this species were *UBC2E* and *GAPDH* for leaves, *UBQ5* and *UBQ10* for sheaths, *TIP41* and *UBQ10* for rachises, and *TIP41* and *cyclophilin* for grain. In contrast, in these organs, the genes that presented the greatest variation in gene expression were *β -tubulin*, *EeF1 α* and *ACT11*, making them inappropriate reference genes for these organs, under the conditions of this study.

REFERENCES

1. Ismail, A.M., Horie, T., Genomics, Physiology, and Molecular Breeding Approaches for Improving Salt Tolerance, *Annu Rev Plant Biol.*, 2017, vol. 68, pp. 405-434.

2. Yang, Y., Guo, Y., Unraveling salt stress signaling in plants, *Journal of Integrative Plant Biology.*, 2018, vol. 60, pp. 796-804.
3. Magalhães Júnior, A.M., Fagundes, P.R.R., Franco, D.F., Morais, O.P., Siqueira, F.G., Streck, E.A, Aguiar G.A., Facchinello, P.H.K., BRS AG: first cultivar of irrigated rice used for alcohol production or animal feed, *Crop Breed Appl Biotechnol.*, 2017, vol. 17, pp. 72-77.
4. Moraes, G.P., Benitez, L.C., do Amaral, M.N., Vighi, I.L., Evaluation of reference genes for RT-qPCR studies in the leaves o rice seedlings under salt stress, *Genet Mol Res.*, 2015, vol. 14, pp. 2384-2398.
5. Kordrostami, M., Rabiei, B., Kumleh, H.H., Different physiobiochemical and transcriptomic reactions of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in terms of salt sensitivity under salinity stress, *Environ Sci Pollut Res.*, 2017, vol. 24, pp. 7184–7196.
6. Bruce, T.J.A., Matthes. M.C., Napier. J.A., Pickett, J.A., Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms, *Plant Sci.*, 2007. vol. 6, pp. 603 - 608.
7. Ruduś, I., Kępczyński, J., Reference gene selection for molecular studies of dormancy in wild oat (*Avena fatua* L.) caryopses by RT-qPCR method, *PLoS ONE.*, 2018, vol. 2, pp. 019-343.
8. Joseph Najya, J.P., Jasmine, M.S., Plant reference genes for development and stress response studies, *J Biosci.*, 2018, vol. 1, pp. 73–187.
9. Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S.T., An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development, *BMC plant biology.*, 2006, vol. 1, no. 27.
10. Zhang, Z., Hu, J., Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to

- endocrine disrupting chemicals by quantitative realtime RT-PCR, *Toxicol Sci.*, 2009, vol. 95, no. 2, pp.356–368.
11. Jain, M., Nijhawan, A.A., khilesh KTyagi, J.P., Khurana., Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR, *Biochem Biophys Res Commun.*, 2006, vol. 2, pp. 646-651.
 12. Han, P.P., Qin, L., Li, Y.S., Liao, X.S., Xu., Z.X., Hu, X.J., Xie, L.H., Yu, C.B., Wu, Y.F., Liao, X., Identification of suitable reference genes in leaves and roots of rapeseed (*Brassica napus* L.) under different nutrient deficiencies, *J Integr Agric.*, 2017, vol. 16, pp. 809–819.
 13. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome biology.*, 2002, vol. 3, no. 7 research 0034.
 14. Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F., Normalization of real-time quantitative reverse transcription PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets, *Cancer Research.*, 2004, vol. 64, pp. 5245-5250.
 15. Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations, *Biotechnol Lett.*, 2004, vol. 6, pp. 509-515.
 16. Silver, N., Best, S., Jiang, J., Thein, S.L., Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR, *BMC Molecular Biology.*, 2006, vol. 7, pp. 33-42.

17. Rebouças, E.D.L., Costa, J.J.D.N., Passos, M.J., Passos, J.R.D.S., Hurk, R.V.D., Silva, J.R.V., Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different organs, *Braz Arch Biol Technol.*, 2013, vol. 1, pp. 143-154.
18. Wang, M., Wang, Q., Zhang, B., Evaluation and selection of reliable reference genes for gene expression under abiotic stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Gene.*, 2013, vol. 530, pp. 44-50.
19. Hernandez, V.F.P., Martinez Nunez, M., Ruiz Rivas, M., Vazquez Portillo, R.E., Bibbins Martinez, M.D., Luna Suarez, S., Cardenas, R., Reference genes for RT-qPCR normalisation in different organs, developmental stages and stress conditions of amaranth, *Plant Biology.*, 2018. vol. 20, pp. 713–721.
20. Auler, P.A., Benitez, L.V., do Amaral, M.N., Vighi, I.L., Rodrigues, G.S., da Maia, L.C., Braga. E.J.B., Evaluation of stability and validation of reference genes for RT-qPCR expression studies in rice plants under water deficit, *J. Appl Genetics.*, 2016. doi 10.1007/s13353-016-0374-1.
21. Jonge, H.J.M., Fehrman, R.S.N., De Bont, E.S.J.M., Hofstra, R.M.W., Gerbens, F., Kamps, W.A., de Vries E.G.E., Zee, A.G.J., Te Meerman, G.J., Ter Elst, A., Evidence based selection of housekeeping genes, *PLoS One.*, 2007, vol. 8 pp. 898.
22. Tian, C., Jiang, Q., Wang, F., Wang, G.L., Xu, Z.S., Xiong, A.S., Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves, *PLoS ONE.*, 2015, vol. 10, pp. 0117569.
23. Li, Q.F., Sun, S.S.M., Yuan, D.Y., Yu, H.X., Gu, M.H., Liu, Q.Q., Validation of Candidate Reference Genes for the Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data in Rice During Seed Development, *Plant Mol Biol Rep.*, 2009, vol. 28, pp. 49–57.

24. Stone, S.L., The role of ubiquitin and the 26S proteasome in plant abiotic stress signaling. *Review article* doi: 10.3389/fpls.2014.00135, 2014.
25. Chaumont, F., Tyerman, S.D., Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations, *Plant Physiol.*, 2014. vol. 164, pp. 1600–1618.
26. Caldana, C., Scheible, W.R., Roeber, B.M., Ruzicic, S., A quantitative RT-PCR platform for high-throughput expression profilin of 2500 rice transcription factors, *Plant Methods*, 2007, vol. 3, pp. 1-7.
27. Sasikumar, A.N., Perez, W.B., Kinzy, T.G., The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdiscip Rev.*, 2012, vol. 3, pp. 543-555.
28. Expósito-Rodríguez, M., Borges, A.A., Borges-Perez, A., Perez, J.A., Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol.*, 2008, vol. 8, pp. 131.
29. Scofield, G.N., Hirose, T., Aoki, N., Furbank, R.T., Involvement of the sucrose transporter, OsSUT1, in the long-distance pathway for assimilate transport in rice, *J Exp Bot.*, 2007, vol. 58, pp. 3155–3169.
30. Ahmad, P., Abdel, L.A.A., Hashem, A., AbdelAlla, E.F., Gucel, S., Tran, L.P., Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea, *Front. Plant. Sci.*, 2016, 7 347.

Supporting information

Supplementary Table S1.

Description of the reference genes and three candidate reference genes for the qRT-PCR reactions in rice plants, cv. BRS AG under salt stress.

GENE	ACCESS	PRIMER F	PRIMER R	BIBLIOGRAPHY
<i>ACT11</i>	AK100267	5'-CAGCCACACTGTCCCATCTA-3'	5'-AGCAAGGTCGAGACGAAGGA-3'	Zhang et al. (2009)
<i>β-Tubulin</i>	AK072502	5'-GCTGACCACACCTAGCTTTGG-3'	5'-AGGGAACCTTAGGCAGCATGT-3'	Zhang et al. (2009)
<i>UBC-E2</i>	AK059694	5'-CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA-3'	5'-AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG-3'	Jain et al. (2006)
<i>eIF-4α</i>	AK073620	5'-TTGTGCTGGATGAAGCTGATG-3'	5'-GGAAGGAGCTGGAAGATATCATAGA-3'	Jain et al. (2006)
<i>UBQ10</i>	AK101547	5'-TGGTCAGTAATCAGCCAGTTTGG-3'	5'-GCACCACAATACTTGACGAACAG-3'	Jain et al. (2006)
<i>UBQ5</i>	AK061988	5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3'	5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'	Jain et al. (2006)
<i>GAPDH</i>	AK064960	5'-AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT-3'	5'-CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT-3'	Jain et al. (2006)
<i>TIP41 – Like</i>	AK103511	5'-GTTTGGATGAACCCGCAA-3'	5'-GGCAACAAGGTCAATCCGATC-3'	Caldana et al. (2007)
<i>Cyclophilin</i>	AK121304	5'-CCACCATCACAGATCGGATCTT-3'	5'-GCGGTCAGAGCGAAAGTAGCTA-3'	Caldana et al. (2007)
<i>EeF-1α</i>	AK061464	5'-TTTCACTCTTGGTGTGAAGCA-3'	5'-GACTTCCTTCACGATTTTCATCGT-3'	-
<i>OsCMO</i>	AK120445	5'-ATGGCATTGACACCTCGTTG-3'	5'-TCGTAGGATTGAAGCTGTAGACC-3'	-
<i>OsTPT1</i>	AK099799	5'-ACAACATGGGCGAGGATCAT-3'	5'-CAATCTTACCACCGCAATATGC-3'	-
<i>OsBT1-1</i>	AK107368	5'-CTGGAATCGGATGAAACTCGTGTA-3'	5'-TCAGCAGAAATCAGTTATTGGACATG-3'	-

Artigo II - A ser submetido para publicação no periódico *Journal of Experimental Botany* (ISSN: 1460-2431)

O *priming* com estresse salino no estágio vegetativo melhora a tolerância à salinidade durante o enchimento de grãos em plantas de arroz

Tatiana Rossatto^{1*}, Marcelo Nogueira do Amaral¹, Priscila Ariane Auler¹, Márcio Espinosa de Farias¹, Juliana Aparecida Fernando¹, Gustavo Maia Souza¹, Eugenia Jacira Bolacel Braga¹

¹Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil. *tatyrossato@hotmail.com

Resumo

O armazenamento de informações sobre um evento de estresse passado pode beneficiar as plantas preparando-as para estímulos recorrentes, fenômeno associado à produção de memória em plantas. Portanto, a hipótese do presente estudo é que plantas de arroz, expostas a estresse salino recorrente apresentam respostas fisiológicas, bioquímicas, moleculares e anatômicas distintas de plantas submetidas a salinidade pela primeira vez no estágio de enchimento de grãos. Para isso as plantas de arroz, cv. BRS AG foram submetidas a diferentes eventos de estresse salino, identificando as seguintes condições: T1: Controle; T2: Aplicação de 150 mM de NaCl + solução nutritiva, somente no estágio vegetativo (V5); T3: Aplicação de 150 mM de NaCl + solução nutritiva, somente no estágio reprodutivo (R7-R8) e T4: Aplicação de 150 mM de NaCl + solução nutritiva, no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8). As coletas foram realizadas no estágio reprodutivo (R7-R8) após sete dias de estresse salino e após dois dias de recuperação. Este estudo demonstrou que, plantas submetidas a estresse recorrente apresentaram diferenças na condutância estomática, índice de clorofila, extravasamento de eletrólitos, diâmetro de vasos condutores em folhas e raízes, e uma menor razão Na^+/K^+ em relação a plantas que passaram por estresse somente no estágio reprodutivo. Adicionalmente, a partir dos

resultados de expressão diferencial de genes que codificam para transportadores de triose fosfato, sacarose, ADP-glicose em diferentes órgãos e atividade de enzimas envolvidas na conversão de sacarose em amido no grão, foi possível observar que as plantas sob estresse recorrente, reagem de forma distinta quanto a capacidade de transportar e utilizar os assimilados nos grãos, mitigando os efeitos do estresse salino. Estes resultados acrescentam novas respostas de plantas de arroz ao estresse salino recorrente, e demonstram que a aquisição de memória envolve diversos processos.

Palavras-chaves: Anatomia, carboidratos, estresse abiótico, fonte-dreno, memória, *Oryza sativa* L.

Abreviações:

CO₂ - dióxido de carbono

TPT - translocador de triose-fosfato/fosfato

Pi - fosfato inorgânico

SUT - transportador de sacarose do tipo simporte

SuSy - sacarose sintase

ADPG - ADP-glicose

AGPase - ADP-glicose pirofosforilase

BT1 - proteína Brittle-1

EROs - espécies reativas de oxigênio

MDA - concentração de malondialdeído

APX - ascorbate peroxidase

CAT - catalase

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

O₂•⁻ - radical superóxido

SOD - superóxido dismutase

CIN - invertase ácida de parede

NIN - invertase neutra

VIN - invertase vacuolar

Introdução

A salinidade do solo é um fator generalizado, cerca de 900 milhões de hectares de terra, 20% das terras cultivadas em todo o mundo e metade da terra arável total irrigada globalmente, estão sob estresse de salinidade em diferentes graus (Kibria *et al.*, 2017). As respostas das plantas ao estresse salino são desencadeadas pela redução do potencial osmótico seguido pela toxicidade iônica. A pressão osmótica no nível das raízes causa perda de água e consequente redução do turgor, o que leva a uma diminuição na expansão celular e no crescimento das plantas. Toxicidade de íons, em particular devido ao acúmulo de Na^+ , afeta o metabolismo celular, a fotossíntese e induz o estresse oxidativo (Riaz *et al.*, 2019). A redução da fotossíntese e, consequentemente, da translocação nos teores de açúcar solúvel, bem como a diminuição da atividade de enzimas que realizam a hidrólise da sacarose e síntese de amido durante o enchimento de grãos são as principais causas da redução do rendimento sob estresse salino em plantas de arroz (Riaz *et al.*, 2019).

A cultivar de arroz irrigado BRS AG foi desenvolvida para outros fins, que não o consumo humano, podendo ser utilizada como matéria prima para produção de etanol e ou para alimentação animal. A BRS AG tem como genitores a cultivar americana Gulfmont de arroz irrigado e a linhagem SLG1 de origem japonesa (Takita, 1983), sendo obtida através de cruzamento simples (Magalhães Júnior *et al.*, 2017). Uma característica marcante desta cultivar quando comparada com as demais é o peso médio de mil grãos ser aproximadamente de 52 g, enquanto a maioria das cultivares de arroz irrigado apresentam um peso médio de mil grãos de 25 g. A cultivar apresenta um tamanho maior que as demais e pode alcançar o dobro da produtividade que é estimada em até 12 toneladas por hectare (Magalhães Júnior *et al.*, 2017). Com isso, identificar cultivares de arroz que, além de possuírem alta produtividade, consigam tolerar as condições adversas, oferece grande potencial para mitigar as perdas de rendimento em ambientes de estresse (Han *et al.*, 2015).

Recentemente, alguns estudos mostraram que a exposição a eventos de estresse no início do desenvolvimento pode beneficiar as plantas preparando-as para eventos de estresse em estádios posteriores de crescimento, fenômeno

esse associado à memória do estresse em plantas (Backhaus *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2015; Abid *et al.*, 2018; Auler *et al.*, 2020; Amaral *et al.*, 2020a; Amaral *et al.*, 2020b). A memória de estresse envolve mecanismos que operam sobre vários eventos de estresse e recuperação na mesma geração ou entre gerações de plantas (Vincent *et al.*, 2020). As evidências sugerem que as plantas alteram diversas funções fisiológicas e metabólicas ao passarem por um evento de estresse primário (*priming*) e são capazes de armazenar essas informações que podem ser prontamente recrutadas e/ou ativadas em resposta a um evento de estresse subsequente (Bruce *et al.*, 2007). Isso tem o efeito de aumentar a plasticidade, permitindo respostas mais intensas ou mais eficazes pelas plantas a eventos de estresse posteriores (Vincent *et al.*, 2020). Por exemplo, plantas de arroz pré-tratadas com estresse térmico subletal no estágio vegetativo aumentaram a tolerância ao mesmo estresse durante o enchimento de grãos (Shi *et al.*, 2015).

Ao nível fisiológico a produtividade e o rendimento da planta dependem da relação fonte – dreno, um processo dinâmico determinado pela capacidade dos tecidos fonte produzirem fotoassimilados por meio da luz capturada e dióxido de carbono (CO₂) fixado, e pela capacidade dos tecidos drenos converterem os assimilados em carboidratos de reserva. Logo, a produtividade da planta é regida tanto pela capacidade de sintetizar quanto de transportar e utilizar os fotoassimilados pelos órgãos drenos (Tuncel e Okita, 2013). Nos tecidos fotossintetizantes, a triose fosfato produzida em plastídios pode ser transferida ao citosol por um translocador de triose-fosfato/fosfato (TPT) em troca estrita por fosfato inorgânico (Pi) (Griffiths *et al.*, 2016). No citosol a triose fosfato pode ser utilizada na síntese da sacarose, principal forma de carboidrato produzido nos tecidos fonte, que pode ser temporariamente armazenada e ou translocada em toda a planta via floema (Braun *et al.*, 2014).

No arroz, assim como em outras espécies de cereais, existem duas fontes principais de carbono para o enchimento de grãos, fotoassimilados produzidos na folha bandeira no estágio reprodutivo e carboidratos pré-acumulados na bainha da folha e colmos, depositados na forma de amido que atuam como drenos temporários. Na fase de enchimento de grãos esse amido é convertido novamente à sacarose e transportado a longa distância até a panícula (Chen e Wang, 2008).

Em plantas de arroz o movimento da sacarose para o interior do floema, o transporte de longa distância até a panícula e a entrega nos tecidos drenos ocorre através da via simplástica, exigindo altas densidades de plasmodesmas e/ou via apoplástica que requer transportadores de sacarose para facilitar o movimento de sacarose entre as células (Ayre, 2011). Os transportadores de sacarose do tipo simporte (SUT) integrados à membrana realizam o particionamento de sacarose entre diferentes tecidos, conectando fonte e dreno. O transporte e partição de sacarose mediados por SUT são de importância crucial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como o enchimento de grãos (Radchuk *et al.*, 2017). No tecido dreno a sacarose pode ser hidrolisada pela Invertase que catalisa a hidrólise irreversível da sacarose em frutose e glicose ou pela Sacarose sintase (SuSy) que catalisa a reação reversível da sacarose em UDP-glicose + frutose (Braun *et al.*, 2014). No grão a ADP-glicose (ADPG) é o substrato para a síntese de amido, que é convertido a partir de glicose-1-fosfato por ADP-glicose pirofosforilase (AGPase). O transporte de ADPG do citosol para os amiloplastos é exercido por um transportador de ADPG, a proteína Brittle-1 (BT1) localizada na membrana que reveste os amiloplastos, desempenhando um papel essencial na síntese de amido (Li *et al.*, 2017).

No entanto, nenhum trabalho demonstrou as respostas das plantas de arroz a eventos subsequentes de salinidade durante o estágio de enchimento de grãos. O objetivo desse estudo foi testar a hipótese de que plantas de arroz BRS-AG submetidas a um estresse salino durante o estágio reprodutivo e que foram previamente estimuladas (*priming*) com sal durante o estágio vegetativo reagem de maneira distinta das que não foram previamente estimuladas, com relação à capacidade de transportar e utilizar os fotoassimilados pelos órgãos drenos, regulando a atividade de enzimas do metabolismo de carboidratos, a expressão dos genes que codificam para proteínas transportadoras envolvidas no transporte fonte-dreno, alterando o calibre de vasos condutores no floema e xilema, bem como apresentando alterações no padrão de atividade de enzimas antioxidantes e homeostase de íons capazes de mitigar os efeitos do estresse subsequente.

Material e métodos

Material vegetal e condições experimentais

Para a elaboração desse estudo, sementes da cv. BRS AG, da Estação Experimental Terras Baixas (Embrapa - Clima Temperado) foram germinadas em rolo de papel em câmara de crescimento do tipo “Biological Organism Development” (BOD), com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e temperatura de 25 ± 2 °C, sendo assim mantidas por dez dias. Após esse período, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação e transplantadas para vasos plásticos com capacidade de oito litros, perfurados na base para garantir a perfeita percolação da água, sendo utilizado como substrato areia previamente lavada com água e ácido clorídrico 1 %. A irrigação ocorreu diariamente, alternada com água e solução nutritiva de Yoshida *et al.* (1976), até atingirem o estágio V5, quando as plantas foram submetidas às condições de estresse salino.

No estágio V5, as plantas foram separadas em dois grupos. O primeiro grupo permaneceu somente com irrigação com água e solução nutritiva, enquanto o segundo grupo recebeu solução nutritiva acrescida de 150 mM de NaCl durante quatro dias (*priming*). Após esse período as plantas permaneceram com irrigação normal, alternando água e solução nutritiva, até atingirem o estágio reprodutivo (R7-R8).

No estágio reprodutivo, um grupo de plantas foi exposto ao segundo evento de estresse salino pela adição de 150 mM de NaCl durante sete dias. As plantas tiveram a condutância estomática (gs) monitorada com o auxílio de um porômetro foliar (LI-1600, Li-Cor Bioscience - Lincoln, NE, EUA) e, quando os valores de gs baixaram para aproximadamente 60-70% em relação a gs das plantas irrigadas (Fig. 1), as coletas para as análises foram realizadas no dia seguinte, totalizando sete dias de exposição à salinidade. Após um período de 48 horas de recuperação, as plantas expostas à salinidade (com e sem *priming*) foram novamente amostradas para análises comparativas com o período em que estavam sob estresse (Fig. 2). Dessa forma, o experimento foi constituído por quatro condições (Fig. 2): T1 = Controle: plantas mantidas com irrigação com água e solução nutritiva durante todo o experimento; T2 = Aplicação de 150 mM de NaCl + solução nutritiva, somente no estágio vegetativo (V5); T3 = Aplicação

de 150 mM de NaCl + solução nutritiva, somente no estágio reprodutivo (R7-R8) (não pré-estimuladas), e T4 = Aplicação de 150 mM de NaCl + solução nutritiva, no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8) (pré-estimuladas).

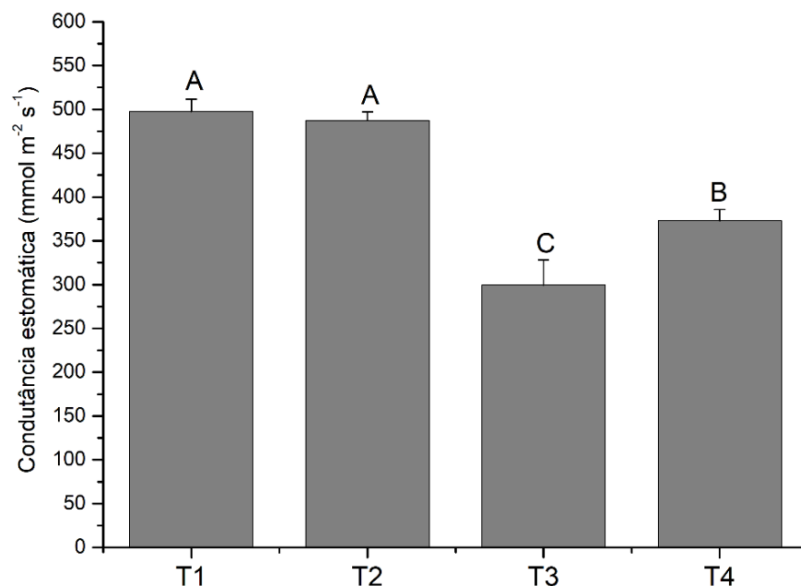


Fig. 1. Condutância estomática (gs) em plantas de arroz, cv. BRS AG, em diferentes condições de estresse salino, após seis dias de aplicação de 150 mM de NaCl no estágio reprodutivo (R7-R8). Os valores são representados pela Média $\pm$ EP para cada condição (n = 9). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições. T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8).

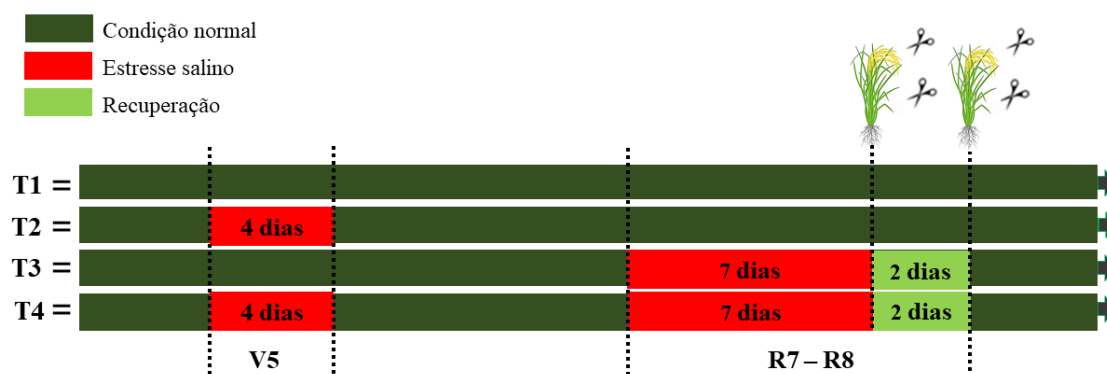


Fig. 2. Esquema demonstrando o desenho experimental que constituem as quatro condições de estresse a que as plantas de arroz, cv. BRS AG, foram submetidas: T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8). No estágio reprodutivo foram realizadas coletas após sete dias (primeira coleta), de aplicação do estresse. Após a primeira coleta, todas as condições foram irrigadas novamente e uma segunda coleta foi realizada após dois dias de recuperação. V5: estágio fenológico com cinco folhas maduras; R7-R8: estágio de enchimento de grãos. As tesouras representam o momento em que as coletas foram realizadas.

Análises no material vegetal: momentos de coleta e órgãos avaliados

Após sete dias de estresse no estágio reprodutivo (R7-R8) e, após dois dias de recuperação (Fig. 1), foram coletadas folhas para as análises de extravasamento de eletrólitos, clorofila, espécies reativas de oxigênio (EROs), teor de malondialdeído (MDA) e atividade de enzimas antioxidantes. Ao mesmo tempo, nesses períodos, foram coletadas amostras de grãos para determinação da atividade de enzimas do metabolismo de carboidratos e expressão gênica.

Para avaliar a expressão gênica de transportadores de carboidratos coletas de folhas, ráquis e bainha foram realizadas ao final de sete dias de estresse e após dois dias de recuperação no estágio reprodutivo (Fig. 1).

As análises de Na^+ e K^+ e anatômicas foram efetuadas após sete dias de estresse no reprodutivo, em folhas e raízes, enquanto os parâmetros de crescimento foram analisados no estágio R9, final do ciclo das plantas.

Determinação de Na⁺ e K⁺

Para a realização dessa análise utilizou-se folhas e raízes das quatro condições após sete dias de estresse salino no estágio reprodutivo. Após a coleta o material vegetal foi seco em estufa a 70 °C durante 72h. Posteriormente o material seco foi moído e incubado em ácido nítrico (HNO₃) e ácido perclórico (HClO₄) na proporção de 2:1 para extração dos íons. As concentrações de Na⁺ e K⁺ foram mensuradas por um espectrofotômetro de chama (mg g⁻¹ MS) e a partir dos resultados obtidos foi realizado o cálculo da razão de Na⁺/K⁺.

Análise anatômica

Amostras da região mediana da lâmina foliar totalmente expandida e segmentos de raízes seccionadas 5 cm a partir do ápice foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica ascendente e infiltradas em resina plástica (Leica Historesin®) segundo as instruções do fabricante. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo manual (ANCAP) com navalha descartável (Feather). As secções com 5 µm de espessura foram coradas com azul de toluidina 0,05% (Sakai, 1973) em tampão fosfato e citrato (McIlvaine, 1921) pH 4,5 e montadas em resina sintética “Entellan” (Merck®). A documentação foi realizada através da captura de imagens a partir de lâminas usando câmera AxioCam ERc 5s acoplada ao microscópio Axio Lab Zeiss.

Parâmetros fisiológicos

O índice de clorofila foi estimado utilizando um Sensor de monitoramento foliar portátil (Dualox scientific+ - ForceA). O extravasamento de eletrólitos das células foi determinado de acordo com Lutts *et al.* (1995).

Determinação de O₂^{•-}, H₂O₂ e peroxidação lipídica

O radical superóxido (O₂^{•-}) foi determinado de acordo com Li *et al.* (2010). Para isso, 200 mg de folhas foram maceradas em 1,8 mL de tampão fosfato 65 mM (pH 7,8) e centrifugados a 5.000 g por 10 minutos. Em seguida foram adicionados ao sobrenadante 1,5 mL de tampão fosfato 130 mM (pH 7,8) e 50 µL de cloridrato de hidroxilamina 10 mM, e subsequente incubação a 25 °C por

20 minutos. Por último, foi adicionado à reação, 100 µL de sulfanilamida 17 mM e 100 µL de α -naftilamina 7 mM. Após incubação de 20 minutos a 25 °C, foi medida a absorbância a 530 nm em espectrofotômetro. Para o cálculo de $O_2^{\cdot -}$ foi realizada uma curva padrão com radical nitrito

Para a determinação da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizada a metodologia proposta por Velikova (2000). Foram utilizados 200 mg de tecido foliar fresco, macerados em 2,0 mL de solução de 0,1% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, foram coletados 0,25 mL do sobrenadante, nos quais, foram adicionados 0,75 mL de tampão, composto por fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 1 mL de iodeto de potássio (KI) 1 M completando um volume final de 2,0 mL em cada tubo. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 390 nm e a concentração de H_2O_2 foi calculado comparando as leituras obtidas com a curva padrão de H_2O_2 , expressos em $\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

A peroxidação lipídica foi determinada conforme descrito por Heath e Packer (1968). Aproximadamente 200 mg de folhas frescas foram macerados em 2,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v) e centrifugadas a 12000 g durante 15 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,5% em TCA 10%). A mistura foi incubada a 90 °C durante 20 minutos. Posteriormente, a reação foi interrompida por resfriamento em gelo e as leituras determinadas em espectrofotômetro a 535 nm e 600 nm. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada e a peroxidação expressa em $\text{nmol MDA g}^{-1} \text{ MF}$.

Atividade das enzimas antioxidantes

Amostras de folhas frescas (200 mg) foram maceradas em N_2 líquido e homogeneizadas em 2,0 mL do tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), e ascorbato peroxidase (APX) (EC 1.11.1.1). As proteínas totais foram

determinadas com o mesmo tampão e sua quantificação determinada pelo método de Bradford (1976). Os valores referentes ao teor de proteínas totais foram expressos em mg proteína g⁻¹ MF.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) em um meio de reação contendo: fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM (Giannopolitis e Reis, 1977). A atividade da SOD foi expressa em U mg⁻¹ proteína. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm, onde uma unidade de SOD foi considerada a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições experimentais. A atividade da SOD foi expressa em U mg⁻¹ proteína.

A atividade da catalase (CAT) determinada de acordo com Azevedo *et al.* (1998), com algumas modificações. Sua atividade foi monitorada, em espectrofotômetro, pela degradação do H₂O₂ a 240 nm por 2 minutos, em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), 12,5 mM de H₂O₂ e 50 µL de extrato vegetal, incubado a 28°C. Como branco foi utilizado o mesmo meio de reação livre de extrato vegetal. A atividade da enzima CAT foi expressa em µmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade da ascorbato peroxidase (APX), foi determinada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação será incubado a 28°C sendo composto de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM. O decréscimo na absorbância foi monitorado por 2 minutos, a partir do início da reação e a atividade da APX expressa em mmol ASA min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Atividades das enzimas invertases e sacarose sintase

Aproximadamente 0,4g de grãos foram macerados com 1,5 mL de meio extrator constituído de tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,5), PMSF (1 mM), MgCl₂ (5 mM) e DTT (1 mM) e em seguida centrifugados a 18.000 g a 4 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante, extrato proteico, foi utilizado como fonte bruta das enzimas para avaliação da atividade das invertases solúveis (invertase ácida do vacúolo – VIN e invertase neutra do citosol – NIN). O *pellet* foi

ressuspendido para extrair a invertase insolúvel (invertase ácida da parede – CIN).

A extração da invertase ácida da parede celular foi realizada de acordo com Fahrendorf e Beck (1990), com algumas modificações. Foi utilizado o mesmo tampão de extração das invertases solúveis, no entanto, foram adicionados NaCl 1 M e Triton-X-100 (1%). Posteriormente, foram centrifugados a 18.000 g a 4 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante contendo extrato proteico foi utilizado para a realização do ensaio enzimático. O meio de reação (1,5 mL) para o ensaio da CIN foi constituído de tampão 0,1 M, $MgCl_2$ 5 mM, sacarose 200 mM e 490 μ L de alíquota do extrato proteico de grão. A temperatura de incubação foi de 37 °C e alíquotas de 200 μ L foram coletadas ao final de 10 e 40 minutos, para cálculo e determinação da atividade enzimática. A atividade enzimática foi avaliada pela quantificação de açúcares redutores produzidos, segundo o método DNS descrito por Miller (1959). As atividades foram expressas em μ mol de açúcares redutores (AR) produzidos por grama de massa fresca por minuto.

Para determinação da NIN uma alíquota de 500 μ L do extrato foi adicionada ao meio de reação contendo: 2,1 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,5), sacarose a 200mM e 1,6 de água destilada e em seguida foi incubado em banho-maria a 30°C e uma alíquota de 200 μ L do meio reacional foi coletado ao final de 10 e 40 minutos para a quantificação da atividade enzimática pelo método do DNS, descrito por Miller (1959). O mesmo procedimento foi utilizado para determinação da atividade da invertase vacuolar, mudando apenas o tampão que para a VIN foi utilizado o tampão acetato de sódio a 200 mM, pH 4,5.

A atividade da SuSy foi determinada de acordo com Lowell *et al.* (1989). O extrato enzimático foi preparado utilizando 0,5 g de grão homogeneizado em 2 mL de tampão de extração contendo HEPES 0,05M (pH 7,0), EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,001M, $MgCl_2$ 0,002M, ditioneitol (DTT) 0,002M, ácido ascórbico e água. O homogeneizado foi centrifugado a 13000 g por 20 min a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade enzimática. Em seguida, 100 μ L de extrato (sobrenadante) foi adicionado a 1900 μ L do meio de incubação contendo: tampão MES (Morpholino ethanesulgonic acid) 0,1 M, pH 6,0, $MgCl_2$ 0,005 M, sacarose, UDP 0,005 M e água. Uma alíquota de 200 μ L do

meio reacional foi coletado ao final de 10 e 40 minutos para a quantificação da atividade enzimática pelo método do DNS.

Quantificação relativa da expressão gênica

Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração do RNA total de cada amostra foi realizada a partir de 100 mg de tecido vegetal de folha, bainha, ráquis e grãos coletados após sete dias de estresse e dois dias de recuperação utilizando o kit TRIzol™ Reagent (Invitrogen™, Carlsbad, EUA). As amostras foram tratadas com DNase I, a quantidade de RNA total foi mensurada através de análises de absorbância (NanoDrop, ND-1000) a 260 e 280 nanômetros. A qualidade e integridade do RNA foram verificadas em eletroforese com gel de agarose 1,0 %. Os cDNAs fita simples foram sintetizados por transcrição reversa a partir de 2 µg de RNA total utilizando *primer* oligoDT e *Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®).

Reações de RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas em equipamento Termociclador Bio-Rad CFX Real Time, utilizando o sistema de fluoróforo SYBR Green (Roche®). O volume total das reações foi de 12 µL, sendo 6,25 µL do fluoróforo, 0,25 µL (10 mM) de cada *primer* (senso e antisenso), 1 µL de cDNA (diluição 1:5, previamente definida) e 4,25 µL de água ultra pura. As condições de amplificação foram: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto com inserção da curva de *melting* de 65 a 95 °C, com incremento de 5 °C a cada medida de fluorescência. Todas as reações foram realizadas em triplicata e o cálculo de quantificação relativa da expressão foi realizado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$, conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001). Para a normalização dos resultados foram usados os genes *UBC2E* e *GAPDH* para folha, *UBQ5* e *UBQ10* para bainha, *TIP41* e *UBQ10* para ráquis e *TIP41* e *Cyclophilin* para os

grãos, como genes de referência (Rossatto *et al.*, 2021). Todos os genes utilizados nesse estudo estão listados na Tabela Suplementar S1.

Parâmetros de crescimento

Ao final do experimento, no estágio R9 foi avaliado: altura da planta (cm), utilizando uma régua milimetrada, considerando o ponto inicial, região do colo, até a inserção da última folha, diâmetro do caule, aferido com um paquímetro na altura do colo e comprimento de raiz (cm). Após a secagem em estufa com circulação de ar forçada, a 70°C por um período de 72h, foi mensurada a massa seca das folhas e raízes.

Análise de componentes principais (PCA)

Uma análise multivariada de componentes principais (PCA) foi realizada para detectar possíveis agrupamentos entre variáveis analisadas no grão e eliminar possíveis redundâncias. As variáveis incluídas nesta análise foram: expressão gênica de transportadores (SUT4, 5, TPT1 e BT1), em diferentes órgãos (folha, ráquis, bainha e grão), expressão de genes e atividade das enzimas envolvidas na clivagem de sacarose. A análise de componentes principais foi realizada com base nos dados médios de todas as variáveis analisadas (convertidas para escala logarítmica). Com base nos componentes principais, foi construído um gráfico biplot com o primeiro e segundo componente principal.

Desenho experimental e análise estatística

Para o experimento foi utilizada uma cultivar de arroz (BRS AG) e quatro condições experimentais (T1, T2, T3 e T4), cada uma contendo três repetições. Para os parâmetros clorofila, extravasamento de eletrólitos, MDA, EROs, enzimas antioxidantes, enzimas do metabolismo de carboidratos e expressão gênica, o delineamento foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x2, sendo quatro condições de estresse e dois tempos de coleta. Para os parâmetros concentração de Na⁺ e K⁺ e análises anatômicas, o delineamento foi inteiramente

casualizado em esquema fatorial 4x2, sendo quatro condições de estresse e dois órgãos (folhas e raízes). As unidades experimentais foram constituídas de três vasos com quatro plantas em cada. Para as análises anatômicas foram confeccionadas três lâminas para cada condição, cada lâmina representando uma repetição. Cada lâmina contendo nove secções/cortes e a partir de cada secção foi capturada uma imagem, totalizando 27 imagens de cada condição ($n = 27$). Os dados foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$), e os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade utilizando o software estatístico SAS 9.3 (SAS Institute Inc.).

Resultados

Concentração de Na^+ e K^+

As análises das concentrações dos íons sódio e potássio, mostraram que o Na^+ estava em maior concentração nas raízes de plantas que passaram por estresse recorrente (T4) em relação às plantas controle, não diferindo das plantas que passaram por estresse apenas no reprodutivo (T3). Em relação à folha, não houve diferença entre as condições. Comparando os dois órgãos, para todas as condições não houve diferença entre raiz e folha (Fig. 3a). Por outro lado, a concentração de K^+ nas raízes foi significativamente maior em plantas sob estresse recorrente em comparação com as condições T2 e T3. Nas folhas, a maior concentração de K^+ foi observada na condição T2 diferindo de T1. Entre os dois órgãos, folhas apresentaram maior acúmulo de K^+ em todas as condições (Fig. 3b).

Comparando as diferentes condições após sete dias de estresse salino, podemos observar que na raiz o maior valor de razão entre Na^+/K^+ ocorreu em plantas que passaram por estresse apenas no reprodutivo (T3), seguido por plantas que passaram por estresse recorrente (T4), enquanto para folhas não houve diferença. Ao comparar os dois órgãos foi observado que as raízes apresentaram valores superiores de Na^+/K^+ nas condições T3 e T4 (Fig. 3c).

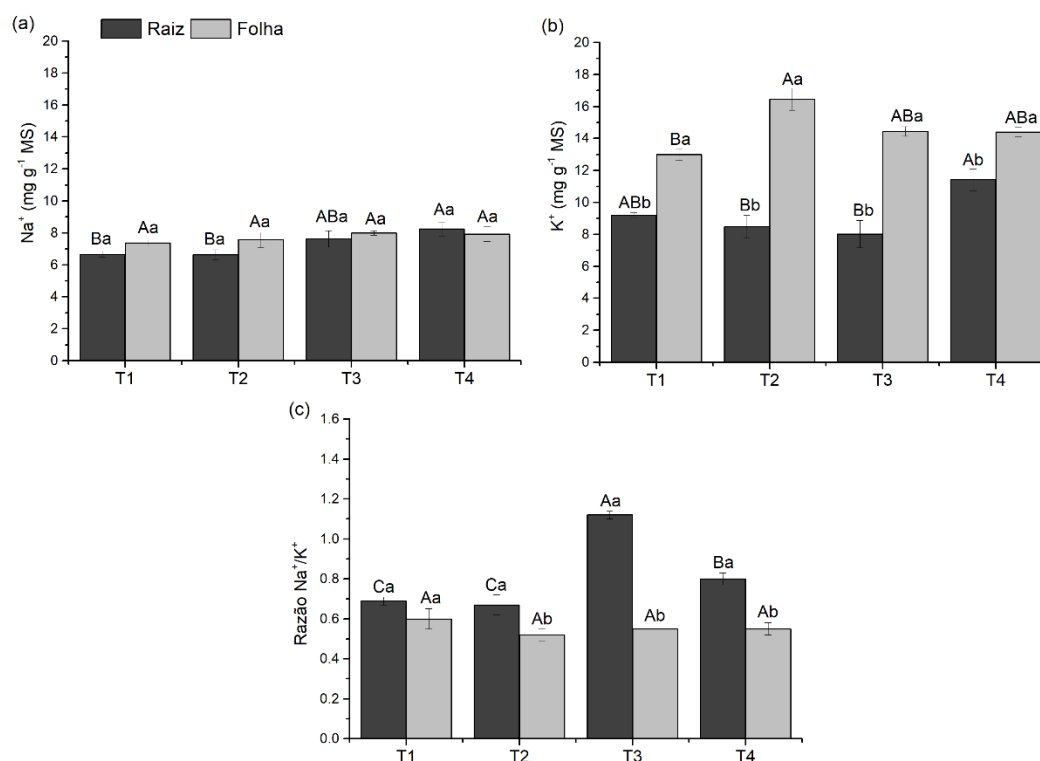


Fig. 3. Concentração de Na⁺ (a), K⁺ (b) e razão de Na⁺/K⁺ (c) em raízes e folhas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino no estágio reprodutivo. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição (n = 3). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições de estresse (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os órgãos (raízes e folhas), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Análise anatômica

As análises da anatomia foliar evidenciaram que a área do floema aumentou nas plantas sob estresse recorrente seguida das plantas que passaram por estresse somente no vegetativo (Fig. 4a-e). De maneira semelhante, as condições T2 e T4 apresentaram os maiores valores para a área do metaxilema da folha seguido das condições T1 e T3 (Fig. 4f-j), respectivamente. Em contraste, o estresse salino ocasionou uma redução na área do metaxilema das raízes de plantas que passaram por um único evento de

estresse, tanto no vegetativo (T2), quanto no estágio reprodutivo (T3) (Fig. 4k-o).

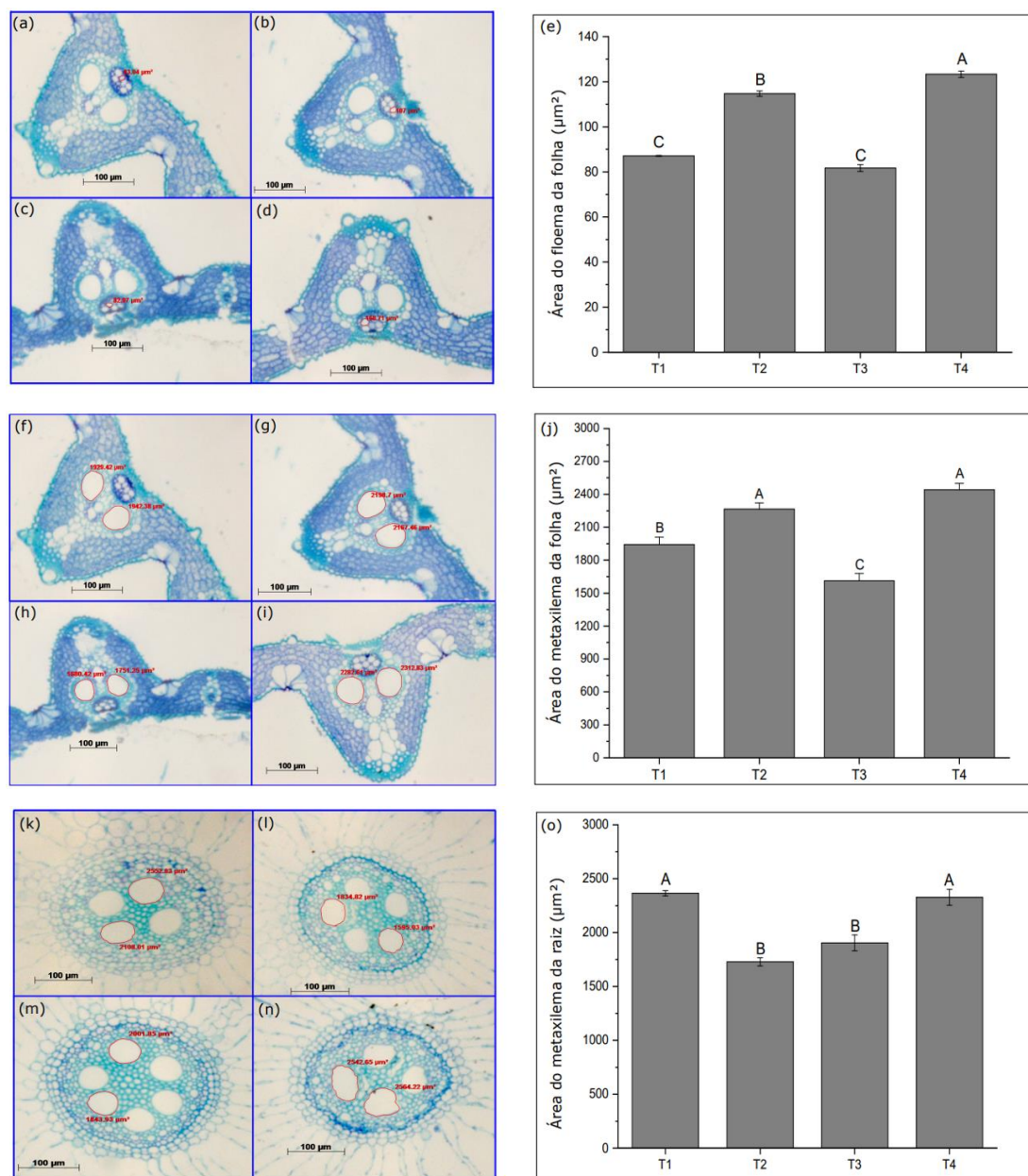


Fig. 4. Seções transversais de folhas (a-d e f-i) e raízes (k-n), área do floema da folha (e), área do metaxilema da folha (j) e área do metaxilema da raiz (o) de plantas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias da aplicação de 150 mM de NaCl no estágio de reprodutivo. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição (n = 6). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Parâmetros fisiológicos

Após sete dias de estresse salino houve uma diminuição no índice de clorofila apenas nas plantas que passaram por estresse somente no reprodutivo (T3), mantendo valores inferiores ao controle mesmo após a recuperação (Fig. 5a). Ao comparar as diferentes condições em tempos específicos, podemos observar que as plantas que passaram por estresse somente no reprodutivo (T3) e recorrente (T4) apresentaram um aumento no extravasamento de eletrólitos aos sete dias de estresse. No entanto, o extravasamento de eletrólitos foi significativamente maior em T3 em comparação a condição T4, os quais retornaram a níveis similares aos das plantas controle após a recuperação (Fig. 5b).

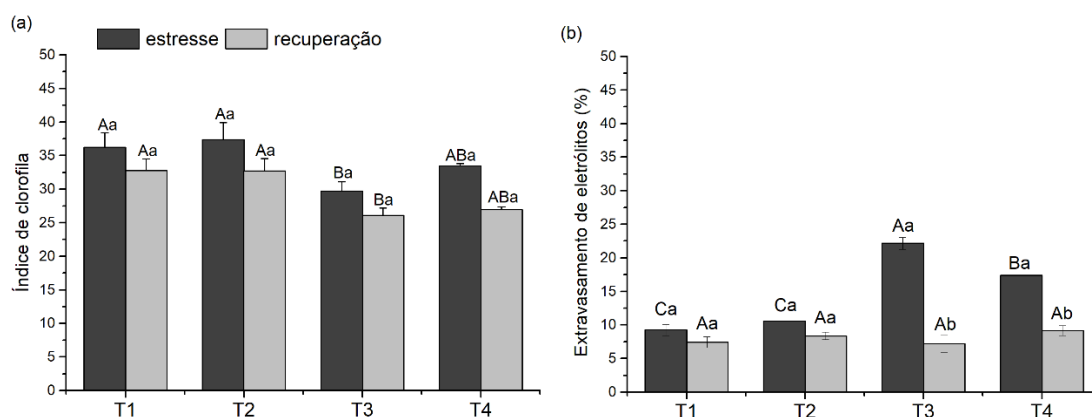


Fig. 5. Índice de clorofila (a), e extravasamento de eletrólitos (b) em folhas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação no estágio reprodutivo. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição ($n = 3$). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Concentração de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e peroxidação lipídica

A concentração de $O_2^{\cdot-}$ (Fig. 6a) não foi significativamente diferente entre as condições testadas. Os resultados mostraram que após sete dias de estresse, a concentração de H_2O_2 não diferiu entre as condições, enquanto após os dois dias de recuperação houve um aumento significativo nas plantas que experimentaram estresse pela primeira vez no estágio reprodutivo (T3) quando comparadas as condições T1 e T4. Ao mesmo tempo, a concentração de MDA (Fig. 6c) não foi significativamente diferente entre as condições avaliadas sob condições de salinidade e logo após o período de recuperação.

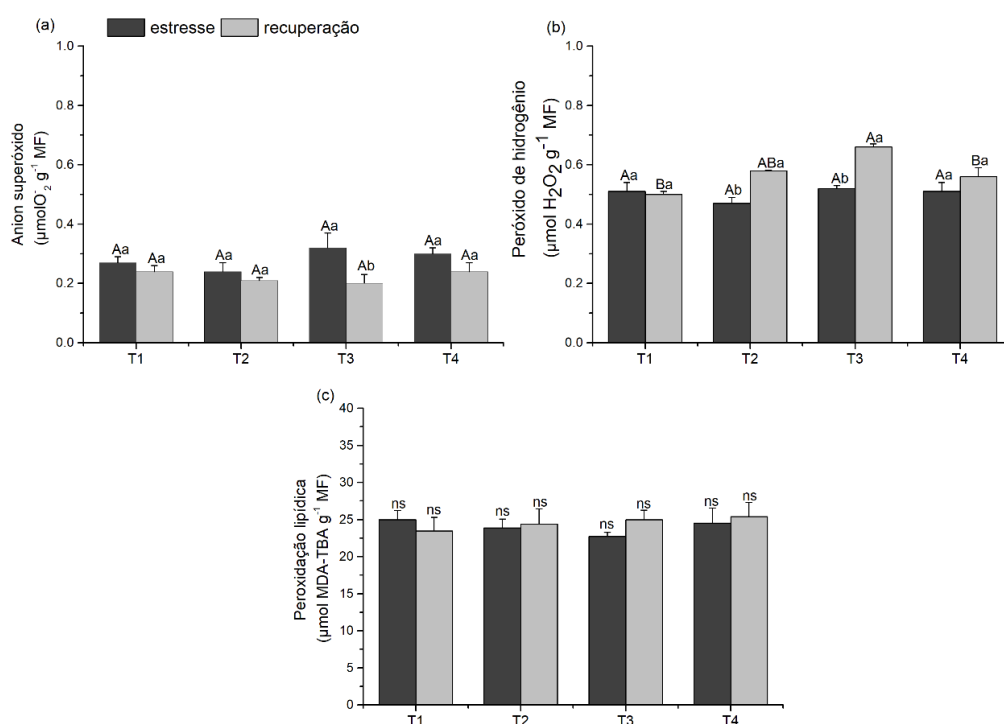


Fig. 6. Ânion superóxido (a), peróxido de hidrogênio (b), peroxidação lipídica (c) em folhas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação no estágio reprodutivo. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição ($n = 3$). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições de estresse (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no estágio vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Atividade de enzimas antioxidantes: SOD, CAT e APX

A atividade da SOD foi significativamente maior na condição T3 em relação a T2 e T4 após sete dias de estresse. Após a recuperação a atividade da SOD não variou entre as condições (Fig. 7a).

A atividade da APX aumentou na condição T2 ao final de sete dias diferindo das plantas controle e plantas sob estresse recorrente. Por outro lado, após a recuperação um aumento significativo na atividade da APX foi observado na condição T4 (Fig. 7b). Após sete dias sob salinidade e após o período de recuperação a atividade da CAT foi significativamente maior em todas as condições em relação ao controle (Fig. 7c).

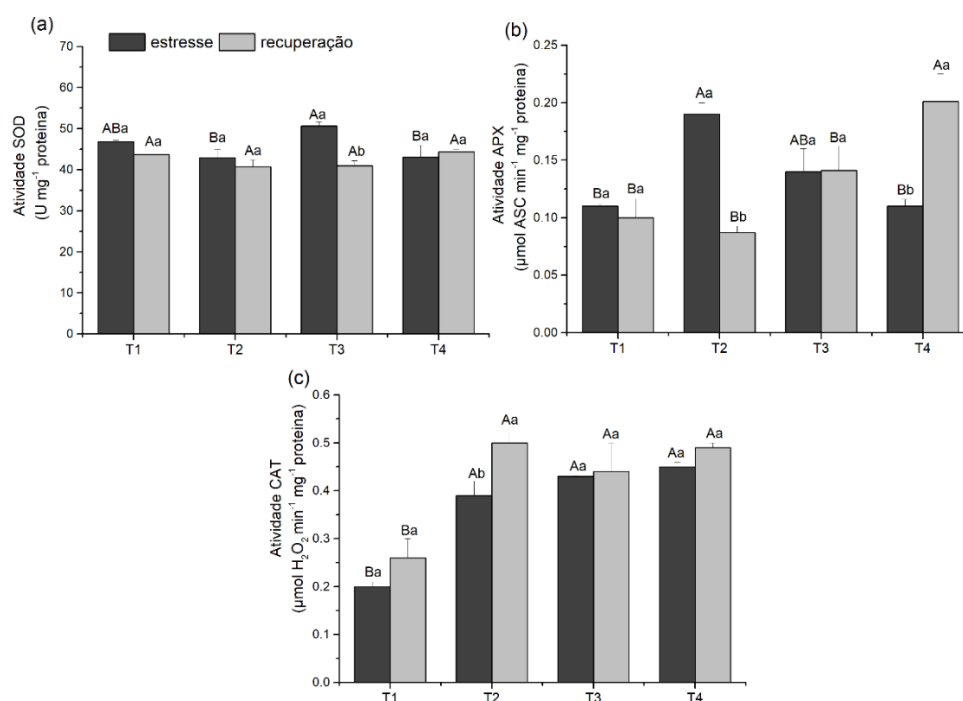


Fig. 7. Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) (a), ascorbato peroxidase (APX) (b) e a catalase (CAT) (c) em folhas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois de recuperação no estágio reprodutivo. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição ($n = 3$). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no estágio vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Padrão de expressão de genes relacionados ao transporte de triose fosfato, sacarose e ADP-glicose

Na folha, em todos as condições com algum tipo de estresse salino, a expressão do gene *TPT1* foi estatisticamente inferior ao das plantas controle. No entanto, nas plantas submetidas ao estresse recorrente (T4), esse gene foi mais fortemente expresso do que em plantas sem o estímulo *priming* (T3) ao final de sete dias de estresse (Fig. 8a).

Na bainha das folhas, após os sete dias sob condições de salinidade, a expressão de *TPT1* foi estatisticamente superior nas plantas que passaram por estresse somente no estágio reprodutivo (T3), seguido das plantas em estresse recorrente (T4). Após o período de recuperação, a expressão de *TPT1* não diferiu entre as condições (Fig. 8b).

Comparando as condições de estresse na ráquis, aos sete dias a expressão do gene *TPT1* foi aumentada na condição T2, enquanto após a recuperação em T2 e T3 a expressão foi estatisticamente inferior ao das plantas controle (Fig. 8c).

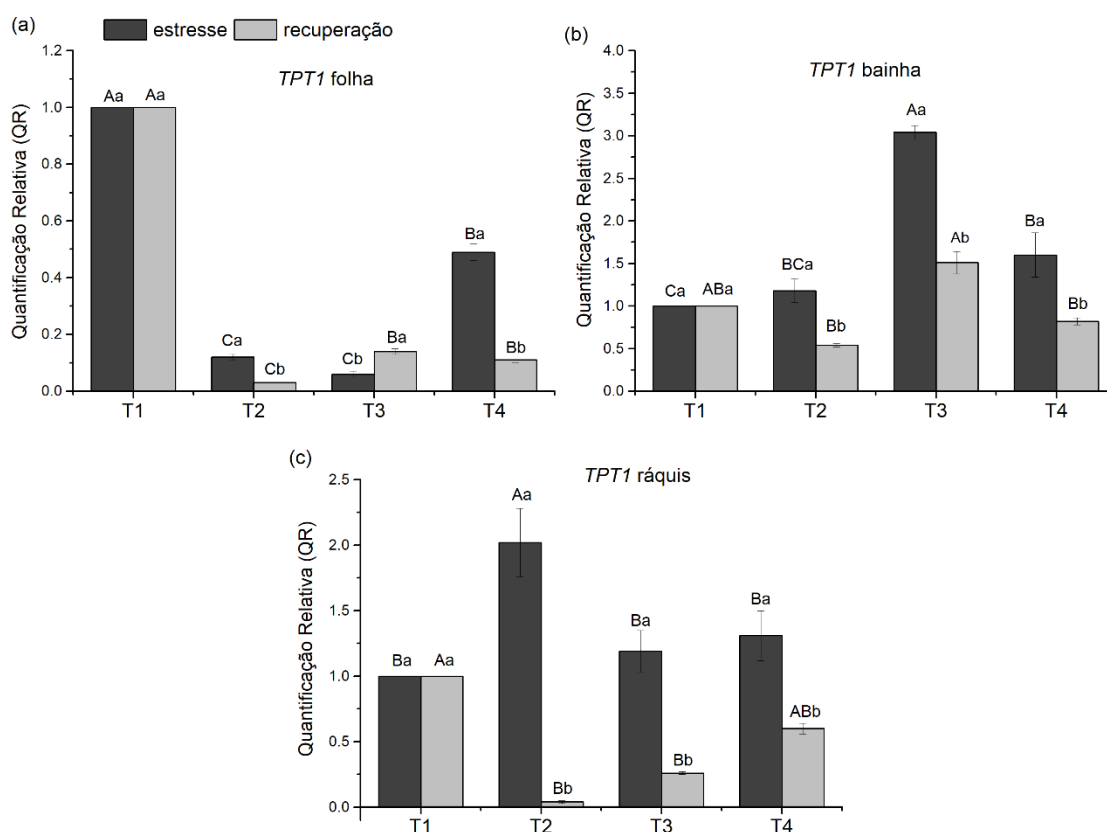


Fig. 8. Expressão do gene *TPT1* que codifica para o translocado de fosfato/triose fosfato em folhas (a), bainha (b), e ráquis (c) da cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição ($n = 3$). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Na folha, a expressão do gene *SUT4*, que codifica um transportador de sacarose (SUT), em todos os tratamentos que receberam algum tipo de estímulo salino, foi significativamente inferior ao das plantas controle (Fig. 9a). No entanto, a expressão foi maior em plantas sob estresse recorrente em comparação com as plantas não pré-estimuladas. O contrário foi observado após a recuperação, onde os maiores valores de expressão entre as plantas que receberam os estímulos de salinidade foram observados na condição T3.

Na baina, após sete dias sob estresse salino, os menores valores de expressão de *SUT4* ocorreram nas plantas submetidas à salinidade apenas no estágio reprodutivo (T3). Após a recuperação, houve aumento de expressão nas plantas em T3, não diferindo das plantas que passaram por estresse recorrente (T4) (Fig. 9b).

Na raízes a expressão de *SUT4* foi significativamente superior em T2 quando comparada às demais condições ao final de sete dias sob estresse salino. Na recuperação a expressão foi estatisticamente inferior em todas as condições em relação ao das plantas controle. Ao comparar os momentos de coletas, em T2, T3 e T4 a expressão foi menor após a recuperação (Fig. 9c).

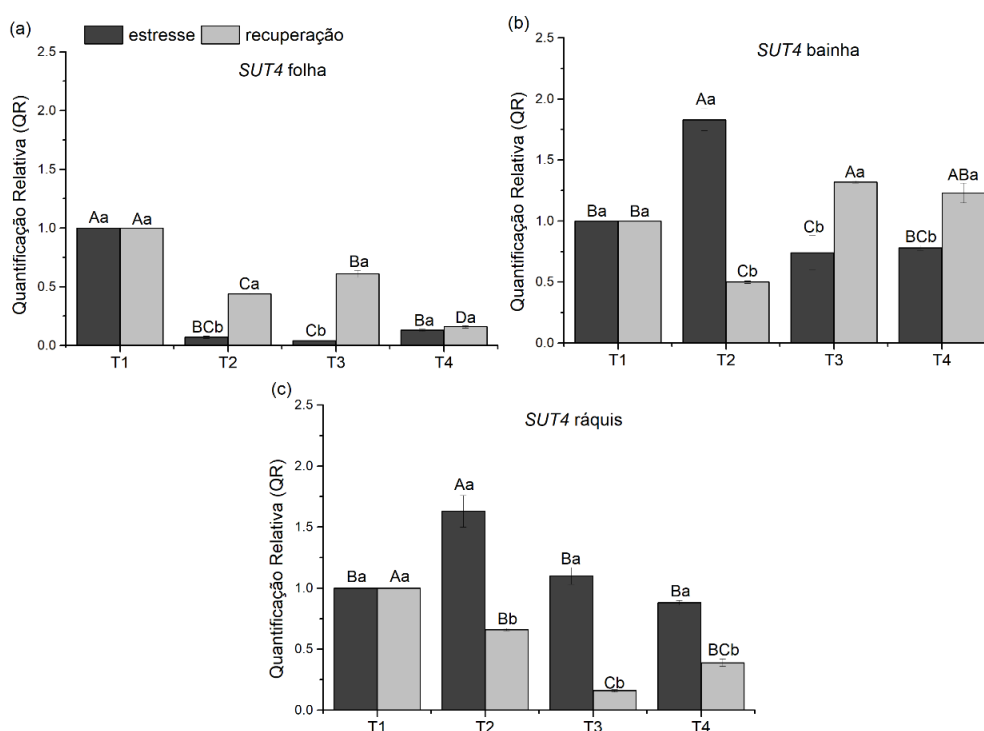


Fig. 9. Expressão do gene *SUT4* que codifica para o transportador de sacarose (SUT) em folhas (a), baina (b), e raízes (c) da cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição ($n = 3$). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Em relação à isoforma *SUT5*, em folhas das plantas submetidas aos setes dias de estresse salino e após a recuperação, a expressão foi inferior ($p < 0,05$) ao das plantas controle (Fig. 10a). Na bainha, os resultados mostraram que a expressão de *SUT5* foi aumentada tanto nas plantas sujeitas ao estresse salino quanto após a recuperação, em especial nas plantas que passaram por estresse apenas no estágio vegetativo (T2) e recorrente (T4) em comparação ao controle. Ao comparar T3 e T4 é possível observar maiores valores de expressão em T4 após a recuperação (Fig. 10b). Na ráquis, após sete dias sob estresse salino, a expressão de *SUT5* em T4 era inferior ao das plantas controle. Por outro lado, após a recuperação os menores valores de expressão foram observados em T2 e T3 (Fig. 10c).

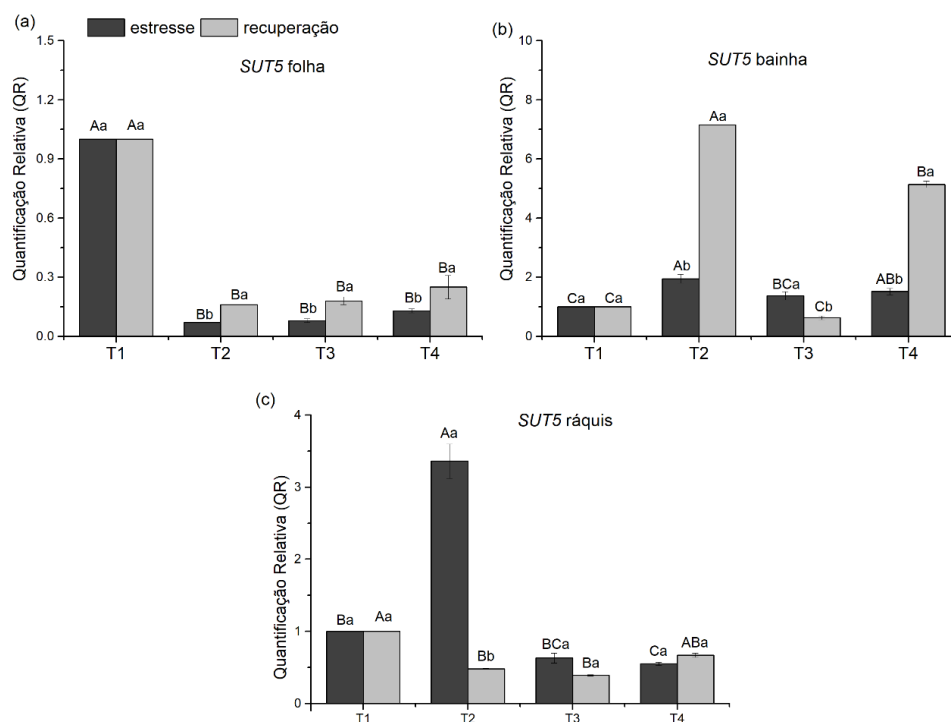


Fig. 10. Expressão do gene *SUT5* que codifica para o transportador de sacarose (SUT) em folhas (a), bainha (b), e ráquis (c) da cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição ($n = 3$). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Nos grãos, a expressão do transportador de ADP-glicose (*BT1-1*) foi estatisticamente inferior nas condições T2 e T3 em relação às plantas controle e as plantas sob estresse recorrente ao final de sete dias de estresse salino. Na Recuperação, *BT1-1* apresentou uma maior expressão nas plantas que passaram por estresse recorrente (T4) (Fig. 11a). Por outro lado, houve um aumento acentuado na expressão de *BT1-2* nas plantas que passaram por estresse recorrente (T4) ao final de sete dias de estresse salino. A expressão de *BT1-2* apresentou maior valor na recuperação para todas as condições que passaram por estresse em relação ao controle, não havendo diferença somente para condição T3 (Fig. 11b).

Em relação ao *BT1-3* os maiores valores de expressão após sete dias de estresse salino foram observados nas plantas submetidas a estresse recorrente (T4), diferindo das demais condições. Após a recuperação houve uma redução na expressão de *BT1-3* em todas as condições quando comparadas às plantas controle (Fig. 11c).

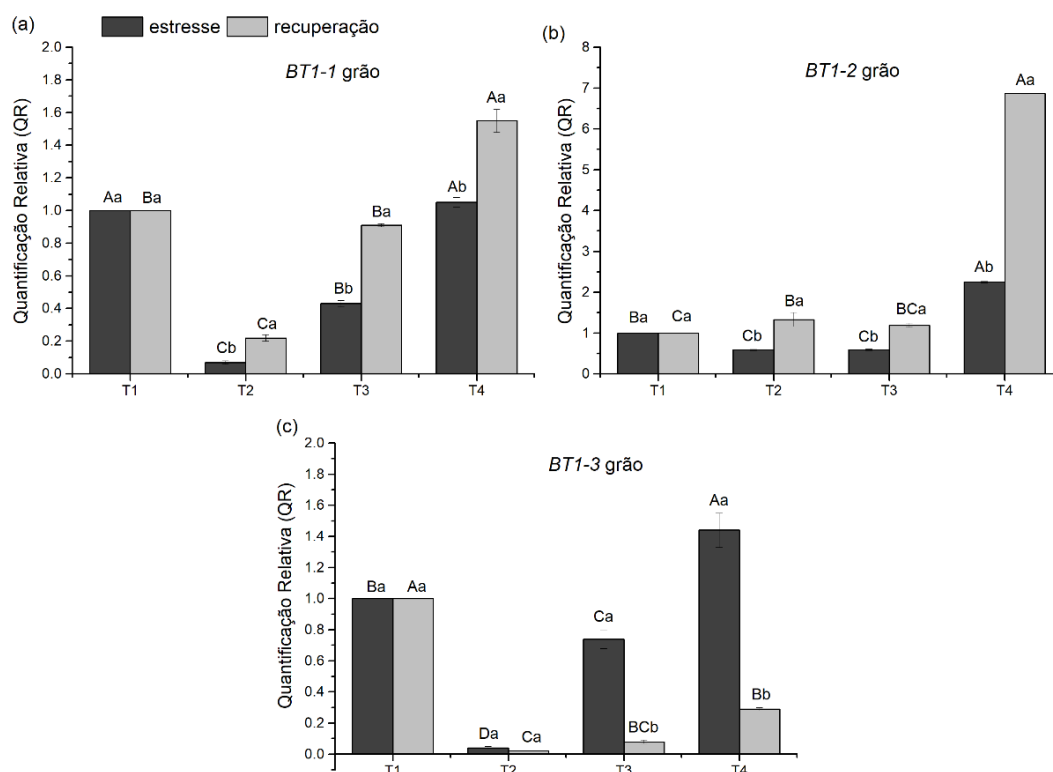


Fig. 11. Expressão dos genes *BT1-1* (a), *BT1-2* (b), e *BT1-3* (c) que codifica para o transportador de ADP-glicose em grãos de plantas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois dias de recuperação. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição ($n = 3$). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Atividade das enzimas invertase ácida da parede, invertase neutra do citosol, invertase vacuolar e sacarose sintase no grão

A atividade da invertase ácida de parede (CIN) foi diminuída após sete dias de estresse salino somente nas plantas que passaram por um único evento de estresse no estágio reprodutivo (T3). Após a recuperação a atividade da CIN não variou entre as condições testadas, mas foi observado um aumento da

atividade após a recuperação em T2, T3 e T4 (Fig. 12a). O estresse salino durante sete dias não alterou a atividade da invertase neutra (NIN). Na recuperação, para as condições T3 e T4 foi observado uma redução da atividade dessa isoforma (Fig. 12b).

Com relação à invertase vacuolar (VIN), os resultados mostraram que ao final de sete dias de estresse a atividade da VIN foi significativamente superior nas plantas que passaram por estresse no vegetativo (T2) quando comparadas as plantas que passaram por estresse recorrente (T4). Após o período de recuperação, a atividade nas condições T2, T3 e T4 diminuiu em comparação às plantas controle (Fig. 12c).

Após sete dias sob estresse, as plantas apresentaram atividade reduzida da SuSy, independentemente do tipo tratamento salino. No entanto, observou-se maior atividade da SuSy em plantas sob estresse recorrente, em comparação às plantas que não passaram por *priming*. Após a recuperação, a atividade em T4 não diferiu das plantas controle. De forma geral, foi possível observar atividade mais alta da SuSy após a recuperação em todas as condições testadas, exceto nas plantas controle (Fig. 12d).

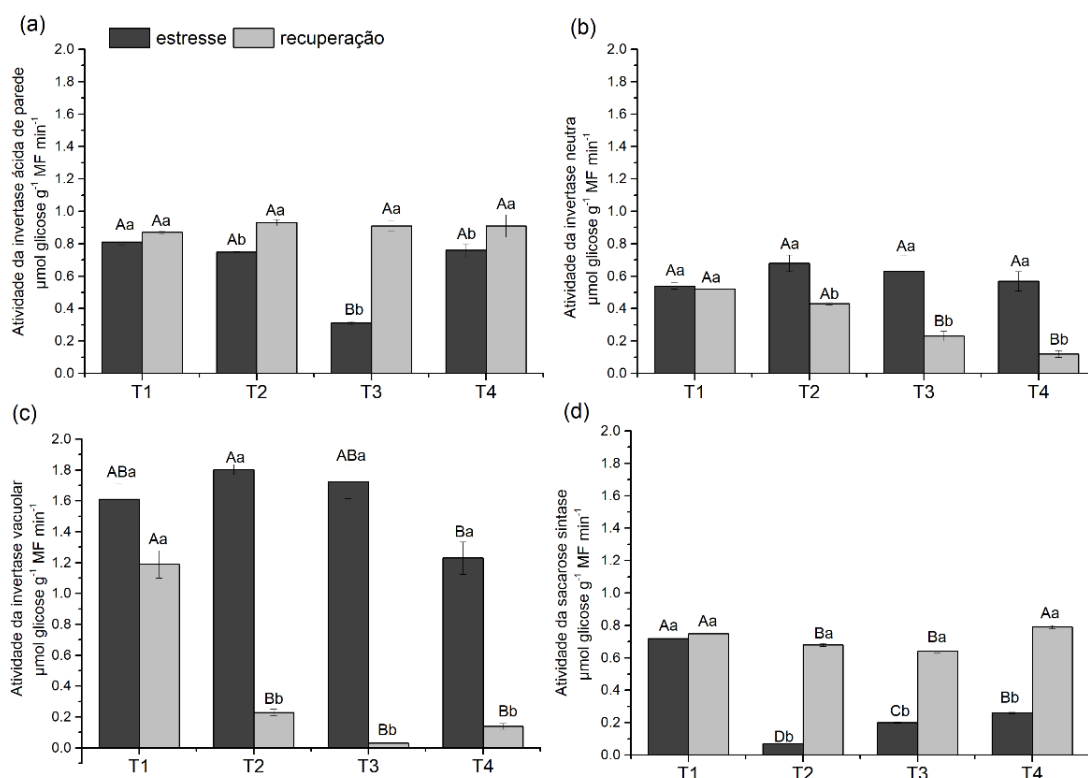


Fig. 12. Atividade das enzimas invertase ácida de parede (CIN) (a), neutra (NIN) (b), vacuolar (VIN) (c), sacarose sintase (SuSy) (d) em grãos de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois de recuperação no estágio reprodutivo. Os valores são representados pela média $\pm$ EP para cada condição ($n = 3$). Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições de estresse (T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo e reprodutivo) e letras minúsculas iguais não diferem entre os momentos de coleta (estresse e recuperação), segundo o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Padrão de expressão de genes envolvidos na clivagem de sacarose em grãos

Entre as isoformas que codificam para a enzima CIN, ao final de sete dias de estresse salino, apenas *CIN1* apresentou valores de expressão maiores em plantas que passaram por estresse apenas no reprodutivo (T3) em comparação com as plantas sob estresse recorrente (T4). Em relação às isoformas *CIN2* e *CIN8* houve aumento de expressão em T4, enquanto *CIN4* e *CIN5* apresentaram um decréscimo na expressão em todas as condições em comparação às plantas

controle. Após o período de recuperação, *CIN4* e *CIN8* tiveram aumento na expressão em T4 em comparação as demais condições, e *CIN2* foi estatisticamente igual entre às condições T3 e T4. *CIN1* e *CIN5* apresentaram comportamento similar, com decréscimo na expressão em todas as condições em comparação às plantas controle (Fig. 13; Tabela suplementar 2).

Em relação ao gene *VIN2*, que codifica para invertase vacuolar, durante o estresse salino observou-se um aumento na expressão em T4, enquanto na recuperação observou-se uma redução na expressão em T2 e T3 (Fig. 13).

Sob estresse, as isoformas *NIN1* e *NIN4*, que codificam para invertase neutra, tiveram aumento de expressão em plantas que passaram por dois eventos de estresse (T4), e a expressão de *NIN5* foi estatisticamente superior em T3 comparado às demais condições. Nas demais isoformas, a expressão foi inferior em todas as condições em relação às plantas controle. Após a recuperação, com exceção da isoforma *NIN1*, a expressão das isoformas foi significativamente maior em plantas sob estresse recorrente em comparação com as demais condições (Fig. 13).

As isoformas *SUSY2* e 3 da sacarose sintase analisadas mostraram um aumento significativo na expressão após sete dias de estresse nas plantas pré-estimuladas (T4). Após a recuperação, as isoformas *SUSY1* e *SUSY3* tiveram os maiores valores de expressão em T4, enquanto para *SUSY2*, 4 e 6 os menores valores de expressão foram em T2 (Fig. 13).

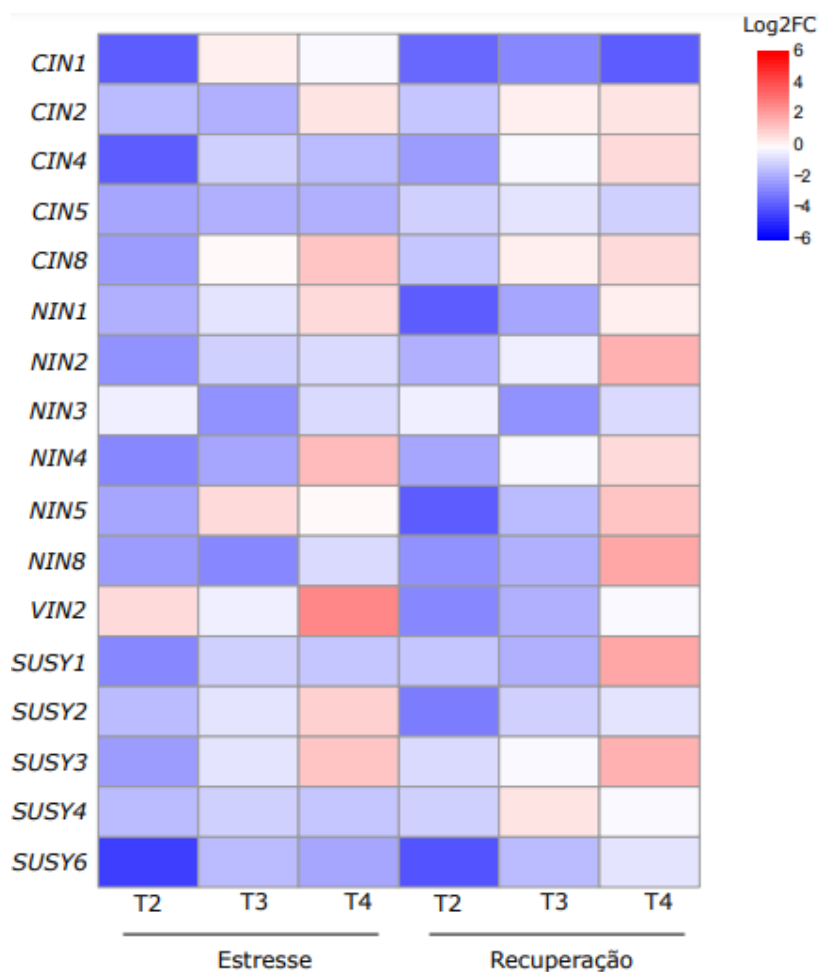


Fig. 13. *Heatmap* com genes que codificam para enzimas que clivam sacarose: invertase ácida de parede (*CIN*), neutra (*NIN*), ácida do vacúolo (*VIN*) e sacarose sintase (*SUSY*) em grãos de plantas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino e dois de recuperação no estágio reprodutivo. A escala de cor é referente à quantificação relativa (QR). T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8).

Parâmetros de crescimento

O estresse salino aplicado somente no estágio de enchimento de grãos (T3) reduziu significativamente a altura das plantas, bem como a produção de massa seca da parte aérea, enquanto os demais parâmetros analisados não foram alterados pelo estresse salino, não havendo diferença significativa entre as condições (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros de crescimento (altura, comprimento de raiz, diâmetro do caule, massa seca de raiz e parte aérea) em plantas de arroz, cv. BRS AG avaliados no estágio R9 (maturação dos grãos) nas diferentes condições experimentais.

Parâmetros de crescimento	T1	T2	T3	T4
Altura (cm)	112,50 ± 3,30 ^A	110,00 ± 3,23 ^A	103,33 ± 2,05 ^B	109,11 ± 0,67 ^A
Comprimento de raiz (cm)	35,44 ± 1,35 ^A	38,75 ± 1,01 ^A	37,11 ± 0,79 ^A	36,78 ± 0,68 ^A
Diâmetro do caule	0,203 ± 0,02 ^A	0,192 ± 0,01 ^A	0,181 ± 0,02 ^A	0,187 ± 0,01 ^A
Massa seca da parte aérea (g)	18,66 ± 0,03 ^A	19,39 ± 0,53 ^A	14,81 ± 0,02 ^B	17,11 ± 1,43 ^{AB}
Massa seca da raiz (g)	6,80 ± 0,50 ^A	6,62 ± 0,77 ^A	6,91 ± 0,06 ^A	8,73 ± 0,44 ^A

Os valores são representados pela média ± EP para cada tratamento (n = 3), Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas não são estatisticamente diferentes entre as condições no momento da coleta (R9), segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8).

Análise de componentes principais (PCA)

A PCA foi realizada com os parâmetros de expressão gênica de transportadores (SUT4, 5, TPT1 e BT1) em diferentes tecidos (folha, ráquis, bainha e grão), expressão de genes e atividade das enzimas envolvidas na clivagem de sacarose no grão a fim de verificarmos a influência das condições no metabolismo de carboidratos.

Após sete dias de estresse foi observado uma variância de 63,5% na dimensão 1 e 19,9% para dimensão 2 (Fig. 14). As variáveis que mais contribuíram para a separação das condições em dimensão 1 foram expressão dos genes *SUT4* (bainha), *SUT4* (ráquis), *BT1-1*, *NIN2*, *SUSY4* (grão) e atividade de NIN e SuSy no grão. Na dimensão 2 as variáveis que mais contribuíram foram a expressão dos genes *SUT4* (folha), *TPT1* (folha e bainha), *NIN3* e 5 no grão e atividade da enzima CIN no grão. Em relação à separação das condições, observou-se uma clara separação, as plantas controle (T1) e as plantas pré-estimuladas (T4) estão distantes das plantas T2 e T3. Ainda é interessante notar

que as plantas da condição T4 e controle estão localizadas no mesmo quadrante após sete dias de estresse salino.

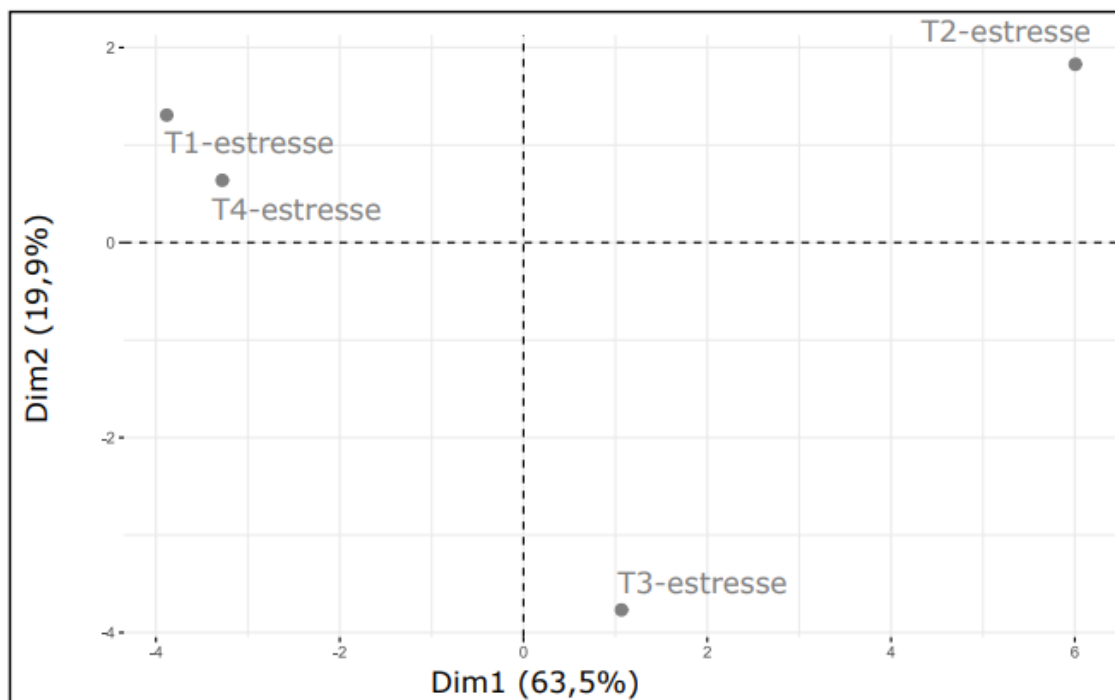


Fig. 14. Dimensão 1 (Dim1) versus dimensão 2 (Dim2) com base nos parâmetros analisados (genes de transportadores, genes de enzimas e atividade das enzimas CIN, NIN, VIN e SuSy) em plantas de arroz, cv. BRS AG, após sete dias de estresse salino no reprodutivo. T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8); T4: estresse salino aplicado no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8).

Discussão

Concentrações mais altas de sais na solução do solo podem ocasionar estresse osmótico e toxicidade iônica nas plantas, o que afeta significativamente o crescimento, desenvolvimento e a produtividade (Riaz *et al.*, 2019). O estresse iônico é atribuído aos efeitos tóxicos do próprio Na^+ devido ao acúmulo excessivo em compartimentos celulares e extracelulares, e desequilíbrios na homeostase de outros íons, incluindo K^+ e Ca^+ , afetando o desempenho geral da planta (Zhao *et al.*, 2020).

No presente estudo, foi possível observar que plantas que passaram por estresse salino recorrente acumularam maior quantidade de Na^+ nas raízes em comparação com as plantas controle e não diferiram das plantas não pré-

estimuladas (T3) (Fig. 3a). Entretanto, as plantas pré-estimuladas (T4) apresentaram maior quantidade de K^+ nas raízes em comparação à condição T3 (Fig. 3b), demonstrando que plantas que passaram por um estresse recorrente conseguem manter uma relação Na^+/K^+ menor do que plantas que passaram por estresse apenas no estágio reprodutivo (Fig. 3c). Em relação às folhas, a razão Na^+/K^+ se manteve baixa, não sendo observada diferença entre as condições de estresse (Fig. 3c). Isso implica que a homeostase de íons no arroz é melhorada devido à pré-exposição ao estresse quando as plantas são expostas novamente ao estresse salino no estágio reprodutivo. Foi sugerido anteriormente, em diversas espécies, que a capacidade de um tecido radicular de reter K^+ é crucial para a tolerância das plantas ao sal, ao invés de sua capacidade de restringir a absorção de Na^+ (Wu *et al.*, 2018). Devido à manutenção da concentração de K^+ , plantas pré-estimuladas foram capazes de manter maior relação K^+/Na^+ permitindo melhor desempenho dessas plantas em condições salinas, evidenciando um mecanismo de memória fisiológica.

A maioria dos processos fisiológicos das plantas associados à salinidade estão ligados à adaptação da estrutura anatômica, uma estratégia importante na sobrevivência das plantas em um ambiente potencialmente estressante (Hameed *et al.*, 2009). Nesse estudo, foi observado um aumento na área das células condutoras do floema em folhas de plantas que experimentaram estresse recorrente (T4), seguido das plantas que passaram pelo estresse somente no estágio vegetativo (T2), indicando efeito do *priming* estimulando o desenvolvimento de maior calibre de vaso observado em T4 (Fig. 4b, d, e). As características vasculares não apenas determinam a taxa de exportação de sacarose dos tecidos da folha para o floema, mas também controlam a mobilização de sacarose para as panículas na fase reprodutiva (Mathan *et al.*, 2020). Assim, supomos que as células condutoras do floema maiores induzidas pelo *priming* (T2) podem ter facilitado o armazenamento de amido na bainha e que um segundo evento de estresse no estágio de enchimento de grãos acarretou em um incremento da área vascular (T4) que, associado à indução de genes transportadores de sacarose (Fig. 9 - 10), podem ter contribuído para uma maior mobilização de açúcares, previamente armazenados ou assimilados das folhas, para as panículas com o início do enchimento de grãos.

Por outro lado, aumentos detectados no metaxilema (Fig. 4i - j) da parte aérea de plantas pré-estimuladas (T4) podem ter contribuído para maior captação de água e, conseqüentemente, aumentado o transporte de íons para o tecido foliar sob estresse salino. Em contrapartida, foi observado que as plantas que passaram por estresse apenas no estágio reprodutivo (T3) exibiram área do metaxilema da folha (Fig. 4h - j) e raiz (Fig. 4m -o) diminuída em comparação com a condição T4. Isso sugere que a menor área do metaxilema da raiz e folha observada na condição T3 pode ser devido à diminuição na pressão de turgor ocasionada pelo estresse osmótico afetando as propriedades da parede celular, assim como pelo próprio Na^+ , atrelado a alta razão Na^+/K^+ nessas plantas (Fig. 3c). O sódio é capaz de interagir fisicamente com os componentes da parede celular e alterar suas propriedades químicas, além de ocasionar a alcalinização do apoplasto dificultando a ação das expansinas (Byrta *et al.*, 2018).

Adicionalmente, nossos resultados demonstraram que o estresse salino induziu uma redução notável no índice de clorofila em plantas submetidas ao estresse somente no estágio reprodutivo (Fig. 5a). Esse achado indica que, em comparação com as plantas sem *priming*, as plantas pré-estimuladas demonstraram um ajuste iônico mais eficiente (Fig. 3c) e vasos condutores do xilema com maior diâmetro (Fig. 4b e c), modificações estas que, supostamente, contribuíram com o melhor ajuste osmótico, absorção e transporte de nutrientes, dentre eles o magnésio (Mg), cuja absorção reduzida ou inibida pelo excesso de sal resulta em menor formação de clorofila (Saleh *et al.*, 2019). Estudos anteriores mostraram que a capacidade das plantas pré-estimuladas em manter o índice de clorofila mais alto sob estresses osmótico e térmico, durante o estágio reprodutivo, resultou em capacidade fotossintética melhorada e tolerância ao estresse, beneficiando o processo de enchimento de grãos (Abid *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2018; Lukić *et al.*, 2020).

Apesar de uma razão Na^+/K^+ baixa nas folhas, foi possível observar uma redução no índice de clorofila e uma maior quantidade de extravasamento de eletrólitos em plantas não pré-estimuladas do que nas plantas sob estresse recorrente, possivelmente devido aos efeitos osmóticos do estresse salino. O aumento do potencial osmótico e a redução da disponibilidade de água para as plantas acarretam a desidratação da membrana celular (Riaz *et al.*, 2019). O menor extravasamento de eletrólitos em plantas pré-estimuladas (T4)

submetidas a uma segunda exposição à salinidade (Fig. 5b) demonstra a capacidade aumentada de manutenção do potencial da água das células nessas plantas. De forma similar, Hu *et al.* (2016) mostraram que em plantas de azevém pré-estimuladas, os valores de extravasamento de eletrólitos foram menores do que em plantas não pré-estimuladas durante oito dias de estresse salino, indicando que o *priming* incrementou a estabilidade da membrana celular.

Alterações nas concentrações de EROs podem ser ocasionadas pelos efeitos do estresse salino na planta, que interferem no equilíbrio entre a geração e o sistema de defesa antioxidante, consequentemente levando ao estresse oxidativo (Arif *et al.*, 2020). Os principais componentes do sistema antioxidante da célula vegetal são as chamadas enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT e APX. Nesse estudo, as medidas das EROs ($O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2) e a concentração de MDA, indicador de estresse oxidativo, não revelaram diferenças entre as plantas sob estresse salino recorrente (T4) e estresse salino somente no estágio reprodutivo (T3) após sete dias sob salinidade (Fig. 6), apesar das diferenças observadas nos níveis de extravasamento de eletrólitos pelas membranas (Fig. 5b). Esses resultados, associado com a atividade das enzimas antioxidantes (Fig. 7), indicam que o sistema antioxidante agiu de forma eficiente em ambas as condições (T3 e T4) para manter a homeostase redox (Fig. 6c), sugerindo que o *priming* não teve efeito direto sobre o metabolismo redox nas plantas expostas aos diferentes tratamentos com salinidade. Entretanto, após a recuperação, foi observado um aumento de H_2O_2 em plantas expostas à salinidade apenas no estágio reprodutivo (Fig. 6b). Na última década, evidências crescentes têm mostrado que as EROs, particularmente H_2O_2 , podem funcionar como um transdutor de sinal que ativa uma resposta de defesa local e sistêmica da planta (Hasanuzzaman *et al.*, 2020). Assim, o aumento de H_2O_2 em T3 após a recuperação pode indicar que nessas plantas estão em curso processos de sinalização envolvidos na proteção contra estresse oxidativo que, possivelmente, podem induzir algum efeito protetivo de longo prazo.

Como resultado dos efeitos múltiplos da salinidade no arroz, a redução da abertura estomática, seguida da diminuição da transpiração e da assimilação de CO_2 , levam à diminuição da fotossíntese e, consequentemente, da produção de biomassa e rendimento de grãos. Neste estudo, a expressão do gene *TPT1* nas folhas (Fig. 8a) de plantas pré-estimuladas e não pré-estimuladas foi inferior à

das plantas controle. Entretanto, ao comparar as condições T3 e T4 foi possível observar que as plantas T4 apresentaram valores de expressão de *TPT1* maior em comparação às plantas T3 durante o estresse (Fig. 8a). Provavelmente, a redução no índice de clorofila nas folhas (Fig. 5a) e a menor condutância estomática (Fig. 2) observados em plantas que passaram por estresse somente no reprodutivo (T3) podem ter contribuído para uma menor taxa fotossintética e, consequentemente, reduzido a disponibilidade de triose fosfato para ser transportada, o que poderia explicar a menor expressão de *TPT1*, que codifica o translocador de triose fosfato/fosfato (TPT).

Em contrapartida, na bainha, o gene *TPT1* foi regulado positivamente após sete dias sob estresse nas condições T3 e T4. No entanto, plantas não pré-estimuladas tiveram uma expressão maior do que as pré-estimuladas (Fig. 8b). Isso sugere que na bainha pode ter havido a manutenção de taxas fotossintéticas maiores que nas folhas que estavam mais severamente afetadas pelo estresse, o que pode justificar a maior necessidade de carregamento de triose fosfato nesse órgão, e com isso maior expressão de *TPT1*. Após a recuperação, a expressão desse gene apresentou uma tendência de normalização, assemelhando-se a expressão das plantas controle, em todas as condições. Na ráquis, a expressão de *TPT1* não foi significativamente diferente entre as plantas que passaram por estresse no estágio reprodutivo ou estresse recorrente e as plantas controle após sete dias de exposição à salinidade (Fig. 8c), indicando que o estresse salino não afetou a expressão desse gene nos tecidos de ráquis.

Os transportadores de sacarose (SUTs) estão envolvidos no transporte de sacarose de longa distância, ou seja, da folha bandeira até os órgãos drenos, assim como do movimento de carboidratos redistribuídos dos pools de reservas armazenadas nos tecidos vegetativos (bainha e colmo) durante o estágio de enchimento de grãos. Neste estudo, as duas isoformas analisadas *SUT4* e *5* expressas nas folhas mostraram valores de expressão inferiores ao das plantas controle, tanto sob condições de estresse quanto após a recuperação em T3 e T4 (Fig. 9 - 10a). Nas plantas submetidas à salinidade apenas no estágio reprodutivo, foi observado que o valor de expressão de *SUT4* foi maior que nas plantas submetidas ao estresse recorrente (T4) (Fig. 9a), indicando que nessas plantas poderia estar ocorrendo maior exportação de açúcar da folha para os drenos. A baixa expressão de *SUT4* e *5* após a recuperação pode indicar que

outras isoformas como, por exemplo, a *SUT1* que tem papel no carregamento eficiente no floema e exportação da sacarose da folha (Mathan *et al.*, 2020), possam estar codificando para esse transportador.

Após sete dias sob condições estressantes, os genes *SUT4* e 5 expressos na bainha foliar não apresentaram diferenças significativas entre as condições T3 e T4. No entanto, somente nas plantas que passaram por estresse no estágio reprodutivo o valor de expressão de *SUT4* foi inferior aos das plantas controle (Fig. 9b). Por outro lado, a expressão de *SUT5* foi induzida em plantas submetidas a estresse recorrente, diferindo das plantas controle (Fig. 10b). É interessante notar que, para ambas as isoformas na bainha, a expressão estava mais alta nas plantas que passaram por estresse apenas no estágio vegetativo seguido das plantas que passaram por estresse recorrente, mas apenas *SUT5* manteve os níveis de expressão altos após a recuperação. Com base nesses resultados de expressão *TPT1*, *SUT4* e 5 na bainha, associado com as características vasculares (Fig. 4) em plantas pré-estimuladas (T4), sugerimos que o *priming* com sal no estágio vegetativo foi capaz de induzir um maior acúmulo de reservas na bainha e, quando as plantas (T2 e T4) atingiram o estágio de enchimento de grãos, elas foram capazes de remobilizar essas reservas e exportar aos grãos, o que pode justificar os maiores valores de expressão gênica em T2. A resposta transcricional não foi a mesma entre T2 e T4, uma vez que, no momento das amostragens, apenas as plantas em T4 estavam sob estresse. No entanto, ao comparar com as plantas controle, a resposta das plantas em T4 foi melhorada em relação as plantas T3 durante o estresse e após a recuperação, indicando que o *priming* teve um efeito positivo a nível transcricional e, provavelmente, no acúmulo de reservas na bainha.

Na ráquis não houve diferença significativa nos valores de expressão de *SUT4* e 5 para as condições T3 e T4. Além disso, a expressão de ambas as isoformas permaneceram semelhantes às das plantas controle, sugerindo que o transporte de sacarose através do ráquis pode ter sido mantido em ambas as condições, não indicando qualquer efeito do *priming* ao nível transcricional nesse órgão (Fig. 9 -10).

Nos grãos, as duas isoformas *BT1-1* e *BT1-2* que codificam para o transportador de ADP-glicose no amiloplasto apresentaram valores de expressão maiores nas plantas submetidas ao estresse recorrente (T4) e

também após o período de recuperação (Fig. 11a-b), indicando um efeito de memória de longo prazo (Mantoan *et al.*, 2020). Para *BT1-3* uma maior alteração de expressão ocorreu em T4 somente após sete dias de estresse (Fig. 11c). Esses resultados sugerem que o estresse recorrente intensificou a síntese de amido nos grãos.

A produtividade da planta e o rendimento são regidos pela capacidade de sintetizar, transportar, bem como utilizar os fotoassimilados entregues da fonte aos órgãos drenos de forma eficiente. Os resultados das atividades relativamente mais altas de CIN e da SuSy após sete dias de estresse salino (Fig. 12a - d) nos grãos de plantas pré-estimuladas (T4) em comparação ao de plantas não pré-estimuladas (T3) indicaram que as plantas em T4 conseguiram realizar um ajuste flexível e eficiente do suprimento de carboidratos de acordo com as grandes variações de demanda, mantendo maior importação de assimilados da folha bandeira e o uso das reservas de carbono pré-armazenado na bainha (Fig. 8-9-10). Considerando que a CIN ligada à parede celular catalisa a clivagem irreversível da sacarose liberada no apoplasto por meio de transportadores de sacarose e também desempenha papel fundamental no controle da alocação de assimilados (Braun *et al.*, 2014), provavelmente, as maiores atividades de CIN e SuSy nos grãos de plantas T4, em comparação com as plantas T3, aumentaram a capacidade de drenagem dos grãos e gerou um gradiente de concentração que promoveu a descarga da sacarose do floema para os grãos.

A atividade aumentada da SuSy após a recuperação (Fig. 12d) em plantas que passaram por estresse recorrente (T4) sugere que a pré-exposição ao estresse facilitou a recuperação fisiológica das funções das plantas após o estresse salino. De modo similar, Abid *et al.* (2017) mostraram que a maior atividade da SuSy em plantas que passaram por estresse hídrico recorrente melhorou a conversão de sacarose em amido em grãos de trigo, assim favorecendo o rendimento de grãos.

Dentre todos os genes *CINs* e *SUSYs* que codificam para a CIN e SuSy analisados, *CIN2* e *CIN8*, e *SUSY2* e 3 apresentaram maiores valores de expressão após sete dias de estresse em plantas submetidas a estresse recorrente (Fig. 13), o que pode justificar a maior atividade dessas enzimas (Fig. 12a-d) observada nas plantas nessa condição. Após o período de recuperação,

CIN4 e *CIN8*, e *SUSY1* e *SUSY3* foram as isoformas que apresentaram maior expressão em plantas pré-estimuladas (T4). Acreditamos que as isoformas *CIN8* e *SUSY3* estão intimamente envolvidas na transcrição de CIN e SuSy em grãos de plantas submetidas a mais de um evento de estresse, uma vez que esses genes estavam regulados positivamente durante o estresse e após a recuperação somente nessas plantas, indicando que o *priming* foi capaz de estimular as respostas ao nível transcricional.

Além disso, as plantas submetidas a estresse recorrente (T4) analisadas no final do ciclo de desenvolvimento (estádio R9) não tiveram o seu crescimento prejudicado (Tabela 1), sugerindo que essas plantas foram capazes de armazenar as informações após um evento de estresse salino no estágio vegetativo, permitindo responderem melhor a uma segunda exposição ao estresse.

A análise de PCA, que integra as variáveis de expressão dos genes transportadores de sacarose, triose fosfato e ADP-glicose, bem como genes que codificam para as enzimas CIN, NIN, VIN e SuSy e a atividade das mesmas (Fig. 14), revela que após sete dias de estresse as plantas pré-estimuladas (T4) se comportaram de maneira mais similar ao controle do que as plantas não pré-estimuladas (T3), o que evidencia um efeito de memória.

Conclusão

Os resultados do presente estudo apoiam nossa hipótese de que plantas de arroz submetidas ao estresse salino no estágio vegetativo, quando submetidas a um segundo evento de estresse no estágio de enchimento de grãos, reagem de forma distinta quanto à capacidade de transportar e utilizar a sacarose nos grãos, mitigando os efeitos do estresse salino. Em comparação com as plantas não pré-estimuladas, o *priming* efetivamente melhorou a homeostase de íons (relação Na^+/K^+) e teve efeito sobre o aumento do diâmetro de vasos condutores em folhas e raízes. Isso contribuiu para manutenção da concentração de clorofila, crescimento da parte aérea e menor extravasamento de eletrólitos. Além disso, características vasculares e regulação da expressão gênica de transportadores de sacarose e triose fosfato em diferentes órgãos podem estar contribuindo para a maior remobilização de carboidratos

assimilados e armazenados para os grãos em desenvolvimento, conforme hipotetizado no modelo descrito na Figura 15.

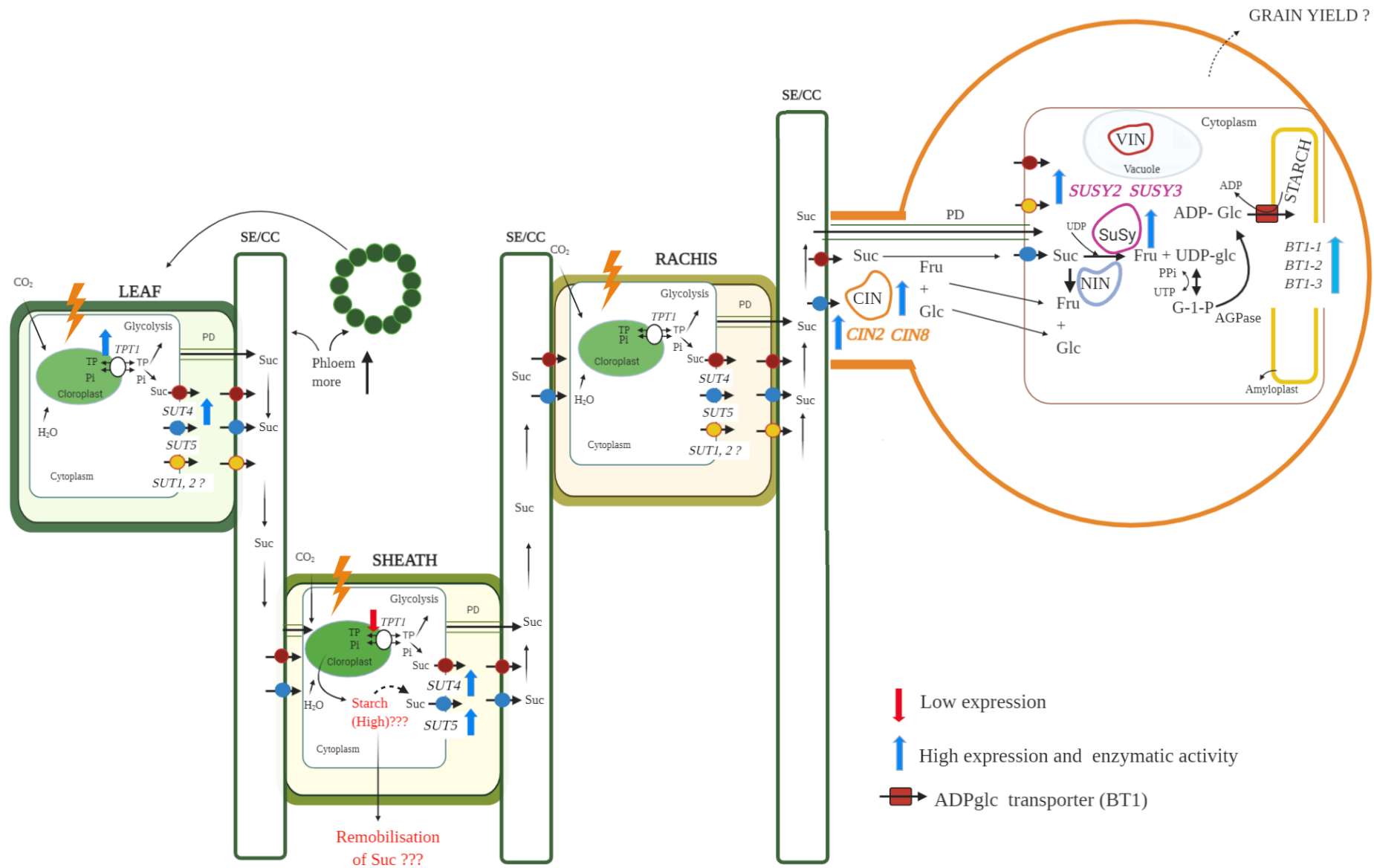


Fig. 15. Um modelo explicativo para o possível efeito do *priming* na síntese, translocação e utilização dos fotoassimilados nos grãos de plantas de arroz submetidas a um segundo evento de estresse durante o estágio reprodutivo (R7-R8). Os resultados ilustrados na figura são das plantas T4 (recorrente) em comparação com T3 (estresse somente no reprodutivo) e com as plantas controle após sete dias de estresse salino (150 mM de NaCl). Nas plantas T4 foi observado um aumento na área do floema nas folhas que pode ter contribuído para um acúmulo de amido na bainha no estágio vegetativo, assim como a translocação de assimilados para os grãos. Nessas plantas, a expressão de *TPT1* e *SUT4* nas folhas foi maior, indicando que elas conseguiram manter a fotossíntese e transporte de sacarose da folha para outros órgãos, enquanto na bainha a expressão de *TPT1* foi maior em T3 em comparação com T4. Para *SUT4* e 5 não foi observado diferença nos valores de expressão entre T3 e T4 na bainha. No entanto, em comparação ao controle, as plantas T4 tiveram valores iguais ou superiores ao controle, ao contrário do observado para T3. Isso sugere que as plantas pré-estimuladas poderiam estar remobilizando reservas previamente armazenadas da bainha para o grão. Na ráquis não foi observado diferença de expressão entre T3 e T4 para os genes *TPT1*, *SUT4* e *SUT5*. Nos grãos as plantas pré-estimuladas tinham atividade aumentada de CIN e SuSy, bem como expressão dos genes *CIN2*, *CIN8*, *SUSY2*, *SUSY3*, *BT1-1*, *BT1-2* e *BT1-3* regulados exclusivamente nessas plantas, o que indica que as plantas foram capazes de manter a síntese de amido no grão sob salinidade. Suc: sacarose, CIN: invertase ácida de parede, NIN: invertase neutra, VIN: invertase vacuolar, SuSy: sacarose sintase, Fru: frutose, Glc: glicose, SUT: transportador de sacarose, TPT: transportador de triose fosfato/fosfato, BT1: transportador de ADPglicose, PD: plasmodesmas, TP: triose fosfato, Pi: fosfato inorgânico, SE/CC: elemento de tubo crivado/células companheiras. Linhas pontilhadas indicam rotas possíveis, mas não confirmadas, assim como o ponto de interrogação. A ausência de setas indica que não houve diferença entre as condições T3 e T4.

Referências

Abid M, Shao Y, Liu S, Wang F, Gao J, Jiang D, Tian Z, Dai T. 2017. Pre-drought priming sustains grain development under post-anthesis drought stress by regulating the growth hormones in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Planta* doi:10.1007/s00425-017-2698-4.

Abid M, Tian Z, Ata-UI-Karim ST, Liu Y, Cui Y, Rizwan Z, Dong J, Dai T. 2016. Improved tolerance to post-anthesis drought stress by pre-drought priming at vegetative stages in drought-tolerant and - sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol Biochem* **106**, 218–227.

Abid M, Tian Z, Hu J, Ullah A, Cui Y, Ali S, Jiang S, Zahoor R, Fan Y, Dong J, Dai T. 2017b. Activities of carbohydrate-metabolism enzymes in pre-drought primed wheat plants under drought stress during grain filling. *J Integr Plant Biol* Accepted Author Manuscript. doi:10.1111/jipb.12628.

Abid M, Tian Z, Zahoor R, Ata-UI-Karim S, Daryl C, Sniderjj JL, Dai T. 2018. Chapter Two - Pre-Drought Priming: A Key Drought Tolerance Engine in Support of Grain Development in Wheat. *Advances in Agronomy* **152**, 51-85.

Amaral MN do, Auler PA, Rossatto T, Barros MPM, Oliveira M, Braga EJB. 2020. Long-term somatic memory of salinity unveiled from physiological, biochemical and epigenetic responses in two contrasting rice genotypes. *Physiology Plantarum* **170**, 248-268.

Amaral MN do, Willian PL, Auler PA, Rossatto T, Milech C, Magalhães AM, Braga EJB (2020b) Long-term transcriptional memory in rice plants submitted to salt shock. *Planta* **251**.

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.

Auler PA, Amaral MN, Rossatto T, Crizel RL, Milech C, Chaves FC, Souza GM, Braga EJB. 2020. Metabolism of abscisic acid in two contrasting rice genotypes submitted to recurrent water deficit. *Physiologia Plantarum* **0**, 0–0.

Ayre BG. 2011. Membrane-Transport Systems for Sucrose in Relation to Whole-Plant Carbon Partitioning. *Molecular Plant* **4**, 377–394.

Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ. 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plant* **104**, 280–292.

Backhaus S, Kreyling J, Grant K, Beierkuhnlein C, Walter J, Jentsch A. 2014. Recurrent mild drought events increase resistance toward extreme drought stress. *Ecosystems* **17**, 1068-1081.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**, 248–254.

Braun DM, Wang L, Ruan YL. 2014. Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *Journal of Experimental Botany* **65**, 1713–1735.

Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA. 2007. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Sci* **173**, 603–608.

Byrta CS, Munnsb R, Burtonc RA, Gillihama M, Wegea S. 2018. Root cell wall solutions for crop plants in saline soils. *Plant Science* **269**, 47–55.

Chen HJ, Wang SJ. 2008. Molecular regulation of sink–source transition in rice leaf sheaths during the heading period. *Acta Physiol Plant* **30**, 639–649.

El-Rodeny WM, EL-Okkiah AF. 2012. Physiological and Anatomical Changes in *Glycine max* L. Under Salinity Stress, Egypt. *J. Bot.* 2nd International conference, 29-30 April, Minia Univ, 37 – 50.

Fahrendorf T, Beck E. 1990. Cytosolic and cell-wall-bound acid invertases from leaves of *Urtica dioica* L.: a comparison. *Planta, Heidelberg* **180**, 237-244.

Fan Y, Ma C, Huang Z, Abid M, Jiang S, Dai T, Zhang W, Ma S, Jiang D, Han X. 2018. Heat Priming During Early Reproductive Stages Enhances Thermo-

Tolerance to Post-anthesis Heat Stress via Improving Photosynthesis and Plant Productivity in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Plant Science* **9**.

Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* **59**, 309–314.

Griffiths CA, Paul MJ, Foyer CH. 2016. Metabolite transport and associated sugar signalling systems underpinning source/sink interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1857**, 1715–1725.

Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud AJ, Fujita M, Fotopoulos V. 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants* **9**, 681.

Hameed M, Ashraf M, Naz N. 2009. Anatomical adaptations to salinity in cogon grass [*Imperata cylindrica* (L.) Raeuschel] da gama de sal, Pakistan. *Solo de planta* **322**, 229–238.

Han H, Tian Z, Fan Y, Cui Y, Cai J. 2015. Water-deficit treatment followed by rewatering stimulates seminal root growth associated with hormone balance and photosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Plant Growth Regul* **77**, 201-210.

Heath RL, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* **125**, 189–198.

Hu T, Jin Y, Li H, Amombo E, Fu J. 2016. Stress memory induced transcriptional and metabolic changes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in response to salt stress. *Physiol Plant* **156**, 54–69.

Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**, 137-138.

Kibria MG, Hossain M, Murata Y, Hoque MA. 2017. Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. *Rice Sci* **24**, 155-162.

Li C, Bai T, Ma F, Han M. 2010. Hypoxia tolerance and adaptation of anaerobic respiration to hypoxia stress in two *Malus* species. *Sci. Hortic* **124**, 274–279.

Li S, Wei X, Ren Y, Qiu J, Jiao G, Guo X, Tang S, Wan J, Hu P. 2017. OsBT1 encodes an ADP-glucose transporter involved in starch synthesis and compound granule formation in rice endosperm. *Scientific Reports* **7**, 40124.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**, 402-408.

Lowell CA, Tomlinson PT, Koch KE. 1989. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. *Plant Physiol* **90**, 1394–1402.

Lukić N, Kukavica B, Davidović-Plavšić B, Hasanagić D, Walter J. 2020. Plant stress memory is linked to high levels of anti-oxidative enzymes over several weeks. *Environmental and Experimental Botany* **178**, 104166.

Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J. 1995. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *J Exp. Bot.* **46**, 1843–1852.

Magalhães Júnior AM, Fagundes PRR, Franco DF, Morais OP, Siqueira FG, Streck EA, Aguiar GA, Facchinello PHK. 2017. BRS AG: first cultivar of irrigated rice used for alcohol production or animal feed. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* **17**, 2-77.

Mantoan LPB, Corrêa CV, Rainho CA, Almeida LFR. 2020 Rapid dehydration induces long-term water deficit memory in sorghum seedlings: advantages and consequences. *Environmental and Experimental Botany* **180**, 104-252.

Mathan J, Singh A, Ranjan A. 2020. Sucrose transport and Sucrose Synthase activity control the source-sink relationship for biomass and grain yield in rice,

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.03.324889>; this version posted October 19.

Miller GL. 1959 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington **31**, 426-428.

McIlvaine TC. 1921 A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, **49**, 183-186.

Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen-peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach-chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**, 867–880.

Nassar RMA, Kamel HA, Ghoniem AE, Alarcón JJ, Sekara A, Ulrichs C, Abdelhamid MT. 2020. Physiological and Anatomical Mechanisms in Wheat to Cope with Salt Stress Induced by Seawater. *Plants* **9**, 237.

Radchuk V, Riewe D, Peukert M, Matros A, Strickert M, Radchuk R, Weier D, Steinbi ßHH, Sreenivasulu N, Weschke W, Weber H. 2017. Down-regulation of the sucrose transporters HvSUT1 and HvSUT2 affects sucrose homeostasis along its delivery path in barley grains. *Journal of Experimental Botany* **68**, 4595–4612.

Riaz M, Arif MS, Ashraf MA, Mahmood R, Yasmeen T, Shakoob MB, Shahzad SM, Ali M, Saleem I, Arif M, Fahad S. 2019. Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance, Chapter 7 - A Comprehensive Review on Rice Responses and Tolerance to Salt Stress, Pages, 133-158.

Rossatto T, Auler AP, Amaral NM, Milech C, Magalhães Júnior AM, Braga EJB. 2021. Selection of reference genes for RT-qPCR studies in different tissues of rice cultivar BRS AG submitted to recurrent saline stress. *Russian journal of plant physiology* **68**, 254–265.

Sakai WS. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology*, Baltimore **48**, 247-249.

Saleh J, Najafi N, Oustan S, Ghasemi-Golezani K, Aliasghrizad N. 2019. Silicon Affects Rice Growth, Superoxide Dismutase Activity and Concentrations of Chlorophyll and Proline under Different Levels and Sources of Soil Salinity. *Silicon* **11**, 2659–2667.

Sellami S, Hir LR, Thorpe MR, Aubry E, Wolff N, Vilaine F, Brini F, Dinant S. 2019 Arabidopsis natural accessions display adaptations in inflorescence growth and vascular anatomy to withstand high salinity during reproductive growth. *Plants* **8**, 1–17.

Shi W, Lawas LMF, Raju BR, Jagadish SVK. 2015 Acquired thermo-tolerance and trans-generational heat stress response at flowering in rice. *J. Agron. Crop Sci.* **202**, 309-319.

Takita T. 1983. Breeding of a rice line with extraordinarily large grains as a genetic source for high yielding varieties. *JARQ* **17**, 93-7.

Tuncel A, Okita TW. 2013. Improving starch yield in cereals by over-expression of ADPglucose pyrophosphorylase: Expectations and unanticipated outcomes. *Plant Science* **211**, 52-60.

Velikova V, Yordanov I, Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. *Plant Sci* **151**, 59–66.

Vincent C, Rowlanda D, Schaffer B, Bassilb E, Racette K, Zurweller B. 2020. Primed acclimation: A physiological process offers a strategy for more resilient and irrigation-efficient crop production. *Plant Science* **295**, 110-240.

Wu HH, Zhang XC, Giraldo JP, Shabala S. 2018. It is not all about sodium: revealing tissue specificity and signalling roles of potassium in plant responses to salt stress. *Plant Soil* **431**, 1-17.

Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA. 1976. In *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*, 3rd ed.; International Rice Research Institute: Los Banos, Laguna, The Philippines, 17-22.

Zhao C, Zhang H, Cong C, Zhu JK, Shabala S. 2020. Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil Salinity. *The Innovation* **1**, 1-41.

Material suplementar

Tabela S1 - Lista de primers utilizados para análise de expressão por RT-qPCR.

Genes	ID	Primer F/R - 5'-3'	Referências
<i>OsSUT4</i>	Os02g0827200	TTTGGCTGAGCAGAACACCA/ ATGTCATTCTGGGCAGAGCTT	Toyota et al. (2006)
<i>OsSUT5</i>	Os02g0576600	CTAGTGCGAAACTCCATCAA/ AAAATATTTGGGTTTCCTGAGAT	
<i>OsTPT1</i>	Os01g0239200	ACAACATGGGCGAGGATCAT/ CAATCTTACCACCGCAATATGC	
<i>OsBT1-1</i>	Os02g0202400	CTGGAATCGGATGAACTCGTGTA/ TCAGCAGAAATCAGTTATTGGACATG	Toyota et al. (2006)
<i>OsBT1-2</i>	Os05g0171300	TGATTGTGCATGGGTGTGATG/ AACAGAGGAAATCGAATCCTACG	Toyota et al. (2006)
<i>OsBT1-3</i>	Os06g0602700	TTGCTAGCGTCGGTCTCAAAG/ GCAATGATCAGCGAACGGAA	Toyota et al. (2006)
<i>OsVIN2</i>	Os02g0106100	CCATTGACACGTTGGATCGAC/ TGATTGCTACGCTACACTCCG	Toyota et al. (2006)
<i>OsNIN1</i>	Os03g0314800	CTCAAAGGCAAGCAGAGGGT/ AGAGTTTTTCAGTTGCTTACGTGT	
<i>OsNIN2</i>	Os01g0332100	GTAGCTCCGGTGGATTCAGG/ TGCAGTATGCCCTCAGCAAA	
<i>OsNIN3</i>	Os02g0529400	CCAATTCGTTGCACAGCTCC/ TGTCCACCGCATCCTTAACC	Toyota et al. (2006)
<i>OsNIN4</i>	Os04g0409900	AAGCGAACGAACAAACCACG/ CTAGAGCTTGGCTTCTCGGG	
<i>OsNIN5</i>	Os02g0125600	TGTGCTGATGGCTGTTCCAT/	

<i>OsNIN8</i>	Os02g0550600	TGGGTTTAAGTGGCTTACCAT CATGACTCCAAGAAGGGCGT/ TCAGACAAGCACAGGCTCAG	
<i>OsCIN1</i>	Os02g0534400	CAGGATAACCACTTCCAGCCC/ CTGTGATAACCGAGTGAGCCC	
<i>OsCIN2</i>	Os04g0413500	TCGTTGACACGGACATCACC/ GCTCTCAACAACCGACCTGT	
<i>OsCIN4</i>	Os01g0966700	TCCTTTTGACCCTTCCTGGC/ CTGCTTCTCGGCAATGCTTC	
<i>OsCIN5</i>	Os04g0664900	ACATAGTTTGGGGCCACTCG/ CCGTTTATGTGCTCGGAGT	
<i>OsSUSY1</i>	Os03g0401300	GAGAAGTGCCAGGAAGACCC/ AGCACTGCAAGAAAGACGAA	
<i>OsSUSY2</i>	Os06g0194900	AGCTGTACTCTGAGAGGCTGA/ AGTAACTTACCAGGCTGCGG	
<i>OsSUSY3</i>	Os07g0616800	GATGCAGGTACACATGGAAGC/ ACCGTAGACACCGGAGAGAG	
<i>OsSUSY4</i>	Os03g0340500	TTGGCTGGGGTTTATGGCTT/ AGGGCAGAACTTTTTGCATACC	
<i>OsSUSY6</i>	Os02g0831500	CACAACCTACAGAGAGCGCA/ AGAATGGGCACACTTGCCTT	
<i>TIP41 – Like</i>	AK103511	GTTTGGATGAACCCCGCAA/ GGCAACAAGGTCAATCCGATC	Caldana et al. (2007)
<i>Cyclophilin</i>	AK121304	CCACCATCACAGATCGGATCTT/ GCGGTCAGAGCGAAAGTAGCTA	Caldana et al. (2007)

Tabela S2 - Quantificação relativa de genes que codificam para enzimas envolvidas na clivagem de sacarose como a invertase ácida (*CIN*), neutra (*NIN*), vacuolar (*VIN*) e sacarose sintase (*SUSY*) em grãos de plantas de arroz, cv. BRS AG, nos dois momentos de coleta: sete dias após a aplicação de 150 mM de NaCl e após dois dias de recuperação no estágio reprodutivo (R7 – R8).

	T1		T2		T3		T4	
	SETE	REC	SETE	REC	SETE	REC	SETE	REC
<i>OsCIN1</i>	1 ^{ABa}	1 ^{Aa}	0,07 ± 0,01 ^{Ca}	0,09 ± 0,00 ^{Ba}	1,09 ± 0,08 ^{Aa}	0,16 ± 0,01 ^{Bb}	0,86 ± 0,08 ^{Ba}	0,08 ± 0,01 ^{Bb}
<i>OsCIN2</i>	1 ^{Aa}	1 ^{Aa}	0,35 ± 0,03 ^{Ba}	0,42 ± 0,04 ^{Ba}	0,28 ± 0,02 ^{Bb}	1,26 ± 0,04 ^{Aa}	1,48 ± 0,27 ^{Aa}	1,33 ± 0,04 ^{Aa}
<i>OsCIN4</i>	1 ^{Aa}	1 ^{Ba}	0,07 ± 0,01 ^{Cb}	0,20 ± 0,01 ^{Ca}	0,46 ± 0,01 ^{Bb}	0,85 ± 0,03 ^{Ba}	0,35 ± 0,03 ^{Bb}	1,71 ± 0,08 ^{Aa}
<i>OsCIN5</i>	1 ^{Aa}	1 ^{Aa}	0,23 ± 0,01 ^{Bb}	0,45 ± 0,01 ^{Ca}	0,30 ± 0,01 ^{Bb}	0,62 ± 0,01 ^{Ba}	0,27 ± 0,01 ^{Bb}	0,44 ± 0,05 ^{Ca}
<i>OsCIN8</i>	1 ^{Ba}	1 ^{Ba}	0,21 ± 0,02 ^{Cb}	0,41 ± 0,02 ^{Ca}	1,02 ± 0,02 ^{Ba}	1,18 ± 0,09 ^{Ba}	2,53 ± 0,08 ^{Aa}	1,64 ± 0,06 ^{Ab}
<i>OsVIN2</i>	1 ^{BCa}	1 ^{Aa}	1,57 ± 0,04 ^{Ba}	0,16 ± 0,02 ^{Cb}	0,75 ± 0,06 ^{Ca}	0,27 ± 0,02 ^{BCb}	6,92 ± 0,31 ^{Aa}	0,87 ± 0,01 ^{ABb}
<i>OsNIN1</i>	1 ^{Ba}	1 ^{Aa}	0,30 ± 0,03 ^{Ca}	0,07 ± 0,01 ^{Ba}	0,66 ± 0,04 ^{BCa}	0,24 ± 0,05 ^{Ba}	1,80 ± 0,08 ^{Aa}	1,11 ± 0,03 ^{Ab}
<i>OsNIN2</i>	1 ^{Aa}	1 ^{Ba}	0,17 ± 0,02 ^{Ca}	0,27 ± 0,04 ^{Ca}	0,49 ± 0,02 ^{Bb}	0,81 ± 0,01 ^{Ba}	0,53 ± 0,02 ^{Bb}	3,42 ± 0,11 ^{Aa}
<i>OsNIN3</i>	1 ^{Aa}	1 ^{Ba}	0,74 ± 0,00 ^{Ba}	0,22 ± 0,01 ^{Cb}	0,17 ± 0,01 ^{Cb}	0,95 ± 0,02 ^{Ba}	0,59 ± 0,02 ^{Bb}	1,82 ± 0,10 ^{Aa}
<i>OsNIN4</i>	1 ^{Ba}	1 ^{Ba}	0,14 ± 0,02 ^{Cb}	0,26 ± 0,01 ^{Ca}	0,25 ± 0,02 ^{Cb}	0,92 ± 0,01 ^{Ba}	2,58 ± 0,04 ^{Aa}	1,80 ± 0,05 ^{Ac}
<i>OsNIN5</i>	1 ^{Ba}	1 ^{Ba}	0,24 ± 0,04 ^{Ca}	0,07 ± 0,01 ^{Ca}	1,80 ± 0,03 ^{Aa}	0,34 ± 0,02 ^{BCb}	1,08 ± 0,03 ^{Bb}	2,32 ± 0,34 ^{Aa}
<i>OsNIN8</i>	1 ^{Aa}	1 ^{Ba}	0,22 ± 0,01 ^{Ca}	0,18 ± 0,02 ^{Ca}	0,16 ± 0,03 ^{Ca}	0,31 ± 0,02 ^{Ca}	0,57 ± 0,03 ^{Bb}	3,89 ± 0,14 ^{Aa}
<i>OsSUSY1</i>	1 ^{Aa}	1 ^{Ba}	0,15 ± 0,02 ^{Cb}	0,42 ± 0,01 ^{Ca}	0,49 ± 0,03 ^{Ba}	0,30 ± 0,04 ^{Cb}	0,21 ± 0,05 ^{Cb}	3,49 ± 0,07 ^{Aa}
<i>OsSUSY2</i>	1 ^{Ba}	1 ^{Aa}	0,35 ± 0,03 ^{Ba}	0,13 ± 0,01 ^{Ba}	0,63 ± 0,08 ^{Ba}	0,44 ± 0,05 ^{ABa}	1,89 ± 0,40 ^{Aa}	0,66 ± 0,05 ^{ABb}
<i>OsSUSY3</i>	1 ^{Ba}	1 ^{Ba}	0,19 ± 0,01 ^{Cb}	0,59 ± 0,04 ^{Ba}	0,66 ± 0,07 ^{BCa}	0,88 ± 0,06 ^{Ba}	2,25 ± 0,15 ^{Ab}	3,55 ± 0,22 ^{Aa}
<i>OsSUSY4</i>	1 ^{Aa}	1 ^{ABa}	0,35 ± 0,02 ^{Ba}	0,44 ± 0,01 ^{Ca}	0,47 ± 0,03 ^{Bb}	1,42 ± 0,15 ^{Aa}	0,39 ± 0,02 ^{Bb}	0,89 ± 0,03 ^{Ba}

<i>OsSUSY6</i>	1 ^{Aa}	1 ^{Aa}	0,09 ± 0,01 ^{Da}	0,07 ± 0,01 ^{Da}	0,35 ± 0,02 ^{Ba}	0,33 ± 0,01 ^{Ca}	0,25 ± 0,01 ^{Cb}	0,62 ± 0,03 ^{Ba}
----------------	-----------------	-----------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------	---------------------------

Os valores são representados pela média de cada condição ± SE (n = 3). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente dentro das condições, e letras minúsculas não diferem entre os momentos de coleta dentro da mesma condição.

T1: controle; T2: estresse salino aplicado no estágio vegetativo (V5); T3: estresse salino aplicado no estágio reprodutivo (R7-R8);

T4: estresse salino aplicado no vegetativo (V5) e reprodutivo (R7-R8).

Artigo III – Submetido à publicação em *The Plant Journal* (ISSN: 1365-313X)

Cross-stress memory: salt *priming* at vegetative growth stages improves tolerance to drought stress during grain-filling in rice plants

Tatiana Rossatto^{1,2*}, Marcelo Nogueira do Amaral¹, Priscila Ariane Auler¹, Marta-Marina Pérez-Alonso², Stephan Pollmann², Eugenia Jacira Bolacel Braga¹

¹Department of Botany, Biology Institute – Plant Physiology, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

²Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Pozuelo de Alarcon, Spain

*Corresponding author: Tatiana Rossatto (tatyrossato@hotmail.com)

Summary

The pre-exposure of a plant to a stress condition can stimulate tolerance to subsequent stresses, a phenomenon associated with cross-tolerance in plants. The objective of this study was to investigate whether the pre-exposure of rice plants to saline stress at the vegetative stage has the potential to mitigate the effects of a drought event during grain-filling, and to evaluate the transcriptional, physiological, and hormonal responses in order to identify long-term memory mechanisms. For this the rice plants were exposed pre-treatment in the vegetative stage with salt, and water deficit in the reproductive stage. Physiological parameters were evaluated and the endogenous levels of the plant hormones abscisic acid (ABA), indole-3-acetic acid (IAA), salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) were assessed by mass spectrometry. Additionally, RNA-sequencing (RNA-Seq) was performed in order to investigate transcriptional profiles of rice plants subjected to cross-stress. The results demonstrated that primed plants challenged by water stress during the grain-filling stage, showed less electrolyte leakage, less damage to the photosynthetic apparatus and increased root growth. The recorded elevated ABA concentration in leaves is closely related to the above physiological responses. Along with JA and IAA, ABA can be a determinant of long-term stress memory in rice. The annotation of specific cross-tolerance genes pointed to signaling and synthesis of hormones, photosynthesis, stomatal conductance, antioxidant system, glyoxylate cycle and

transcription factors. It is concluded that priming with salt in the vegetative stage mitigates the effects of water stress during the reproductive stage at the transcriptional, physiological and hormonal levels.

Keywords: Abiotic stress; Absciscic acid; *Oryza sativa* L.; Recurrent stress; Transcriptome

Significance Statement: Do plants subjected to cross-stress at different growth stages have long-term memory? A first salt event alters transcriptional, physiological and hormonal responses to a second event with drought on rice plants, providing new insights into the process of acquiring long-term cross-tolerance.

Abbreviations:

Control - irrigation with nutrient solution and water throughout the plant cycle

V-salt - pre-treatment with salt in the vegetative stage and without water deficit in the reproductive stage

R-drought - without pre-treatment in the vegetative stage and with water deficit in the reproductive stage (non-primed plants)

V-salt + R-drought - pre-treatment in the vegetative stage with salt and water deficit in the reproductive stage (primed plants)

C_i - intercellular CO₂ concentration

K - instantaneous carboxylation efficiency

RWC - relative water content

ABA - abscisic acid

IAA - indole-3-acetic acid

SA - salicylic acid

JA - jasmonic acid

DEGs - Differentially expressed genes

PPI - Protein–protein interaction

A - photosynthesis

APX - ascorbate peroxidase

CAT - catalase

EL - electrolyte leakage

E - transpiration

F_v/F_m - a value that is related to the maximum quantum yield of PSII

Gs - stomatal conductance

H₂O₂ - Peroxide oh hydrogen

PSI - photosystem I

PSII - photosystem II

ROS - reactive oxygen species

RQ - relative quantification

SOD - superoxide dismutase

TCA - cycle of tricarboxylic acids

WUE - efficient use of water

UBC2E - ubiquitin conjugating enzyme E2

GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

INTRODUCTION

In the field, plants are prone to suffer from the effects of the environment and are forced to respond to adverse conditions at their location because of their immobility (Schwachtje *et al.*, 2019). Depending on the nature and intensity of these environmental changes, the plant can respond with a metabolic adjustment at all organizational levels, from the cell to the whole plant, and, in most cases, the changes constitute a stress for the plant (Larcher, 2000; Wojtyla *et al.*, 2020). Among the abiotic stresses that act as limiting factors for plants, drought and salinity represent the main causes of losses in global agricultural production (Agarwal *et al.*, 2013). They are responsible for decreasing the yield of the main cultures by approximately 50% and affect more than 10% of the arable land worldwide (Pandey *et al.*, 2020).

Some responses triggered in plants subjected to drought and salinity (osmotic stresses) show high similarity and are often interconnected, causing disruption of ion homeostasis and distribution, which results in cellular dehydration and osmotic imbalance. Consequently, this leads to damage to the cell membranes and the inhibition of plant growth, cell division, and expansion. A reduction in the growth rate and stomatal closure are the most common responses to osmotic stress. In addition, recurring drought or salt stress episodes

during the reproductive stage of crops can lead to significant reductions in the grain yield and quality (Munns and Gilliam, 2015; Sade *et al.*, 2017; Sánchez-Barrena *et al.*, 2018; Upadhyaya and Panda, 2019). However, plants have developed several distinct detections and signaling mechanisms to sense and respond to these stresses (Mohanta *et al.*, 2018), as well as numerous adaptive responses, including morphological, anatomical, physiological, biochemical, and molecular responses, to mitigate the detrimental effects of drought and salt stress (Chaves *et al.*, 2009; Dinnyen, 2019; Kumar and Dash, 2019; Ganie *et al.*, 2019; Gupta *et al.*, 2020).

Most studies have investigated the impacts of single, regular, and isolated drought and salinity events on different species. However, the plant environment is dynamic, so many stressful events can occur at the same time (combined) or in succession (recurrent) during the life cycle of a plant (Vokkaliga *et al.*, 2018). Thus, in recent years, studies that aim to understand the response of plants after several exposures to the same or other stressors have gained importance. Pre-exposure of plants to stress (*priming*) has been demonstrated to effectively confer plant resistance to later severe stress episodes (Bruce *et al.*, 2007; Pastor *et al.*, 2012). In addition to preparing the organism for an improved response to repeated environmental stress (Amaral *et al.*, 2020; Auler *et al.*, 2020), pre-exposure of a plant to a non-lethal condition can stimulate cross-tolerance to other abiotic stresses (cross-stress) that occur later (Li *et al.*, 2014b; Li *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

It is widely accepted that plants have the ability to develop some type of "stress memory," which is defined as the ability of plants subjected to a first exposure to stress to store this information so that they can respond different to stress when they are again challenged, often triggering an improved, more efficient, and/or faster response (Avramova, 2015; Crisp *et al.*, 2016; Fleta-Soriano and Munné-Bosch, 2016).

Along with recent advances in the knowledge about the effects and signals induced by *priming*, there is already information on some mechanisms that support plant memory. Among these are calcium signaling (Maszkowska *et al.*, 2018), hormonal changes (Auler *et al.*, 2020), primary metabolism (Amaral *et al.*, 2020b), and differential gene expression (Avramova, 2015). The concept of "transcriptional memory" implies that stress-responsive genes are "trainable" by

a stress experience and show differential expression in response to repeated stress (Ding *et al.*, 2012, 2013, 2014). Another mechanism includes epigenetic effects (Baurle, 2017), such as modifications of the histone tail, DNA methylation, or RNA polymerase II in pause (Pol II), which are mainly involved in long-term and/or transgenerational memory responses (Friedrich *et al.*, 2018; Amaral *et al.*, 2020a).

However, information on stress memory is still limited, especially in relation to crop plants. In addition, several studies have reported the effect of *priming* in the short term and/or within the same growth stage, while the long-term pre-exposure and stress recovery responses (mainly addressing gene and hormonal regulation) have received little exploration.

Accordingly, the hypothesis of the study is that the pre-exposure of rice plants to salinity during the vegetative stage mitigates the effects of drought during the grain-filling stage, by coordinating physiological as well as molecular processes, and hormonal changes. In addition, pretreated plants recover more efficiently than plants that have undergone a single stress event. Here, we investigate whether the pre-exposure of rice plants to saline stress at the vegetative stage has the potential to mitigate the effects of a drought event during grain-filling, and to evaluate the transcriptional, physiological, and hormonal responses in order to identify long-term memory mechanisms.

RESULTS

Physiological responses after different stress conditions (salt x drought)

The results showed that non-primed plants (R-drought) showed a significant increase in the leakage of leaf electrolytes, followed by primed plants (V-salt + R-drought) during stress. In recovery, the EL remained high in non-primed plants (R-drought), which differed from V-salt plants. When comparing the collection moments, a decrease in the leakage was observed for both R-drought and V-salt + R-drought plants, reaching values similar to the control (Figure 2a).

The RWC decreased significantly in the V-salt + R-drought and R-drought plants after 16 days of stress. After recovery, the RWC in primed plants (V-salt + R-drought) returned to the level of irrigated plants (V-salt and Control); however,

this was not observed in non-primed plants (R-drought). Comparing the two collection moments, the conditions R-drought and V-salt + R-drought increased the RWC during the recovery period (Figure 2b).

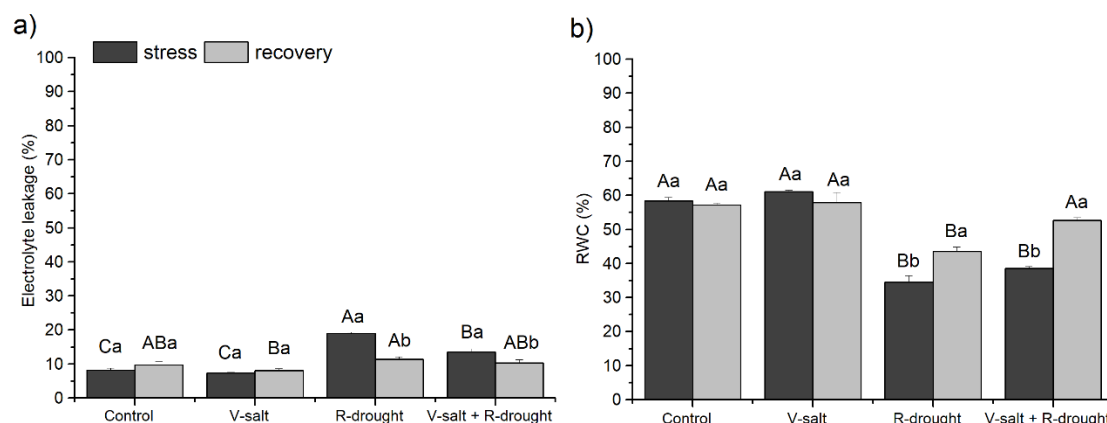


Figure 2. Electrolyte leakage (a), and relative water content (b) in rice cv. BRS AG leaves analyzed after 16 days of stress and five days of recovery. Means $\pm$ SE ($n = 4$) followed by the same uppercase letters are not statistically different among the stress conditions, and equal lowercase letters do not differ between times ($P \leq 0.05$, Tukey's test).

The photosynthetic rate (A) and g_s decreased in plants under water stress (R-drought) and (V-salt + R-drought), when compared with control plants. Recovery A and g_s did not differ significantly among the conditions. When comparing the two collection moments, both conditions (R-drought and V-salt + drought) showed a difference, with a decrease in stress (Figure 3a–b). Although variations in A and g_s occurred after 16 days of drought, this did not result in changes in the intercellular CO_2 concentrations (Figure 3c). After recovery, the lowest value was observed in non-primed plants (R-drought), which differed from the control plants. The F_v/F_m in primed plants was similar to that of the control and lower than in non-primed plants. After recovery, the F_v/F_m increased significantly in non-primed plants (R-drought), and there was no difference among treatments at this time of collection (Figure 3d). Under water deficit stress, values for WUE declined under the R-drought and V-salt + R-drought conditions during stress in relation to V-salt (Figure 4a). After recovery, there was no difference among the conditions. Comparing the collection periods within each

condition, there was an increase in the *WUE* for all conditions during recovery. During stress, a decline in the *K* was observed in primed (V-salt + R-drought) and non-primed (R-drought) plants (Figure 4b). There was no difference among conditions in recovery. Comparing the two collection moments, R-drought and V-salt + R-drought showed an increase in *K* during recovery (Figure 4b).

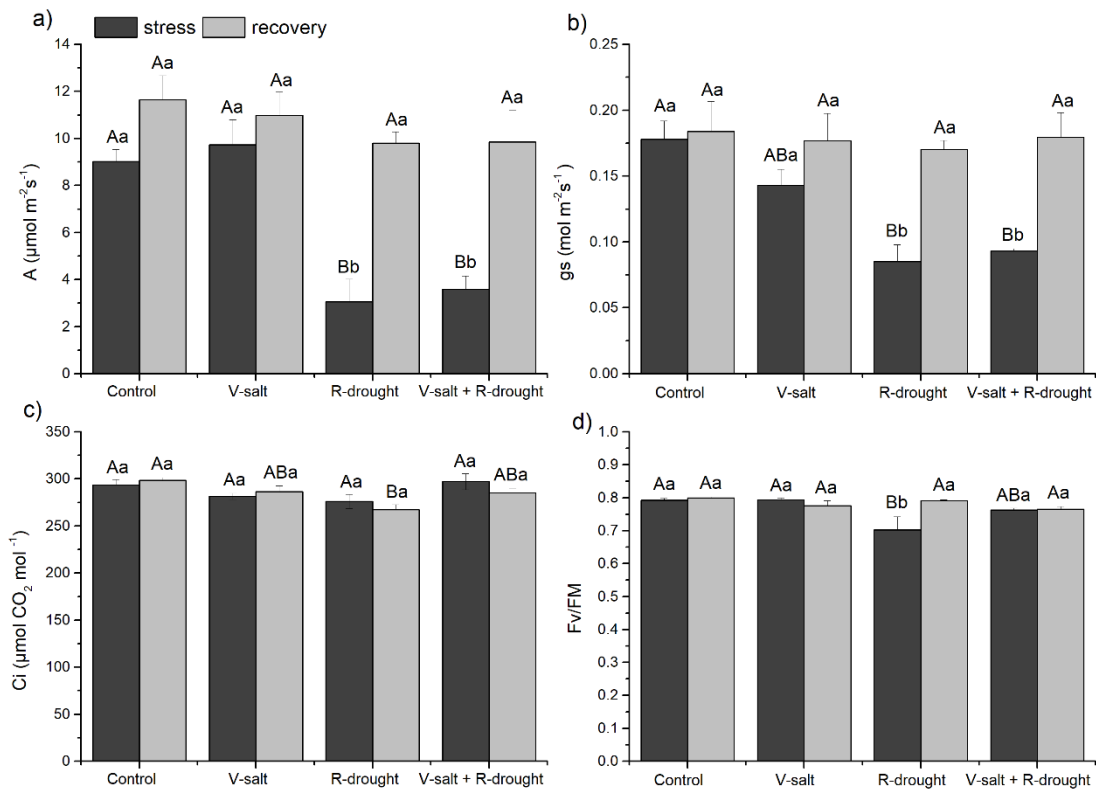


Figure 3. Leaf CO₂ assimilation (a), stomatal conductance (b), intercellular CO₂ concentration (c), and potential quantum efficiency of photosystem II (d) in rice cv. BRS AG leaves analyzed after 16 days of stress and five days of recovery. Means $\pm$ SE ($n = 6$) followed by the same uppercase letters are not statistically different among stress conditions, and equal lowercase letters do not differ between times ($P \leq 0.05$, Tukey's test).

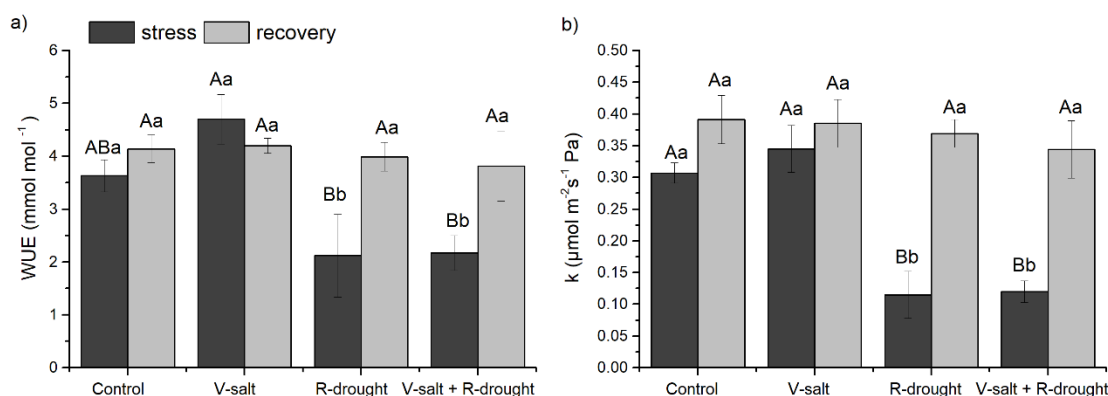


Figure 4. Water use efficiency (a) and instantaneous carboxylation efficiency (b) in rice cv. BRS AG leaves analyzed after 16 days of stress and five days of recovery. Means $\pm$ SE ($n = 6$) followed by the same uppercase letters are not statistically different among stress conditions, and equal lowercase letters do not differ between times ($P \leq 0.05$, Tukey's test).

At the end of the experimental phase (R9), a reduction in the length of the aerial part (cm) was observed in primed plants (V-salt + R-drought), which differed from V-salt (Table 1). In contrast, the root length increased significantly in V-salt + R-drought plants and decreased in V-salt. The number of leaves did not differ significantly among conditions. Regarding biomass, non-primed (R-drought) and primed plants (V-salt + R-drought) produced a lower amount of fresh weight of the aerial part (g) and shoot dry matter (g) compared to irrigated plants. The fresh weight of the roots (g) was reduced in plants that underwent stress only in the vegetative stage (V-salt), unlike in the control and primed plants. As for the root dry matter (g), there was a reduction in the V-salt plants when compared with primed plants (V-salt + R-drought). On the other hand, the root: shoot ratio increased in primed plants (V-salt + R-drought) but did not differ from the control (Table 1).

Table 1. Growth parameters evaluated in rice plants, cv. BRS AG, at the grain maturation stage - R9, under different experimental conditions.

Growth parameters	Control	V-salt	R-Drought	V-salt + R-drought
Height (cm)	110.95 ± 1.31 ^{AB}	111.95 ± 1.47 ^A	106.02 ± 1.74 ^{AB}	105.19 ± 1.05 ^B
Root length (cm)	109.88 ± 1.44 ^B	103.09 ± 1.92 ^C	110.30 ± 0.58 ^B	117.99 ± 3.38 ^A
Number of leaves	10 ± 1.44 ^A	11.00 ± 0.63 ^A	8.00 ± 0.31 ^A	9.00 ± 0.96 ^A
Shoot fresh weight (g)	34.12 ± 0.01 ^A	32.09 ± 0.01 ^A	28.02 ± 0.01 ^B	26.00 ± 0.04 ^B
Roots fresh weight (g)	89.50 ± 0.07 ^A	79.50 ± 0.08 ^B	81.75 ± 0.05 ^{AB}	88.10 ± 0.08 ^A
Shoot dry matter (g)	24.20 ± 0.80 ^A	24.24 ± 1.16 ^A	18.33 ± 0.62 ^B	16.38 ± 1.63 ^B
Roots dry matter (g)	20.82 ± 2.88 ^{AB}	14.75 ± 2.05 ^B	18.32 ± 1.29 ^{AB}	22.13 ± 0.49 ^A
Roots/Leaves ratio	0.88 ± 0.15 ^{AB}	0.61 ± 0.05 ^B	0.99 ± 0.05 ^{AB}	1.41 ± 0.20 ^A

Values are represented by Mean ± SE for each condition (n = 4). Averages followed by the same capital letters are not statistically different between conditions at the time of collection (R9).

Abscisic acid, auxin, salicylic acid, and jasmonic acid levels reveal stress memory

Primed plants (V-salt + R-drought) exhibited higher levels of abscisic acid (ABA) than non-primed plants (R-drought). The same behavior was observed after recovery, in which ABA levels were still higher in primed plants (Figure 5a). When comparing the two collection periods, it was observed that ABA presented higher values in R-drought and V-salt + R-drought plants after 16 days of stress. The V-salt plants showed low levels of auxin (indole-3-acetic acid, IAA) during stress, differing from the control and primed plants (V-salt + R-drought). After five days of recovery, no difference was observed among the conditions (Figure 5b). When comparing the recovery period with the moment of stress, a difference was observed, with decreased levels of IAA under all conditions (Figure 5b). Under water stress, the salicylic acid (SA) concentration in non-primed plants (R-drought) was higher than that in primed plants (V-salt + R-drought), followed by the V-salt and control plants, and remained higher in the R-drought condition after recovery. When comparing the two collection moments, a significant decrease in the SA concentration was observed in all conditions, except for the control (Figure 5c). Regarding the jasmonic acid (JA) levels, the V-salt and V-salt + R-drought conditions presented the highest values during stress. There was no difference in the JA levels after recovery among the conditions. When comparing JA

concentrations during stress with recovery, only V-salt plants had significantly reduced JA levels during the recovery period (Figure 5d).

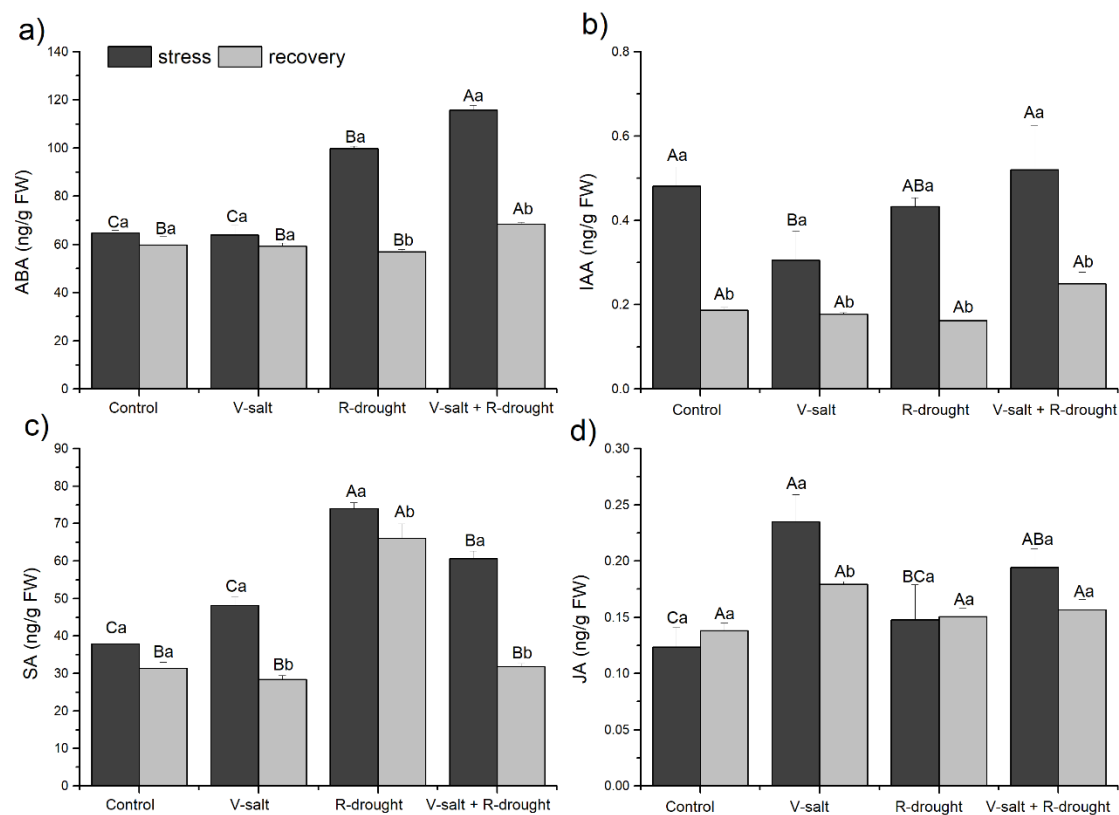


Figure 5. Absciscic acid (ABA) (a), indole-3-acetic acid (IAA) (b), salicylic acid (SA) (c) and jasmonic acid (JA) (d) in rice cv. BRS AG leaves analyzed after 16 days of stress and five days of recovery. Means $\pm$ SE ($n = 6$) followed by the same uppercase letters are not statistically different among stress conditions, and equal lowercase letters do not differ between times ($P \leq 0.05$, Tukey's test).

Identification of genes responsive to cross-tolerance (salt + drought)

After 16 days of stress, the V-salt + R-drought condition versus the control condition presented a total of 1,426 DEGs, with 920 upregulated and 506 downregulated, while the R-drought condition versus the control had 239 DEGs, with 188 upregulated and 51 downregulated. The V-salt condition versus the control condition presented only four DEGs, with two upregulated and two downregulated (Figure 6a). The Venn diagram in Figure 6b shows the distribution of unique and common DEGs to the conditions, in which the highest number of genes exclusive to the V-salt + R-drought versus the control was observed in 1,249 DEGs, followed by R-drought versus the control (63 DEGs), and V-salt

versus the control (three DEGs). We identified 176 genes common to the non-primed (R-drought) and primed (V-salt + R-drought) conditions, while only one gene was common for the V-salt + R-drought versus control and V-salt versus control conditions.

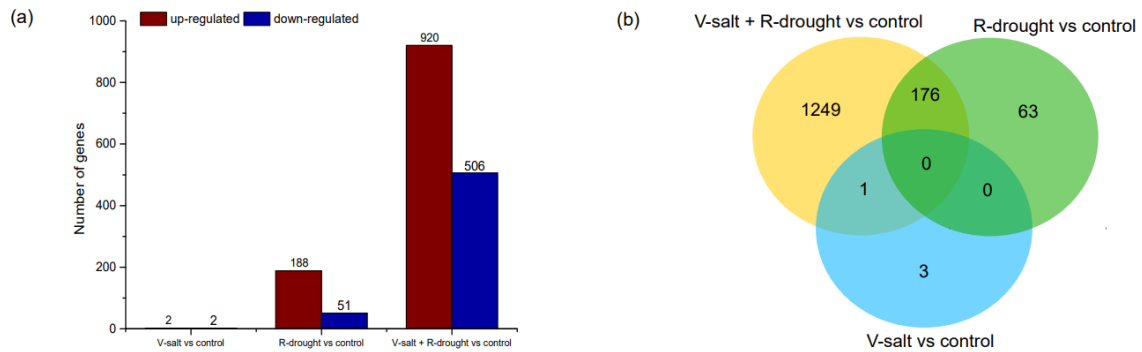


Figure 6. Graph showing the number of differentially expressed genes (DEGs) that were upregulated and downregulated (a) and a Venn diagram showing the distribution of DEGs (b) comparing stress conditions versus the control after 16 days of stress in rice plants (cv. BRS AG).

A comparison of the different stress conditions with the control plants after five days of recovery (Figure 7a) showed the greatest number of DEGs was observed for the R-drought condition with a total of 876 genes, with 465 upregulated and 411 downregulated. This was followed by the V-salt condition, in which 216 genes were upregulated and 17 were downregulated, totaling 233 DEGs. The V-salt + R-drought condition presented 110 DEGs, of which 73 were up-regulated and 37 DEGs were downregulated. An analysis of the Venn diagram with the DEGs regulated positively or negatively revealed these numbers varied from the total DEGs, with a total of 816, 186, and 55 DEGs observed exclusively for the R-drought, V-salt + R-drought, and V-salt conditions, respectively. We identified eight genes that were common to the three conditions: 30 genes were common for V-salt + R-drought and R-drought, 22 genes were common for R-drought and V-salt, and 17 genes were common for V-salt and V-salt + R-drought (Figure 7b).

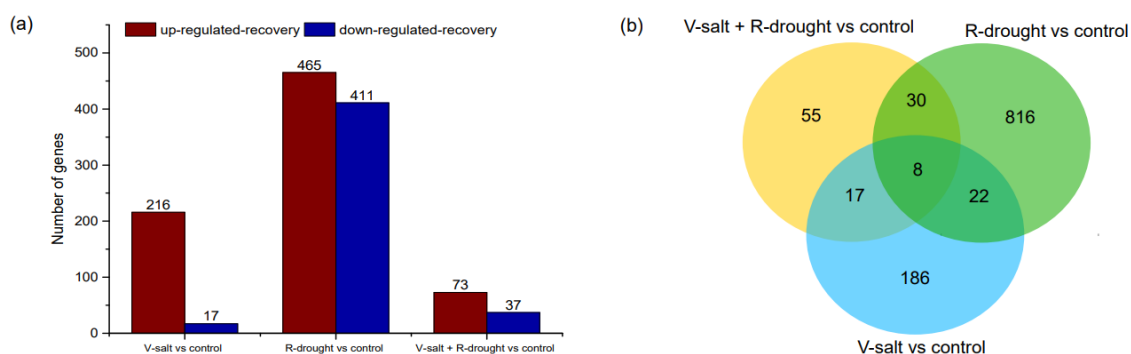


Figure 7. Graph showing the number of differentially expressed genes (DEGs) that were upregulated and downregulated (a) and a Venn diagram showing the distribution of DEGs (b) by comparing stress conditions versus the control after five days of recovery in rice plants (cv. BRS AG).

In order to identify the DEGs between the collection moments, the four conditions at the time of recovery were compared to the respective conditions after 16 days of stress. Five days after recovery, 3,253 genes were differentially regulated ($\log_2FC$ of ≤ -1 and ≥ 1) in V-salt + R-drought condition during recovery (T4R) versus V-salt + R-drought (stress), of which 1,207 were upregulated and 2,046 genes were downregulated (Figure 8a). Comparing the R-drought condition during recovery (T3R) versus R-drought (stress), 3,987 DEGs were found, of which 857 were negatively regulated and 3,130 were positively regulated, while for V-salt condition during recovery (T2R) versus V-salt (stress) 188 genes were found, with 133 genes upregulated and only 55 downregulated. Finally, when comparing the controls at the two collection times, a total of 394 DEGs were observed, of which 134 DEGs were upregulated and 260 DEGs were downregulated (Figure 8a). Next, we explored the unique and common DEGs in different conditions (Figure 8b–c). In total, between the upregulated and downregulated genes there were 1,437, 2,121, 115, and 175 DEGs exclusive in T4R versus V-salt + R-drought, T3R versus R-drought, T2R versus V-salt and condition control during recovery (T1R) versus control, respectively, of which 1,674 were common genes in plants that experienced one and two stress events (Figure 8b–c).

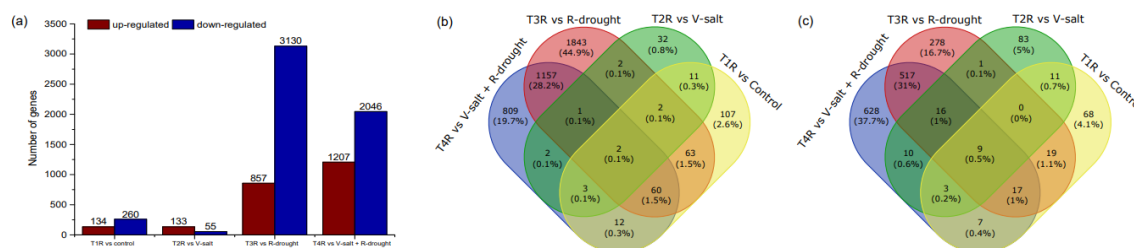


Figure 8. Graph showing the number of differentially expressed genes (DEGs) that were upregulated and downregulated (a), and a Venn diagram showing the distribution of DEGs that were downregulated (b) and upregulated (c) by comparing stress conditions during recovery (T1R= control; T2R = V-salt; T3R = R-drought, and T4R= V-salt + R-drought) versus the same conditions after 16 days of stress in rice plants (cv. BRS AG).

We identified genes that were significantly altered exclusively at the time of recovery in primed plants (V-salt + R-drought) (Figure S1 and Table S3). For this, V-salt + R-drought versus the control was compared with T4R versus V-salt + R-drought. Of the 1,249 exclusive DEGs of the V-salt + R-drought versus control comparison (Figure 6b), 313 common genes were identified at the two collection times for this treatment. Therefore, these 313 genes were recuperative DEGs of primed plants after a second stress event. Thus, it was observed that a group of genes that respond to double stress (V-salt + R-drought) can be recovered; that is, after stress, most of the genes with positive or negative regulation showed opposite regulatory status after rehydration. In contrast, 1,124 genes had a unique differential response after rehydration.

Exclusive transcriptional response from primed plants (V-salt + R-drought)

We used Venn diagrams to identify the genes associated exclusively with memory, an approach similar to that used by Zuther *et al.* (2019). Strategies used by Ding *et al.* (2013, 2014) are not adapted to this study, because the criterion they used for classifying transcriptional memory is that the level of transcription of the response genes in subsequent stresses (S2 and S3), after a period of recovery from the first stress (R1), must be significantly different from the levels of transcription produced during the first stress (S1). This is valid for comparisons within the same stage of development. In our study, S1 is equivalent to the stress applied in the vegetative stage; at this moment, no collections were performed.

Our comparisons (collections) were made only at the reproductive stage. The comparison of all treatments within the same stage of development eliminates additional variability (in this case, the stage of development); thus, one can determine only the transcriptional response associated with the number of exposures to stress.

From the V-salt + R-drought comparison with the control plants, 1,426 DEGs (920 upregulated and 506 downregulated) were identified (Figure 6a). With the data obtained in this comparison, a Venn diagram was constructed, where exclusive genes (1,249 genes) were selected from the comparison of V-salt + R-drought versus the control, excluding possible changes caused by water and saline stress applied to the reproductive and vegetative stages, respectively. In the recovery period, unique genes were identified by filtering the comparison of V-salt + R-drought versus the control (Figure 7b) and T4R versus V-salt + R-drought (Figure 8b–c). Subsequently, the identification of functional groups of genes that responded to cross-stress was performed using MapMan software. The functional score using the MapMan software allowed an overview of the metabolism and cellular functions that were altered, with 1,160 marks displayed of the 1,249 DEGs mapped (Figure 9, Table S4). When comparing T4R versus V-salt + R-drought (Figure 10, Table S5), 1,307 points out of a total of 1,437 mapped DEGs can be viewed. The main altered processes in both comparisons were light reactions, Calvin cycle, tricarboxylic acid cycle (TCA), amino acids, and secondary metabolism. In addition, these functional categories include genes that encode transcription factors (TFs) or proteins involved in protein degradation, metabolism-related proteins (carbohydrates, lipids, and secondary metabolites), hormone signaling, stress response, transport, and regulation, in addition to proteins involved in miscellaneous functions such as detoxification, oxidation-reduction, and antioxidants.

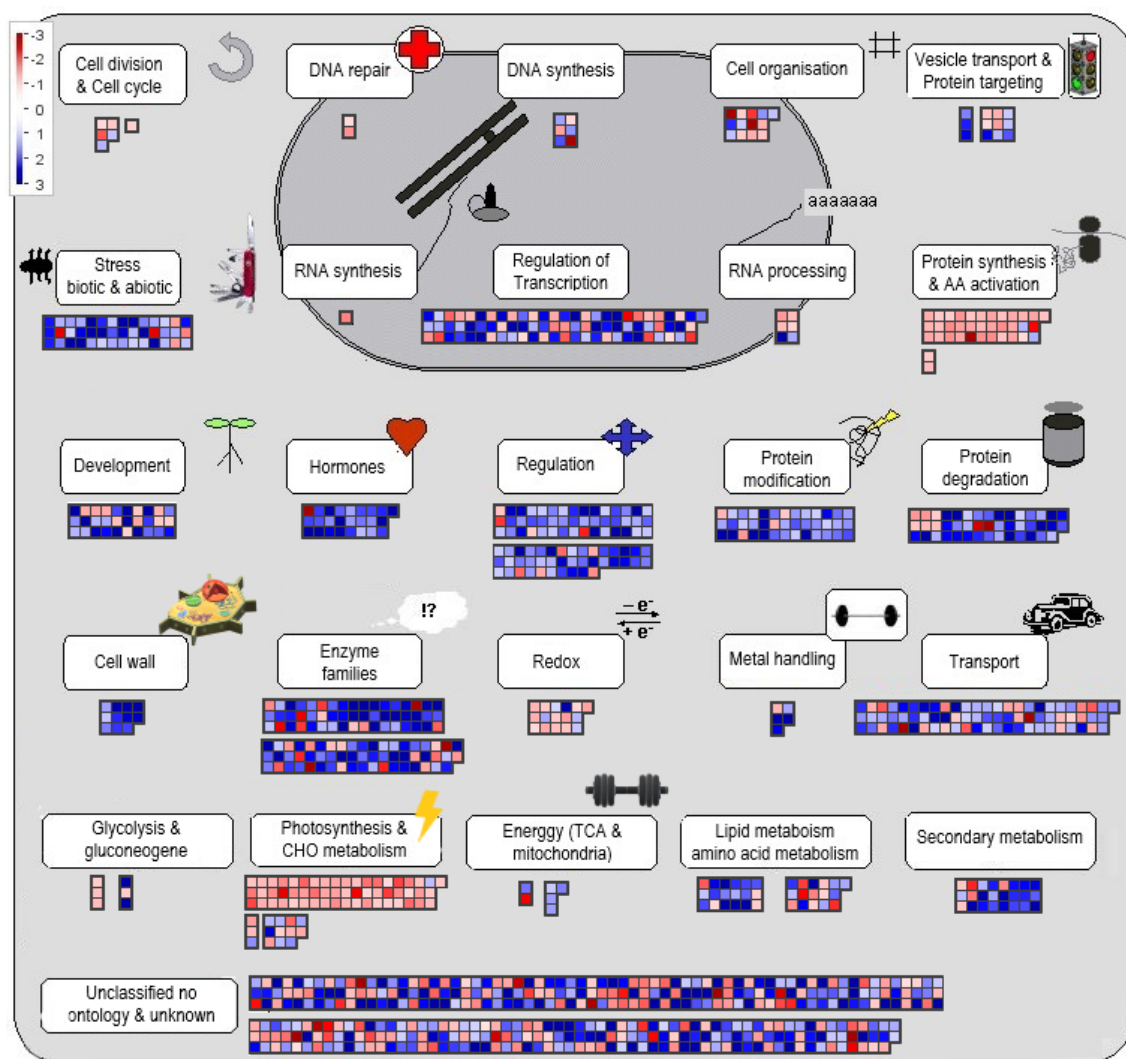


Figure 9. Overview of the altered metabolism and cellular function using the Mapman software for 1,249 exclusive genes of the V-salt + R-drought versus control comparison in rice plants (cv. BRS AG) after 16 days of water stress at the grain filling stage.

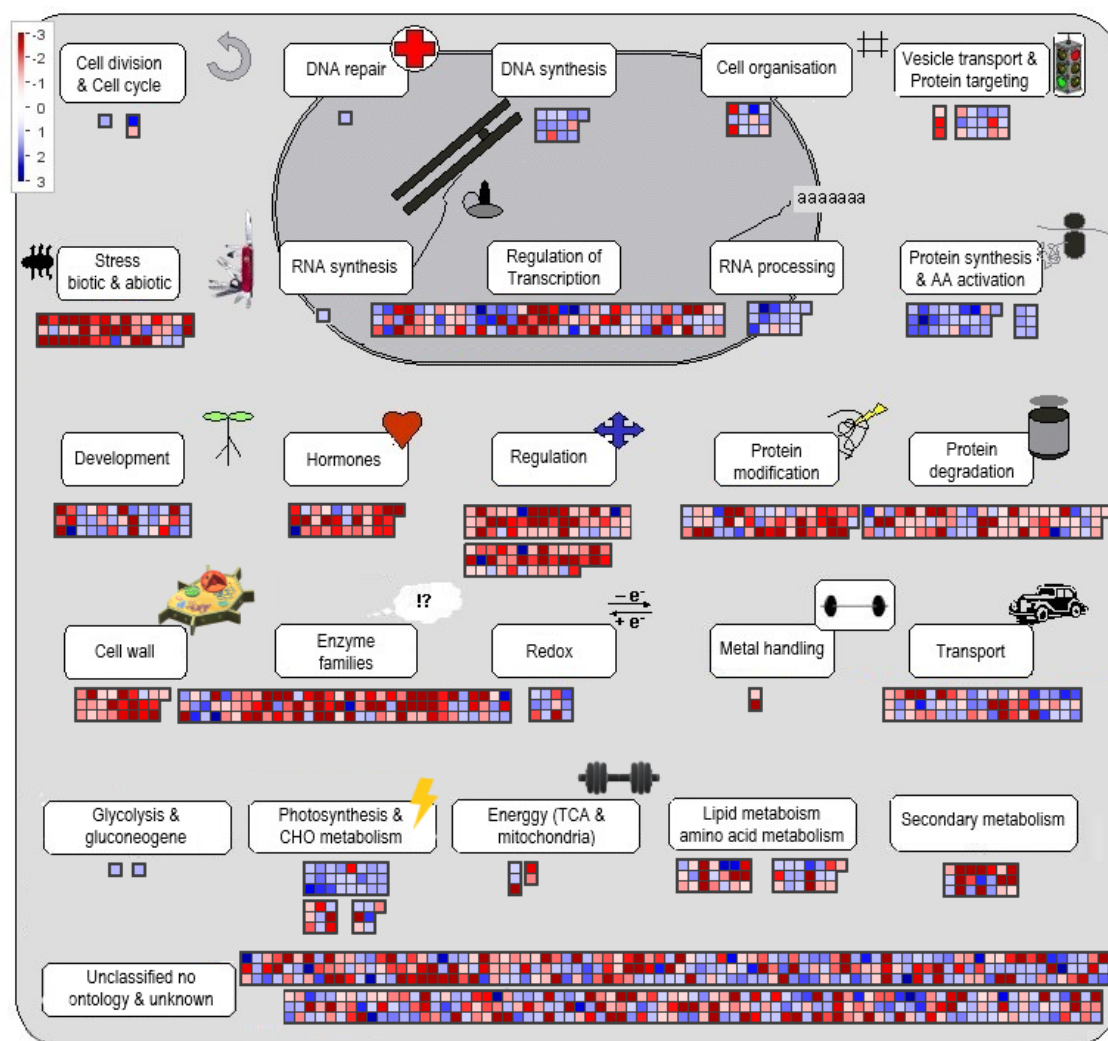


Figure 10. Overview of the altered metabolism and cellular function using the Mapman software for 1,437 exclusive genes of the T4R versus V-salt + R-drought comparison in rice plants (cv. BRS AG) after five days of recovery at the grain filling stage.

In the comparison of V-salt + R-drought versus control after five days of hydration, a total of 55 exclusively altered genes were observed (Figure 7b). The results indicate that the genes highly regulated upwards or downwards were mainly related to transcriptional regulation, enzymatic activity, the synthesis and degradation of proteins, hormones, and transport (Table S6).

A protein–protein interaction (PPI) network was performed using the DEGs of the V-salt + R-drought versus the control and T4R versus V-salt + R-drought comparisons. Considering the values of degree, the highest values were observed for cyclophilin 38 (Os08g0382400) and *peroxiredoxin Q*

(Os06g0196300), with 91 interactions, followed by a protein of unknown function *DUF477* (Os05g0401100) with 86 interactions, *yellow-green leaf 6* (Os12g0420200) with 71 interactions, and *chloroplast ribosomal protein L13* (Os01g0749200) with 68 interactions. Considering the parameter of betweenness centrality, the genes *flavanone 3-hydroxylase 1* (Os04g0662600) and *calmodulin-binding protein* (Os12g0547600) stood out, both with greater values (1.0), and *ACC synthase 5* (Os01g0192900) with a value of 0.58 (Figure S2).

In the comparison of T4R versus V-salt + R-drought, using the 1,437 DEGs, a PPI network with 72 nodes and 132 interactions was built. The *peroxiredoxin Q* gene (Os06g0196300) was the third with the highest number of interactions (degree 90), followed by the *ATP synthase g-chain* (Os07g0513000) and *50S ribosomal protein* (Os02g0137200) genes, both with 89 interactions; however, a low betweenness centrality value (0.03) was identified for the ATP synthase g-chain. The fructose-1,6-bisphosphatase plastidic isoform gene (Os03g0267300) showed 77 interactions. Standing out among the values of betweenness centrality were the gene for the *conserved hypothetical protein* (Os03g0412400) with a value of 1.0, *proteinase inhibitor I20* (Os03g0734300) with a value of 0.66, and the *shikimate kinase 4* gene (Os01g0102600) with a BC value (0.06). However, 73 interactions were present (Figure S3).

Expression of exclusive genes involved in photosynthesis, glycolysis, and tricarboxylic acid

In order to determine whether changes in gene expression regulate the photosynthetic and biochemical metabolism in primed plants (V-salt + R-drought), we investigated the DEGs expressed under these conditions (Figure 9–10, Tables S4, S5, and S6) related to photosynthesis, glycolysis, gluconeogenesis, and the TCA cycle after stress and recovery. After stress, 54 genes related to the light reactions of photosynthesis (photosystem I, photosystem II, plastoquinol–plastocyanin reductase, and ferredoxin-NADP⁺ reductase), ATP synthase, and the Calvin cycle were downregulated. After re-watering, 12 DEGs were upregulated only at this moment (Figure S1, Table S3). Several DEGs responsive to the two stress events of a different nature are involved in carbohydrate

metabolism, including two genes (Os08g0345800 and Os03g0735000) that code for ADP-glucose pyrophosphorylase (*AGPS2* and *AGPL1*), which were suppressed, while the gene (Os11g0175400) from *neutral invertase 6 (NIN6)* was upregulated.

In the recovery period (Figure S1, Table S3), among the six DEGs for starch synthesis, there was the *ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit 3 (AGPL3)*, negatively regulated gene (Os05g0580000), and positively regulated *starch synthase-IIb (Os02g0744700)*. Regarding the genes involved in sucrose degradation, the *neutral invertase 2 (NIN2)* gene (Os01g0332100) was upregulated, and *vacuolar invertase 2 (VIN2)* and *sucrose synthase1 (SUSY1)* (Os03g0401300) were downregulated. In addition, genes such as Os05g0164100 from *fructose-6-phosphate-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase 1 (F6P2K/F26BPase1)*, and Os06g0136600 from *Enolase 5 (ENO5)* involved in glycolysis were negatively regulated after double stress (Figure 9, Table S4). In contrast, *ENO5* was induced by rehydration (Figure 10, Table S5).

Two genes (Os07g0529000 and Os04g0486950) that encode key enzymes in the glyoxylate cycle, transferring the TCA cycle pathway, isocitrate lyase (*ICL*) and malate synthase (*MLS*) were upregulated, while the gene Malate dehydrogenase glyoxysomal (Os03g0773800) was downregulated after stress (Figure 9) and upregulated in recovery (Figure 10). The expression of the *cytosolic NADP malic enzyme 2 (cytME2)* gene (Os05g0186300) increased after drought treatment. After stress, the *beta-carbonic anhydrase 1 (BETACA1)* gene (Os01g0639900) was upregulated, while the gene *alpha-carbonic anhydrase 6 (ALPHACA6)* (Os08g0470200) declined in recovery (Table S6). At the same time, two genes that code for *malate dehydrogenase* (Os05g0574400 and Os08g0562100) and two genes for *mitochondrial electron transport* (Os07g0564500 and Os05g0533800) were upregulated after recovery (Figure S1, Table S3).

Hormones biosynthesis and signal transduction

Absciscic acid is an important phytohormone that regulates plant growth, development, and stress responses. In rice plants subjected to two different

stress events, the DEGs involved in the biosynthesis of this hormone were not identified, which indicates that it was being synthesized in the roots and/or at the time of sampling; thus, the peak of expression of these genes had already occurred.

After rehydration, the Os03g0791200 gene from *aldehyde oxidase 3* (AOX3), which performs the oxidation of abscisic aldehyde, was upregulated (Table S6). Absciscic acid plays an important role in the closure of stoma, and it affects the size of the stomatal pores through the Ca^{2+} -dependent and -independent pathways. Changes in the levels of Ca^{2+} in cells are perceived and translated through proteins called Ca^{2+} sensors. Among the various identified signaling factors, potential Ca^{2+} sensors are the calcium-dependent protein kinases CDPKs, calcineurin B-like protein (CBL), calmodulin (CAM), and calmodulin-like protein, and the Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein kinase. The CBL proteins are also categorized as sensor relay proteins with no enzymatic activity. However, it is considered a bimolecular sensor response when interacting with a family of protein kinases designated as CBL-interacting protein kinases (CIPKs) (Hashimoto and Kudla, 2011). In primed plants (V-salt + R-drought), several genes involved in calcium signaling have been identified. Among the Ca^{2+} sensors that perform this function, the expression of the *CDPK8* gene Os03g0808600 and *CIPK23* gene Os07g0150700 belonging to the family of CIPKs increased after 16 days of stress. At the same time, there was a decrease in the expression of the *CIPK14* gene Os12g0113500 (Figure 9–10, Table S4 and S5). Genes regulated exclusively in recovery were the *CDPK11* gene Os03g0128700 (downregulated) and the upregulated expression of the *CIPK1* and *CIPK10* (Os01g0292200 and Os03g0339900) (Figure S1, Table S3).

Protein phosphatase 2C (PP2CA) enzymes function as co-receptors in ABA signaling. In the primed plants (V-salt + R-drought), the expression of *PP2C73* and *PP2C59* (Figure 9, Table S4) were upregulated after stress and two genes (Os10g0544900 and Os07g0114000) were negatively regulated only after rehydration (Figure S1, Table S3). Among the PP2C downstream enzymes are the sucrose non-fermenting 1 (SNF1) -related protein kinase2 (SnRK2) family of protein kinases that are positive regulators of ABA signal transduction. Here, we identified that the expression of the *SnRK2* gene Os04g0629300 increased under

stress. In addition, ABA-induced genes such as *FIP1* and *HVA22-like* (AtHVA22e) were activated during stress.

Auxin is synthesized from tryptophan. In primed plants (V-salt + R-drought), we identified three upregulated genes that code for enzymes involved in the biosynthesis of this amino acid: shikimate kinase 3 (SK3), enolpyruvylshikimate phosphate synthase (EPSPS), and anthranilate synthase beta subunit 2 (ASB2). These are referred to as early or primary auxin response genes and fall into three major classes (*Aux/IAAs*, *SAURs*, and *GH3s*). The expression of *small auxin-up RNA 26* (*SAUR26*) and *SAUR11* genes (Os06g0671600 and Os02g0643800) increased in stress (Figure 9, Table S4) and declined in recovery. In turn, the expression of the *SAUR17* gene os03g0660500, *Aux/IAA_ARF_ dimerization domain containing* protein gene os04g0653300, and *auxin response factor 17* (*ARF17*) gene Os06g0677800 were upregulated during recovery (Figure 10, Table S5).

After stress, the expression of the *lipoxygenase 2* (*LOX2*) gene (Os08g0508800) increased (Figure 9, Table S4), and the expression of two genes (*LOX8* and *LOX1*) were downregulated after recovery (Figure S1, Table S3). For ethylene, the genes *ACC oxidase 7* (*ACO7*) (Os01g0580500), *ACO5* (Os05g0149400), *ACC synthase 5* (*ACS5*) (Os01g0192900), and *ACS2* (Os04g0578000), which play key roles in ethylene biosynthesis, accumulated during stress, while *ACS2* decreased after rehydration. The same behavior of *ACS2* was observed for genes Os10g0558900 and Os02g0654700, which code for *Rolling-leaf14* (*RL14*) and *ethylene response factor 91* (*ERF91*), respectively. The Os04g0631600 gene from *basic helix-loop-helix protein 068* (*bHLH68*) was upregulated only in plants under stress (Figure 9–10, Tables S4 and S5). Only after rehydration were four ethylene-activated genes found. Among them, the Os05g0149300 gene from *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* and Os04g0546800 from *ethylene response factor 93* (*ERF93*) were downregulated (Figure S1, Table S3).

Genes involved in cell protection and detoxification

Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and peroxidase (POX) are among the enzymatic antioxidant systems that regulate reactive oxygen species

(ROS) homeostasis within organisms. In our study, the expression of *superoxide dismutase 4 (SOD4)* gene (Os08g0561700), *Fe-dependent SOD 1.1 (SOD-Fe)* gene (os06g0115400), *ascorbate peroxidase 8 (APX8)* and *peroxiredoxin Q (PRXQ)* decreased after drought stress, while *SOD4* and *PRXQ* increased after recovery.

Regarding catalase (CAT), *CATB* (Os06g0727200) and *CATA* (Os02g0115700) were upregulated during stress, and the *CATC* gene (Os03g0131200) was upregulated after recovery (Figure 9–10 and Table S3). Several DEGs that code for class III peroxidase exclusive to plants were also identified; among them, the expression of *PRX20*, *PRX135*, *PRX22*, *PRX14*, and *POX8.1* were upregulated after stress (Figure 9; Table S4). During recovery, the *PRX115* and *PRX63* genes (Figure S1; Table S3) and only one *PRX63* upregulated os06g0547400 gene (Table S6) were downregulated. The expression of *phenylalanine ammonia lyase (PAL7)* (Os05g0427400), *PAL1* (Os02g0626100), *PAL08* (Os02g0626400), *chalcone isomerase (CHI)* (Os11g0116300), and *flavanone 3-hydroxylase 1 (F3H1)* (Os04g0662600) were involved in the regulation of primed plants (V-salt + R-drought) under stress. However, a gene encoding chalcone synthase (CHS) and another for flavanone 3-hydroxylase 2 (F3H2) were exclusively downregulated after rehydration (Figure S1, Table S3).

Transcription factors

Among the transcription factors responsive to rice plants exposed to double stress and after rehydration, six *AP2-EREBP* genes were upregulated (except for the gene that codes for the DREB1A), seven *bHLH* genes, 13 C2H2 zinc finger family genes, six heat-shock transcription factor family genes (*HSF*), 24 *MYB/MYB*-related genes, five *bZIP* genes, 14 *WRKY* genes, and the three *NAC* DEGs were exclusively expressed in response to recovery, with two upregulated and one downregulated gene. With the exception of *WRKY*, the rest were generally upregulated at both times (Figure 9–10, Tables S3, S4, S5, and S6).

Real-time quantitative polymerase chain reaction validation

To validate the RNA-seq results, some genes were selected for the RT-qPCR analysis. The correlation between the results was evaluated using the values of the RNA-seq fold change and relative quantification from the RT-qPCR. The high Pearson correlation coefficient ($r = 0.86$) indicated that the RT-qPCR values were similar to those obtained from the RNA-seq, confirming the accuracy and reproducibility of the sequencing results (Figure S4).

DISCUSSION

Recently, accumulated evidence has shown that storing information about a past stress event can benefit plants by preparing them for recurrent or different (crossover) stimuli, a phenomenon associated with plant memory (Freitas Guedes *et al.*, 2019). A proposed memory mechanism involves the accumulation of signaling compounds that can be readily recruited and/or activated in response to a subsequent stress event (Bruce *et al.*, 2007). Changes in hormones, metabolites, sugar signals, ROS, and other signals are induced by priming, which enhance the tolerance of the plants to the succeeding stressors (Wang *et al.*, 2017).

In this study, primed plants (V-salt + R-drought) showed lower EL values compared to non-primed plants (R-drought) submitted to 16 days of water stress (Figure 2a). A lower EL was previously reported in plants doubly stressed with salt, suggesting that previous stress strengthens membrane stability (Hu *et al.*, 2016).

The RWC did not differ between the V-salt + R-drought and R-drought plants (Figure 2b). In addition, the RWC in the leaves of non-primed plants (R-drought) did not recover to control plant levels after five days of recovery. This result suggests that an improved root system in primed plants (V-salt + R-drought) (Table 1) may have contributed to the faster recovery of RWC in the leaves of these plants. Similar results were obtained by Zang *et al.* (2018), in which switchgrass plants (*Panicum virgatum* L.) subjected to successive dehydration cycles showed slower water loss than untrained plants and exhibited RWC values similar to control plants after each recovery period.

Stomatal movements control the CO₂ influx and transpiration, and efforts to reduce water loss via stomatal closure occur at the cost of photosynthesis, growth, and yield (Gupta *et al.*, 2020). After 16 days of water retention, *A*, *g_s*, *WUE*, and *k* were affected by the imposition of stress in both V-salt + R-drought and R-drought conditions, and no change was detected in the *C_i* between the conditions (Figure 3–4). Mild water stress affects leaf photosynthesis due to stomatal limitations, whereas during severe water stress, photosynthesis can be affected by stomatal and non-stomatal limitations. Stomatal limitation is generally driven by reductions in the carboxylation efficiency, reduction of ribulose-1,5-bisphosphate regeneration, or inhibition of Rubisco activase (RCA) (Wang *et al.*, 2014). According to Farquhar and Sharkey (1982), a decrease in the *g_s* and *C_i* means that stomatal limitation is responsible for the decrease in photosynthesis, while a decrease in both photosynthesis and *g_s* rates, but a greater *C_i* would indicate that non-stomatal limitation is inhibiting the assimilation of CO₂. According to the results of this study (in plants prepared under water stress during grain filling), the decrease in *A* and *g_s* without difference in *C_i* may indicate the non-stomatal limitation of photosynthesis.

Photosystem II (PSII) efficiency is measured in leaves adapted to darkness for Fv/Fm and with it, the possible damage to PSII by stress can be quantified (Lawlor and Teraza, 2009). In this study, the Fv/Fm value in non-primed plants (R-drought) was lower than that of the control plants (Figure 3d). Our results agree with studies that reported higher or unchanged values of Fv/Fm in plants exposed to more than a single stress event, and were associated with less photooxidative damage (Abid *et al.*, 2016; Fleta-Soriano *et al.*, 2018).

The expression of exclusively regulated genes in primed plants (Figure 9–12, Table S4 and S5) correlated strongly with the photosynthesis parameters and the Calvin cycle (Figure 3–4). In general, DEGs were negatively regulated after stress and upregulated after recovery (Figure 10), and some genes were regulated exclusively during recovery. Among them, the genes Os12g0274700, Os11g0707000, and Os04g0658300 that code the rubisco small subunit and RCA were downregulated during stress (Figure 9, Table S4). Rubisco activase acts as a chaperone that removes inhibitors from active sites and requires a high ATP/ADP ratio (Lawlor and Tezara, 2009). In this study, the negative regulation of RCA genes, as well as reduced ATP supply, may have contributed to reduced

RCA synthesis and activity, and consequently the loss or reduction of Rubisco activity, resulting in a low k in primed plants (V-salt + R-drought) (Figure 4).

In maize plants under recurrent water stress, it was found that the downregulation of a gene encoding ATP synthase γ subunit, assigned to low enzyme activity, appeared to contribute to the increase in coefficient of energy-dependent quenching (qE), the predominant component of the non-photochemical quenching (NPQ), quenching energy-dependent (Virlouvet *et al.*, 2018). Although more studies are required, such results suggest that the reduction of transcriptionally regulated ATP synthase may be a strategy used by plants to protect PSI and PSII during recurrent stress. These results corroborate those found in this study, where the gene *ATP synthase B* (Os03g0278900) was downregulated during stress (Figure 9, Table S4) and upregulated after recovery (Figure 10, Table S5) and the gene encoding ATP synthase g -chain (Os07g0513000) was induced exclusively in recovery (Figure S1, Table S3). In the analysis of PPI for the comparison of T4R versus V-salt + R-drought, it was possible to observe that ATP synthase g -chain presented a high value of “degree” and was considered a hub and, therefore, important for the processes that can contribute to the cross-tolerance (Figure S3).

However, while low ATP synthase activity can somehow protect plants, the activity of the Rubisco enzyme of the Calvin cycle can be impaired by the reduction in the supply of ATP and NADPH. Here, it was found that the DEGs encoding enzymes in the Calvin cycle were downregulated during stress, which changed to upregulated during the recovery period (Figure 9 and 10, Tables S4 and S5). Fructose-1,6-bisphosphatase plastidial isoform (Os03g0267300) showed 77 interactions in the analysis of PPI during recovery and was positively regulated (Figure 12). The photosynthesis genes and Calvin cycle genes were predominantly induced during recovery, suggesting that photosynthetic activity was resumed (Figure 10, Table S5).

In this study, genes in plants exposed to the V-salt + R-drought condition like *AGPS2* and *AGPL1* involved in starch biosynthesis were downregulated and *NIN6* was upregulated after 16 days of drought (Figure 9, Table S4). During recovery, the *AGPL3*, *VIN2*, and *SUSY1* genes were downregulated, unlike the *NIN2* gene that was upregulated (Figure 10, Table S5). The results at the level of gene transcription indicate that during soil water deficit, the carbon partitioning in

starch is reduced in the leaves of V-salt + R-drought plants, possibly due to the decreased assimilation synthesis associated with the increase in the translocation of sucrose to the roots and grains. Concomitant with the low availability of carbohydrates, the negative regulation of *F26BPase1* and *ENO5* genes (Figure 9, Table S4) showed that glycolysis was affected during grain filling in primed plants (V-salt + R-drought).

However, the results of the transcriptome showed that primed plants (V-salt + R-drought) under severe water stress were able to maintain mitochondrial processes. Among the mitochondrial DEGs, the Os04g0600200 gene, which codes for the alternative oxidase (AOX1A), was positively regulated (Figure 9, Table S4); the increase in AOX1A activity probably plays an important role in decreases ROS production in the mitochondria. Arabidopsis AOX mutants showed high sensitivity to drought, revealing a role for this enzyme in ROS detoxification (Giraud *et al.*, 2008).

Interestingly, we found that the expression levels of the genes encoding ICL, MLS, and cytME2 were highly induced in primed plants (V-salt + R- drought) during stress (Figure 9, Table S4). Isocitrate lyase and MLS are the main enzymes of the glyoxylate cycle, which is the bypass of the TCA cycle (Yuenyong *et al.*, 2019). The function of the glyoxylate cycle is essentially to convert two molecules of acetyl-CoA into succinate, which is transported to the mitochondria where it is converted to malate by the Krebs cycle. Acetyl-CoA can be generated by the β -oxidation or catabolism of some amino acids (Yuenyong *et al.*, 2018). Here, the NADP-malic gene was upregulated, indicating that this malate contributed to the pyruvate pool. After rehydration, *ICL* and *MLC* were not differentially expressed, showing that they were induced by stress and not by leaf senescence, a period when there is greater activation of the glyoxylate cycle (Yuenyong *et al.*, 2019). Meanwhile, the NADP-malic gene was downregulated, possibly due to the supply of pyruvate via glycolysis (Figure 10, Table S5). In addition, two genes encoding mitochondrial malate dehydrogenase (NAD) were induced (Figure 10, Table S5), showing normal functioning of the TCA after recovery (V-salt + R-drought). We believe that primed plants (V-salt + R-drought) used the glyoxylate cycle to modulate the energy balance and to form protective molecules, mainly non-enzymatic antioxidants, similar to the response found in rice plants under salt stress (Yuenyong *et al.*, 2019).

In this study, the higher ABA concentration in the leaves of primed plants (V-salt + R-drought) during stress (Figure 5a) and the absence of DEGs directly involved in the biosynthesis of this metabolite suggests that ABA is synthesized in roots and transported to the leaves through the xylem, acting as a long-distance signaling molecule for cross-stress, consequently contributing to systemic responses to stress throughout the plant. Accordingly, Auler *et al.* (2020) believe that the highest concentration of ABA is associated with the low expression of biosynthesis genes in the rice leaf genotype (upland) under recurrent water stress, indicating that its synthesis occurs at the roots and may be a strategy for better energy management in primed plants. Leaf ABA induced by drought *priming* cooperated with intensified antioxidant enzyme activity, contributing to the improved tolerance to low temperature stress of wheat at the jointing stage (Li *et al.*, 2015). The increase in ABA levels in plants that have undergone cross-stress shows that this metabolite can influence cross-tolerance through gene reprogramming, growth regulation, and antioxidant responses (Li *et al.*, 2015; Neves *et al.*, 2017).

Regardless of the organ, the perception of ABA by pyrabactin resistance/pyrabactin resistance-like (PYR/PYL) leads to inactivation of PP2C/ABI1, which induces the phosphorylation activity of SnRKs (Zelm *et al.*, 2020). The expression of PP2C and SnRKs (Figure 9) were positively regulated after water stress in the prepared plants. The SnRKs, involved in the ABA signaling pathway, are required for priming induced drought tolerance in wheat (Wang *et al.*, 2020). We believe that the high levels of ABA in primed plants contributed to less stomatal opening during stress (Figure 3b). The *CIPK10* and *CDPK11* genes were downregulated and upregulated (Figure 9–10, Tables S4 and S5), respectively, after the concomitant recovery with the opening of the stomata (Figure 3b). The *CDPK8* and *CIPK23* genes (Figure 9, Table S4) were induced by ABA along with other signs to regulate stomatal closure during stress (Cheong *et al.* 2007; Zou *et al.* 2015). Analyzing the PPI network for primed plants (Figure S2), the calmodulin-binding protein (CaMBP) obtained a high BC value, showing that it plays a role in multipath cross-talk when connecting modules within the network.

The ABA concentrations in the leaves of primed plants (V-salt + R-drought) persisted at high levels after the rehydration of the plants (Figure 5a). At the same

time, the *AAO3* gene involved in the final stage of ABA biosynthesis was upregulated during recovery (Table S6). In Arabidopsis, increased levels of ABA and the expression of *NCED3* and differential *AAO3* in guard cells are responsible for the partial opening of stomata in previously stressed plants during the recovery period (Virlouvet, 2015). In rice plants, 24 h recovery was not enough to normalize stoma opening (Auler *et al.*, 2020). Thus, we believe that the high levels of ABA, as well as its leaf biosynthesis during recovery, may have been a strategy used by rice plants immediately after irrigation for the maintenance of partially closed stomata to reduce water loss and prepare plants for future stress.

Although under ideal conditions the role of ABA has been identified as a growth inhibitor, Sharp (2000) found that ABA-deficient tomato plants under irrigation conditions showed decreased leaf growth that was partly attributed to ethylene. It is possible that after rehydration, in the absence of the sign of root dehydration, the V-salt + R-drought plants synthesized ABA in the leaf (Figure 5a, Table S6) to perform various functions, including the regulation of ethylene levels, in order to contribute to the resumption of the growth of these plants after stress. Thus, the negative regulation of most DEGs of ethylene biosynthesis and signaling (Figure 10, Table S5) may be a consequence of ABA biosynthesis in the leaf during rehydration. During stress, an increase in the pH of the xylem sap may be a sign to reduce leaf expansion by ABA-mediated mechanisms (Sharp, 2000).

In this study, a reduction in the fresh and dry mass of the aerial part of non-primed (R-drought) and primed (V-salt + R-drought) plants was observed as a result of the decrease in growth and/or expansion of the leaf area, as there was no difference in the number of leaves between conditions (Table 1). The reduction in growth may still be due to the increase in ethylene after stress, as can be seen in the results of the transcriptome, in which genes involved in the biosynthesis and signaling of this metabolite (*ACO7*, *ACO5*, *ACS5*, *ACS2*, *ERF91*, *RL14*, and *bHLH68*) were induced during stress (Figure 9). In the network analysis, the *ACO5* gene showed a BC value of 0.58, indicating that it plays an important role in connecting modules. Walter *et al.* (2011) showed that severe drought in grasses resulted in the loss of biomass when the plants were challenged by drought for the second time, while a reduction in the leaf area was observed in

sugarcane plants doubly stressed (Marcos *et al.*, 2018). The largest root/shoot ratio in primed plants (V-salt + R-drought) (Table 1) proposes changes in the carbon partitioning and investment in root structures.

The accumulation of ABA was reported to positively affect primary root growth in low water potencies (Sharp, 2004). We believe that in primed plants (V-salt + R-drought) the ABA synthesized in the roots, in addition to contributing to high levels in the leaves (Figure 5a), can induce root growth (Table 1) when interacting with IAA. The transported auxin activates the H⁺-ATPase of the plasma membrane to release more protons at the root tip. This activation is essential to maintain the elongation of the primary root and the development of root hair under water stress (Xu *et al.*, 2012). Interestingly, it has been reported that the IAA levels in leaves did not differ between plants exposed to more than one recurrent water deficit event, and an increase in IAA and ABA in the roots was observed as the number of recurrent drought events increased (Neves *et al.*, 2017). This may explain the absence of an increase in IAA in leaves in our study (Figure 5b), as it acted mainly on the roots. In addition, no significant difference was observed among V-salt + R-drought, R-drought, and the control for fresh and dry root mass (Table 1). However, unlike primed plants (V-salt + R-drought), V-salt plants showed reduced root growth and reduced fresh and dry mass. It was found that high concentrations of NaCl cause excessive ABA accumulation, interrupting the distribution of auxin, which causes the inhibition of lateral root initiation and development (Yu *et al.*, 2020). The lateral roots appear to be more affected by salt stress than the primary roots induced by ABA (Duan *et al.*, 2013). We believe that saline stress in the vegetative stage and the accumulation of ABA may have reduced the growth of V-salt roots.

Here, primed plants (V-salt + R-drought) showed an improved physiological response when compared to plants that experienced a single stress event, either in the vegetative (V-salt) or in the reproductive (R-drought) stages, which is clear evidence that plants can access stored information from past events and use it to improve growth. Incidentally, it is reported that the greater length of roots induced in previously stressed plants exhibited a pattern related to memory (Marcos *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).

In citrus plants, recurrent water deficit gradually decreased the levels of SA in the root, while it increased in the leaves after the second stress (Neves *et*

al., 2017). This is unlike the results of the current study, in which the highest SA values were observed in non-primed plants (Figure 5c), suggesting that the metabolite is responsive to water stress and not to cross-stress.

In the current study, JA levels were higher in V-salt plants, followed by V-salt + R-drought and R-drought. However, the concentration of JA remained relatively stable after rehydration in the primed plants, declining only in V-salt plants (Figure 5d). Unlike what was observed for the ABA concentration, there was no significant increase in JA in primed plants. In rice plants exposed to recurrent water stress, ABA and JA were strongly induced during priming (S1), while the amount of JA decreased after the first stress and remained at a stable level in subsequent stress events; such a hormonal change seems to be a memory response in these plants (Li *et al.*, 2019). Although they have not been analyzed during priming (vegetative stage), we believe that the response of the plants to the first stress was mediated by the increase in both ABA and JA, and that the stable JA levels in the subsequent stress contributed to the differential increase of ABA in V-salt + R-drought plants.

During periods of abiotic stress such as drought and salinity, disturbances in the cellular water potential occur, and consequently increase the ROS that can interfere with the balance between ROS generation and antioxidant defense systems, inducing oxidative stress in plants. In the present study, genes coding for SOD and APX were suppressed in primed plants (V-salt + R-drought) during stress (Figure 9, Table S4), suggesting less accumulation of ROS in these plants. Hu *et al.* (2016) and Amaral *et al.* (2020) showed that plants previously exposed to salt stress accumulated less ROS compared with plants that experienced a single stress event, even with little change in SOD and APX activity (Amaral *et al.*, 2020), which was associated with the effect of priming on a subsequent event.

Class III peroxidases (PRX) can act in the elimination and generation of H₂O₂ in auxin catabolism, suberization, and lignification of the cell wall. Located in the vacuole, cell wall, and cytosol, they eliminate H₂O₂, oxidizing a wide range of plant phenolic components (Shigeto and Tsutsumi, 2015). Several peroxidase genes were induced under stress and recovery in primed plants (Figure 9–10, Tables S4 and S5), pointing to the high activity of this enzyme and the fundamental role it plays in maintaining H₂O₂ levels under cross-stress. Similar to our results, Luckc *et al.* (2020) demonstrated that dry priming had an influence

on the activity of antioxidant enzymes, thereby decreasing the oxidative damage and tolerance to subsequent water stress in the grass *Alopecurus pratensis*. In comparison with the SOD and APX genes, the genes encoding CAT were highly induced during and after stress in V-salt + R-drought (Figure 9–10, Tables S4 and S5). As CAT acts mainly on peroxisomes, its high expression and the possible high activity of this enzyme indicate its role in the elimination of H₂O₂ produced by β -oxidation and the degradation of fatty acids used in the glyoxylate cycle.

In our study, several genes involved in flavonoid biosynthesis were induced during stress and repressed after recovery, indicating a high demand or consumption of this phenol by plants. In the analysis of the PPI network for the comparison of V-salt + R-drought (Figure S2), *F3H* obtained a high degree of intermediation (1.0), showing that it is indispensable for communication between modules, connecting enzymes such as chalcone isomerase, cytochrome P450 75A11, and UDP-glycosyltransferase, thus contributing to the diversification of the flavonoid biosynthesis pathway.

Recently, some studies have shown the involvement of flavonoids in cross-tolerance in plants, acting as antioxidants, and regulatory and signaling molecules (Chen and Raji, 2020). Most of the MYB genes in plants are found to encode proteins of the R2R3 MYB class, and several of these proteins are involved in defense responses to stress, including the biosynthesis of specialized metabolites such as flavonoids and anthocyanins. These TFs that regulate the biosynthesis of flavonoids are controlled by the redox potential and hormones, including ABA. Redox control is crucial in the regulation of MYB proteins, as any abnormalities can influence the DNA binding properties of these transcription factors. Several lines of evidence have shown that MYB proteins participate in the cross-talk between different signaling pathways under stress conditions for imparting cross-tolerance (Chen and Raji, 2020). Interestingly, in our study, two genes encoding the R2R3 MYB class were upregulated after stress in V-salt + R-drought versus the control (Figure 9, Table S4) and downregulated during recovery in the T4R versus V-salt + R-drought comparison (Figure 10, Table S5). Our results suggest that the transcription factor R2R3 MYB and ABA are involved in the regulation and probable increase of flavonoids in primed plants (V-salt + R-drought). The role of flavonoids associated with peroxidases was shown by Lukić

et al. (2020) in doubly stressed grass plants, in which phenolic components decreased at the same time as the peroxidase activity increased, indicating that phenols were consumed in the reaction of peroxidase.

Belonging to a group of proteins with regulatory functions in signal transduction and gene expression, TFs are upregulated or downregulated by protein kinases or phosphatases, hormones, stress salt, and drought, among others, and bind to cis-elements of stress-related genes to enhance or suppress their transcription (Baillio *et al.*, 2019). In this study, families of activated and suppressed TFs under conditions of water deficit and recovery in primed plants included *bZIP*, *NAC*, *MYB/MYC*, *AP2-EREBP*, *C2H2*, and *WRKY* (Figure 9–10, Tables S4 and S5). Most of these transcription factors regulate the expression of drought and salt tolerance genes (Chen *et al.*, 2020; Yon *et al.*, 2020), including hormone signaling and synthesis genes. In *Arabidopsis*, Liu *et al.* (2016) demonstrated that MYC2 exhibits a +/- memory pattern, and the JA signaling mediated by this TF plays a crucial role in drought memory formation. This TF seems to regulate ABA and JA levels in previously stressed plants, and is responsible for the increase in ABA from the second stress event in some plants (Liu *et al.*, 2016; Zang *et al.*, 2018). The explanation for MYC2 transcription patterns [+/-] was suggested by Avramova (2018), who suggested that the memory expression of JA-associated genes in response to dehydration stresses is regulated by TF-based mechanisms, rather than by an epigenetic (histone modification) mechanism. The TFs involved in the transcriptional memory of dehydration in switchgrass were revealed by Zhang *et al.* (2018) and in *Arabidopsis* by Ding *et al.* (2013, 2014). Therefore, the memory responses of the primed plants are possibly a reflection of the transcriptional behavior of these different TFs, but more studies are required to provide such evidence.

In conclusion, the results showed that under water stress during the grain filling stage, the plants that underwent previous saline stress (*priming*) in the vegetative stage showed less electrolyte leakage, less damage to the photosynthetic apparatus (Fv/Fm), and greater root growth, which possibly contributed to the recovery of RWC in the leaves after stress. In addition, the increase in ABA in the leaf was closely related to the above physiological responses and the association with JA and IAA can be a regulating factor in the long-term stress memory of rice. The annotation of specific cross-tolerance genes

indicated the involvement of the signaling and synthesis of hormones, photosynthesis, stomatal conductance, enzymatic and non-enzymatic antioxidant system, glyoxylate cycle and transcription factors (Figure S5), which deserve further study, as well as the regulatory proteins found in the networks. With that, the primed plant seems further change its response pattern to regulate a network of genes that differs from that involved in a non-primed plant. In addition, it was found that in response to cross-stress, plants use a set of genes at the time of stress that differ from the genes used in the recovery period. These results corroborate our hypothesis that priming with salt in the vegetative stage mitigates the effects of water stress during the reproductive stage at transcriptional, physiological, and hormonal levels.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material and treatment

The experiment was conducted using rice seeds, cv. BRS AG, from the Estação Experimental Terras Baixas (Embrapa - Clima Temperado, Brazil). The seeds were disinfected with 1% hypochlorite and germinated on germitest paper in rolls, maintained in a BOD growth chamber with a 16 h light photoperiod and 8 h of dark at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 10 days. The seedlings were transferred to plastic pots (8 L), which were perforated at the base and kept on trays. The substrate was sand that had been previously washed with water and 1% hydrochloric acid. The plants were kept in a greenhouse and irrigation occurred daily, alternating between water and the nutrient solution of Yoshida *et al.* (1976) until reaching the vegetative stage V5 (five fully expanded leaves), where the salt stress was imposed.

At this stage, the plants were separated into two groups. The first group of plants received pre-treatments with saline stress by adding 150 mM NaCl (17.10 dS m^{-1}) to the nutrient solution for four days. After this period, the plants remained under normal irrigation, alternating between the water and nutrient solution, and kept under the same conditions as the second group (control) until the reapplication of the stress in the reproductive stage.

In the reproductive stage R7–R8 (grain-filling), the plants were again divided into two groups, one of which was exposed to water deficit (corresponding to the second stress event), while the other group experienced normal irrigation. For the drought event, irrigation was suspended for a period of 16 days, representing severe drought and monitored with a porometer.

At the end of this period, all experimental conditions were measured, the plants were rehydrated for five days, and a new collection period was carried out (recovery), as shown in Figure 1. The second group remained under irrigation with water and the nutrient solution throughout the reproductive stage. Therefore, the four experimental conditions were as follows: control: irrigation with nutrient solution and water throughout the plant cycle; V-salt: pre-treatment with salt in the vegetative stage and without water deficit in the reproductive stage; R-drought: without pre-treatment in the vegetative stage and with water deficit in the reproductive stage (non-primed plants); V-salt + R-drought: pre-treatment in the vegetative stage with salt and water deficit in the reproductive stage (primed plants).

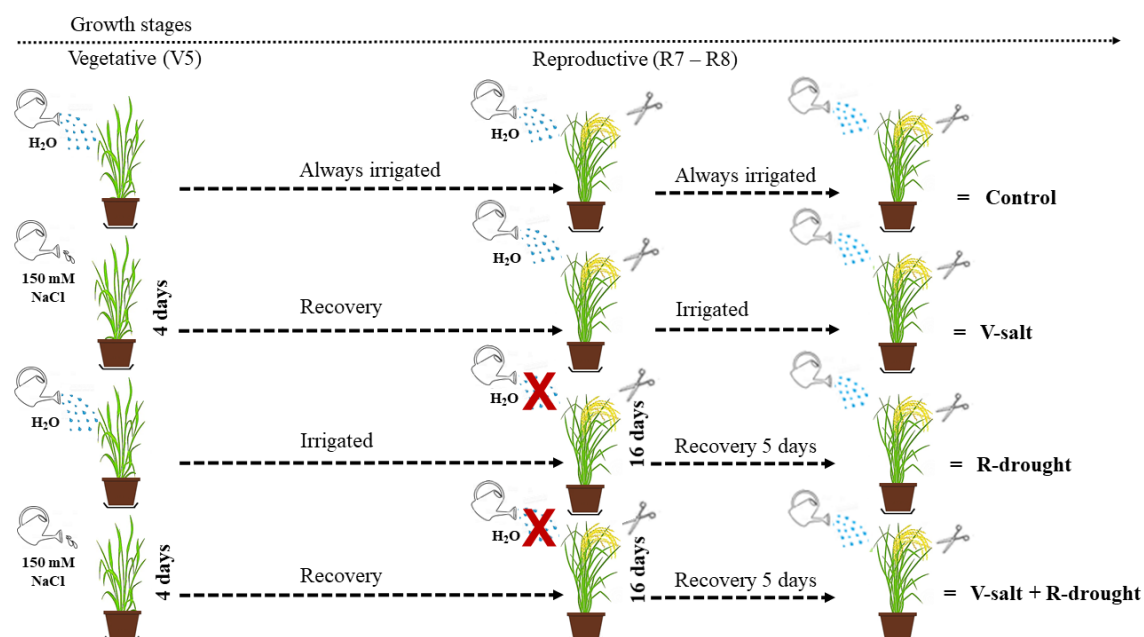


Figure 1. Scheme showing the experimental design that constituted the four conditions to which rice plants cv. BRS AG were submitted: Control: irrigation with nutrient solution and water throughout the plant cycle; V-salt: pre-treatment with salt (nutrient solution + 150 mM NaCl) in V5 for four days and without water deficit in R7–R8; R-drought: without pre-treatment in V5 and with water deficit only in R7–R8 for 16 days; V-salt + R-drought: pre-treatment with salt in the

vegetative stage (V5) (nutrient solution + 150 mM NaCl) for four days and water deficit in the reproductive stage (R7–R8) for 16 days. Phenological stage V5: collar formation on the fifth leaf; reproductive stage R7–R8: grain-filling. The scissors indicate the moment when the leaves were collected.

Experimental design and statistical analyses

The experimental design was completely randomized with four experimental conditions (control, V-salt, R-drought and V-salt + R-drought) and two collection times (4×2).

The collections were carried out in R7–R8 at the end of 16 days of water deficit and after five days of recovery. After the complete maturation of the grains (in R9), the third collection was carried out. Collections were made from different plants, that is, we used 16 pots for each collection. The experiment was carried out with four biological replicates per treatment, with each experimental unit represented by a pot containing four plants, totaling 48 pots.

The data were subjected to an analysis of variance (ANOVA) with a significance level of $P \leq 0.05$, and means were compared by the Tukey *post-hoc* test at 5% probability, using the statistical software SAS 9.3 (SAS Institute Inc.).

Physiological Parameters

Gas exchange and photochemistry were measured in fully expanded leaves using a portable infrared gas analyzer (LI-6400XT; LI-COR™, Lincoln, NE, USA) and a modulated fluorometer (6400–40 LCF, LICOR, Lincoln, NE, USA). The measurements were performed between 10:00 h and 13:00 h under the photon flux density of photosynthetically active $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and an air CO_2 concentration of $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$. We measured leaf CO_2 assimilation (A), stomatal conductance (g_s), intercellular CO_2 concentration (C_i), transpiration (E), water use efficiency ($WUE = A/E$) and the instantaneous carboxylation efficiency ($k = A/C_i$). Chlorophyll fluorescence was measured simultaneously to gas exchange, for which leaf tissues were adapted to the dark (30 min), and the potential quantum efficiency of photosystem II (F_v/F_m) was estimated.

The leaf relative water content (RWC) was calculated according to Smart and Bingham (1974), and Electrolyte Leakage (EL) of the cells was measured according Lutts *et al.* (1995).

At the end of the experiment (in the R9 stage) the length of the aerial part (cm) was measured using a millimeter ruler, considering the starting point, neck region, and the insertion of the last leaf, as well as the number of leaves, root length (cm), and fresh mass of shoots and roots (g). The dry mass of the aerial parts and the root system were recorded after drying in an oven at 60 °C for 72 h. The root/aerial part ratio (R/Pa) was calculated as the dry mass of the root divided by the dry mass of the aerial part of each plant (Poorter and Nagel, 2000).

Measurement of the plant hormones jasmonic acid, abscisic acid, auxin, and salicylic acid

Leaves were collected, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until lyophilization. Plant hormone extraction was carried out as previously described by Carrasco-Loba and Pollmann (2017). Before analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry, samples were derivatized by adding 20 µl of a mix consisting of 220 µl of acetone: methanol (9:1, v/v), 27 µl of diethyl ether, and 3 µl of a (trimethylsilyl) diazomethane solution (2.0 M in diethyl ether), and were then rested for 30 min at room temperature. The settings for the gas chromatograph and the mass spectrometer were as described previously (Carrasco-Loba and Pollmann, 2017). The selected precursor ions and corresponding diagnostic product ions are listed in Table S1. The amount of endogenous hormone concentration was calculated from the signal ratio of the unlabeled over the stable isotope-containing mass fragment observed in the parallel measurements.

RNA extraction and construction of RNA-seq libraries

Total RNA was extracted from 100 mg of leaves as described by Oñate-Sánchez and Vivente-Carbajosa (2008). The degradation and contamination of RNA were monitored on 1% agarose gels. The RNA purity was checked using the NanoPhotometer® spectrophotometer (IMPLEN, CA, USA) and the RNA

integrity and quantitation were assessed using the RNA Nano 6000 Assay Kit of the Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies, CA, USA). The libraries were prepared with the NEBNext® Ultra TM kit for Illumina® (NEB, USA), the quality of the libraries was evaluated on an Agilent 2100 BioAnalyzer® (Agilent Technologies™), and the library fragments were purified with the AMPure XP system (Beckman Coulter, Beverly, USA). The libraries were sequenced using paired-end 3 × 150 bp reads, ≥ 20 M reads sequencing depth, performed on the HiSeq 2500® platform (Illumina™). The sequencing was performed by Novogene.

Bioinformatics analyses

Raw data (raw reads) of the FASTQ format were first processed through in-house scripts. In this step, clean data (clean reads) were obtained by removing reads containing adapter and poly-N sequences and reads with low quality from the raw data. At the same time, the Q20, Q30, and GC content of the clean data were calculated. All the downstream analyses were based on high-quality clean data. The reads were mapped against *Oryza sativa* cv. Nipponbare (IRGSP build 1.0) from the MSU Rice Genome Annotation Project (RGAP 7) database using HISAT2 software (Kim *et al.* 2019). The HTSeq Ver. 0.11.1 software (Anders, 2010) was used to count mapped reads.

The differential expression analysis between the two conditions/groups (three biological replicates per condition) was performed using the DESeq2 R package. The resulting P values were adjusted using Benjamini and Hochberg's (1995) approach to adjust for multiple testing (false discovery rate, FDR). Genes with an adjusted P value ≤ 0.05 found by DESeq2 were assigned as significantly. The cutoff for differentially expressed genes (DEGs) was set at a false discovery rate ≤ 0.05, and an absolute log₂FC of ≤ -1 and ≥ 1.

After detecting the DEGs, they were subjected to functional annotation analysis using MapMan Ver. 3.5.1.R2 software (Thimm *et al.*, 2004) to visualize general changes in metabolism and cellular functions related to stress. The functional relationships and protein-protein interactions between the DEGs of each condition were extracted from the STRING Ver. 10 databases for *O. sativa*, and the networks were built in Cytoscape Ver. 3.7.1 (Shannon *et al.* 2013) for the

different conditions. The parameters were the degree of interaction (“*degree*”), which measures the number of interactions of the node with other nodes, and degree of intermediation, “*BetweennessCentrality*” (BC), measuring the degree of intermediation of the node for two communities (modules).

Reverse transcription and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

Reverse transcription was performed from 1 µg of total RNA using the iScript™ Reverse Transcription Supermix for the reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) kit (BioRad, Hercules, CA, USA). The RT-qPCR was performed using BioRad CFX and the GoTaq® qPCR Master Mix kit (Promega, Madison, WI, USA) containing BRYT Green® Dye fluorophore. The RT-qPCR was performed using the following parameters: 95°C for 10 min; 40 cycles at 95°C for 15 s; and 60°C for 1 min, with a melting curve insertion at 65–95 °C and an increase of 0.5°C each cycle. The relative quantitation of expression for each gene was obtained using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001), and the *UBC2E* and *GAPDH* genes were used as reference genes (Rossatto *et al.* 2021). The primers used in the RT-qPCR reactions are listed in Table S2.

REFERENCES

- Abid, M., Tian, Z., Ata-ul-Karim, S.T., Liu, Y., Cui, Y., Zahoor, R., Jiang, D. and Dai, T. (2016) Improved tolerance to post-anthesis drought stress by pre-drought priming at vegetative stages in drought-tolerant and -sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol. Biochem.* **106**, 218–227.
- Agarwal, P.K., Shukla, P.S., Gupta, K. and Jha, B. (2013) Bioengineering for Salinity Tolerance in Plants: State of the Art. *Molecular Biotech.* **54**, 102–123.
- Amaral, M.N do., Auler, P.A., Rossatto, T., Barros, M.P.M., Oliveira, M. and Braga E.J.B. (2020a) Long-term somatic memory of salinity unveiled from physiological, biochemical and epigenetic responses in two contrasting rice genotypes. *Physiology Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/ppl.13149>.
- Amaral, M.N do., Willian, P.L., Auler, P.A., Rossatto, T., Milech, C., Magalhães, A.M. and Braga, E.J.B. (2020b) Long-term transcriptional

memory in rice plants submitted to salt shock. *Planta*, **251**(111).
<https://doi.org/10.1007/s00425-020-03397-z>.

- Anders, S.** (2010). HTSeq: Analysing high-throughput sequencing data with Python. (HTSeq)
- Auler, P.A., Amaral, M.N., Rossatto, T., Crizel, R.L., Milech, C., Chaves, F.C. and Souza G.M., Braga, E.J.B.** (2020) Metabolism of abscisic acid in two contrasting rice genotypes submitted to recurrent water déficit. *Physiologia Plantarum*. **0**: 0–0.
- Avramova, Z.** (2015) Transcriptional ‘memory’ of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *The Plant Journal*. **83**, 149–159.
- Avramova, Z.** (2018) Defence-related priming and responses to recurring drought: Two manifestations of plant transcriptional memory mediated by the ABA and JA signalling pathways. *Plant Cell Environ*. **42**, 983–997.
- Baillo, E.H., Kimotho, R.N., Zhang, Z. and Xu, P.** (2019) Transcription Factors Associated with Abiotic and Biotic Stress Tolerance and Their Potential for Crops Improvement. *Genes*. **10**(771). Doi:10.3390/genes10100771.
- Bäurle, I.** (2017) Can't remember to forget you: Chromatin-based priming of somatic stress responses. *Semin Cell Dev Bio*. **83**, 133–139.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y** (1995) Controlling the false Discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing, Journal of the royal statistical Society. *Series B Methodological*. **57**, 289-300.
- Bruce, T.J.A., Matthes, M.C., Napier, J.A. and Pickett, J.A.** (2007) Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Sci*. **173**, 603–608.
- Carrasco Loba, V. and Pollmann, S.** (2017) Highly sensitive salicylic acid quantification in milligram amounts of plant tissue. *Meth. Mol. Biol*. **1497**, 221-229.
- Chaves, M.M., Flexas, J. and Pinheiro, C.** (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. **103**, 551–560.
- Chen, Y., Li, C., Yi, J., Yang, Y., Lei, C. and Gong, M.** (2020) Transcriptome Response to Drought, Rehydration and Re-Dehydration in Potato. *Int. J. Mol. Sci*. **21**, 159.
- Chen, Z. and Raji, M.** (2020) Role of reactive oxygen species in modulating cross tolerance in plants via flavonoids. In *Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants*. Elsevier Inc, pp. 203-214.

- Cheong, Y.H., Pandey, G.K., Grant, J.J., Batistic, O., Li L., Kim, B.G., Lee S.C., Kudla, J. and Luan, S.** (2007) Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant J.* **52**(2), 223–239.
- Crisp, P.A., Ganguly, D., Eichten, S.R. et al.** (2016) Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Sci Adv.* DOI: 10.1126/sciadv.1501340
- Ding, Y., Fromm, M. and Avramova, Z.** (2012) Multiple exposures to drought ‘train’ transcriptional responses in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* **3**(740). DOI: 10.1038/ncomms1732.
- Ding, Y., Liu, N., Virilouvet, L., Riethoven, J.J., Fromm, M. and Avramova, Z.** (2013) Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* **13**(229). <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/13/229>.
- Ding, Y., Virilouvet, L., Liu N., Riethoven J.J., Fromm M. and Avramova Z.** (2014) Dehydration stress memory genes of *Zea mays*: comparison with *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* **14**(141). <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/14/141>.
- Dinneny, J.R.** (2019) Developmental Responses to Water and Salinity in Root Systems. *Annual Review of Cell and Developmental Biology. Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **35**, 239–57.
- Duan, L., Dietrich, D., N.C.H. et al.** (2013) Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell.* **25**, 324–341.
- Farquhar, G.D. and Sharkey, T.D.** (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, **33**, 317–345.
- Fleta-Soriano, E. and Munné-Bosch, S.** (2018) Stress memory and the inevitable effects of drought: a physiological perspective. *Front Plant Sci.* **7**(143). Doi: 10.3389/fpls.2016.00143.
- Fleta-Soriano, E., Pintó-Marijuan, M. and Munné-Bosch, S.** (2015) Evidence of drought stress memory in the facultative CAM, *Aptenia cordifolia*: Possible role of phytohormones. *PloS One.* **10**(8): e0135391. doi:10.1371/journal.pone.0135391.
- Freitas Guedes, A de., Alves-Ferreira, M., Menezes-Silva, P.E. and DaMatta, F.A.** (2019) Using transcriptomics to assess plant stress memory. *Theor. Exp. Plant Physiol.* **31**, 47–58.
- Friedrich, T., Faivre, L., Bäurle, I. and Schubert, D.** (2018) Chromatin-based mechanisms of temperature memory in plants. *Plant Cell Environ.* **42**, 762–770.

- Ganie, S.A., Molla, K.A., Henry, R.J., Bhat, K.V. and Mondal, T.K.** (2019) Advances in understanding salt tolerance in rice. *Theoretical and Applied Genetics* <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03301-8>.
- Giraud, E., Ho, L.H., Clifton, R., Carroll, A., Estavillo, G., Tan, Y.F., Howell, K.A., Ivanova A., Pogson, B.J. and Millar, A.H.** (2008) The absence of alternative oxidase1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiol.* **147**, 595–610.
- Gupta, A., Rico-Medina, A. and Caño-Delgado, A.I.** (2020) The physiology of plant responses to drought. *Science*. **368**, 266–269.
- Hashimoto, K. and Kudla, J.** (2011) Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie*. **93**(12), 2054– 2059.
- Hu, T., Jin, Y., Li H., Amombo, E. and Fu, J.** (2016) Stress memory induced transcriptional and metabolic changes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in response to salt stress. *Physiol Plant* **156**, 54–69.
- Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A. K. and Khurana, J. P.** (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. **345**, 646-651.
- Kim, D., Paggi, J.M., Park, C. et al.** (2019) Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol.* **37**, 907–915.
- Kumar, A. and Dash, P.K.** (2019) Transcriptome Analysis for Abiotic Stresses in Rice (*Oryza sativa* L.) Chapter, April 2019 DOI: 10.5772/intechopen.84955 National Institute of Plant Genome Research.
- Larcher, W.** (2000) Ecologia vegetal, São Carlos: RiMa Artes e Textos, p. 531.
- Lawlor, D.W. and Tezara, W.** (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany*. **103**, 561–579.
- Li, P., Yang, H., Wang, L., Liu, H., Huo, H., Zhang, C., Liu, A., Zhu, A., Hu, J., Lin Y. and Liu, L.** (2019) Physiological and Transcriptome Analyses Reveal Short-Term Responses and Formation of Memory Under Drought Stress in Rice. *Front Genet*, **10**(55). Doi: 10.3389/fgene.2019.00055.
- Li, X., Cai, J., Liu, F., Dai, T., Cao, W. and Jiang, D.** (2014b) Physiological, proteomic and transcriptional responses of wheat to combination of drought or waterlogging with late spring low temperature. *Funct. Plant Biol.* **41**, 690.

- Li X., Topbjerg, H.B., Jiang, D. and Liu, F.** (2015) Drought priming at vegetative stage improves the antioxidant capacity and photosynthesis performance of wheat exposed to a shortterm low temperature stress at jointing stage. *Plant and Soil*. **393**, 307–318.
- Liu, N, Staswick, P.E, and Avramova, Z.** (2016) Memory responses of jasmonic acid-associated *Arabidopsis* genes to a repeated dehydration stress. *Plant Cell Environ.* **39**, 2515–2529.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*. **25**, 402–408.
- Lukić, N., Biljana, K., Plavšić, D., Hasanagić, D. and Walter, J.** (2020) Plant stress memory is linked to high levels of anti-oxidative enzymes over several weeks. *Environ. Exp. Bot.* **178**, 104-166.
- Lutts, S., Kinet, J.M. and Bouharmont, J.** (1995) Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *J Exp. Bot.* **46**, 1843–1852.
- Marcos, F.C.C., Silveira, N.M., Marchiori, P.E.R., Machado, E.C., Souza, G.M., Landell M.G.A. et al.** (2018) Drought tolerance of sugarcane propagules is improved when origin material faces water deficit. *PLoS ONE*, **13**(12).
- Maszkowska, J., Debski, J., Kulik, A., Kistowski, M., Bucholc, M., Lichocka, M. and Dobrowolska, G.** (2018). Phosphoproteomic analysis reveals that dehydrins ERD10 and ERD14 are phosphorylated by SNF1-related protein kinase 2.10 in response to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment*. **42**, 931–946.
- Mohanta, T.K., Bashir, T., Hashem, A., Abd_Allah, E.F., Khan, A.L. and Al-Harrasi, A.S.** (2018) Early Events in Plant Abiotic Stress Signaling: Interplay Between Calcium, Reactive Oxygen Species and Phytohormones. *J. Plant Growth Regul.* **37**, 1033–1049.
- Munns, R. and Gilliham, M.** (2015) Salinity tolerance of crops - what is the cost? *New Phytol*, **208**, 668–673.
- Neves, D.M., Almeida, L.A.D.H., Santana-Vieira, D.D.S. et al.** (2017) Recurrent water deficit causes epigenetic and hormonal changes in citrus plants. *Sci Rep*, **7**, 1–11.
- Oñate-Sánchez, L. and Vicente-Carbajosa, J.** (2008) DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes*, **1**(93). doi:10.1186/1756-0500-1-93.
- Pandey, P., Srivastava, S., Pandey, A.K. and Dubey, R.S.** (2020) Abiotic-stress tolerance in plants-system biology approach. In *Plant Life under Changing Environment*, pp. 577-609. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818204-8.00025-4>.
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J. and Flors, V.** (2012) Primed plants do not forget. *Environ Exp Bot.* **94**, 46-56.

- Poorter, H. and Nagel, O.** (2000) The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Aust. J. Plant Physiol.* **27**, 595-607.
- Rossatto, T., Auler, A.P., Amaral, N.M., Milech, C., Magalhães Júnior, A.M. and Braga, E.J.B.** (2021) Selection of reference genes for RT-qPCR studies in different tissues of rice cultivar BRS AG submitted to recurrent saline stress. *Russian journal of plant physiology*.
- Sade, N., Del Mar, Rubio-Wilhelmi, M., Umnajkitikorn, K. and Blumwald, E.** (2017) Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **69**, 845–853.
- Sánchez-Barrena. M.J., Martinez-Ripoll, M. and Albert, A.** (2018) Structural Biology of Salt and Drought Tolerance in Plants. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0027628.
- Schwachtje, J., Whitcomb, S.J., Firmino, A.A.P., Zuther, E., Hinch, D.K. and Kopka, J.** (2019) Induced, Imprinted, and Primed Responses to Changing Environments: Does Metabolism Store and Process Information? *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00106>.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B. and Ideker, T.** (2013) Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504.
- Sharp, R.E., LeNoble, M.E., Else, M.A., Thorne, E.T. and Gherardi, F.** (2000) Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *J. Exp. Bot.* **51**, 1575–1584.
- Sharp, R.E., Poroyko, V., Hejlek, L.G. et al.** (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *J. Exp. Bot.* **55**, 2343–2351.
- Shigeto, J. and Tsutsumi, Y.** (2016) Research review Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *New Phytol.* **209**, 1395–1402.
- Smart, R.E. and Bingham, G.E.** (1974) Rapid Estimates of Relative Water Content. *Plant Physiology.* **53**(2), 258–260.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y. and Stitt, M.** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* **37**, 914-39.
- Upadhyaya, H. and Panda, S.K.** (2019) Drought Stress Responses and Its Management in Rice. In *Advances in Rice Research for Abiotic Stress Tolerance*, pp. 177-200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814332-2.00009-5>.
- Vighi, I.L., Benitez, L.C., Amaral, M.N., Moraes, G.P., Auler, P.A., Rodrigues, G.S., Deuner, S., Maia, L.C. and Braga, E.J.B.** (2017) Functional

characterization of the antioxidant enzymes in rice plants exposed to salinity stress. *Biol. Plant.* **61**, 1–11.

- Virilouvet, L. and Fromm, M.** (2015). Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. *New Phytol.* **205**, 596–607.
- Virilouvet, L., Avenson, T.J., Du, Q., Zhang, C., Liu, N., Fromm, M., Avramova, Z. and Russo, S.E.** (2018) Dehydration Stress Memory: Gene Networks Linked to Physiological Responses During Repeated Stresses of *Zea mays*. *Front. Plant Sci.* **9**, 1-17.
- Vokkaliga T., Govind G.H., Kalladan R., Sreenivasulu N. and Hong C.Y.** (2018) Cross-Protection by Oxidative Stress: Improving Tolerance to Abiotic Stresses Including Salinity. In *Salinity Responses and Tolerance in Plants*, Kumar et al. (eds.), p. 283-305.
- Walter, J., Nagy, L., Hein, R. et al.** (2011) Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. *Environ Exp Bot.* **71**, 34–40.
- Wang, X., Mao, Z., Zhang, J., Hemat, M., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T. and Jiang, D.** (2019) Osmolyte accumulation plays important roles in the drought priming induced tolerance to post-anthesis drought stress in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ. Exp. Bot.* **166**. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103804>.
- Wang, X., Vignjevic, M., Liu, F., Jacobsen, S., Jiang, D. and Wollenweber, B.** (2015) Drought priming at vegetative growth stages improves tolerance to drought and heat stresses occurring during grain filling in spring wheat. *Plant Growth Regul.* **75**, 677–687.
- Wang, X., Vignjevic, M., Jiang, D., Jacobsen, S. and Wollenweber, B.** (2014) Improved tolerance to drought stress after anthesis due to priming before anthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) var. Vinjett. *J Exp. Bot.* **65**(22), 6441–6456.
- Wang, X., Zhang, J., Song, J., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T. and Jiang, D.** (2020) Absciscic acid and hydrogen peroxide are involved in drought priming-induced drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biology*. <https://doi.org/10.1111/plb.13143>.
- Wojtyla, L., Paluch-Lubawa, E., and Garnczarska, N.M.** (2020) Drought stress memory and subsequent drought stress tolerance in plants. In *Priming-Mediated Stress and Cross-Stress Tolerance in Crop Plants*, Academic Press, pp. 115-131.
- Xu, W., Jia, L., Shi, W., Liang, J., Zhou, F., Li, Q. and Zhang, J.** (2013) Absciscic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress. *New Phyto.* **197**, 139–150.
- Yoon, Y., Seo, D.H., Shin, H., Kim, H.J., Kim, X.M. and Jang, G.** (2020) The Role of Stress-Responsive Transcription Factors in Modulating Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Agronomy*. **10**, 788.

- Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H. and Gomez, K.A.** (1976) Laboratory manual for physiological studies of rice. 3rd edition. International Rice Research Institutes, Manila, *Philippines*, p. 61.
- Yu, Z., Duan, X., Luo, L., Dal, S., Ding, Z. and Xia, G.** (2020) How Plant Hormones Mediate Salt Stress Responses. *Trends Plants Sci.* **25**(11), 1117-1130.
- Yuenyong, W., Sirikantaramas, S., Qu, L.J. and Buaboocha, T.** (2019) Isocitrate lyase plays important roles in plant salt tolerance. *BMC Plant Biology*, **19**(472). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2086-2>
- Yuenyong, W., Chinpongpanich, A., Comai, L., Chadchawan, S. and Buaboocha, T.** (2018) Downstream components of the calmodulin signaling pathway in the rice salt stress response revealed by transcriptome profiling and target identification. *BMC Plant Biology*. **18**(335). <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1538-4>.
- Zelm, E.V., Zhang, Y. and Testerink, C.** (2020) Salt Tolerance Mechanisms of Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **71**(24), 1–24.
- Zhang, C., Peng, X., Guo, X., Tang, G., Sun, F., Liu, S. and Xi, Y.** (2018) Transcriptional and physiological data reveal the dehydration memory behavior in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Biotechnol Biofuels*. **11**(91), 1-22.
- Zou, J.J., Li, X.D., Ratnasekera, D., Wang, C., Liu, W.X., Song, L.F., Zhang, W.Z. and Wu, W.H.** (2015) *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase8 and catalase3 function in abscisic acid mediated signaling and H₂O₂ homeostasis in stomatal guard cells under drought stress. *The Plant Cell*. **27**, 1445–1460. ‘
- Zuther, E., Schaarschmidt, S., Fischer, A., Erban, A., Pagter, M., Mubeen, U., Giavalisco A., Joachim K., Sprenger H. and Hinch, D.K.** (2019) Molecular signatures associated with increased freezing tolerance due to low temperature memory in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* **42**, 854-873.

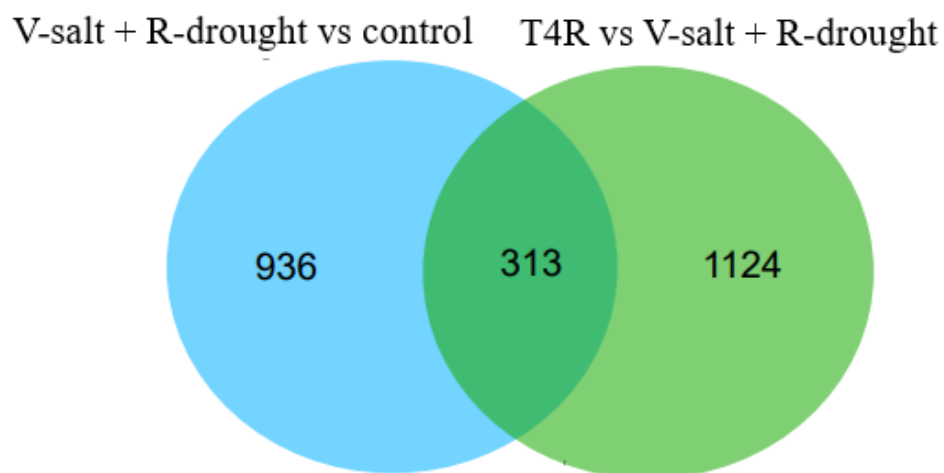
Supporting Information

Figure S1. Venn diagram showing the distribution of exclusive differentially expressed genes at the time of recovery.

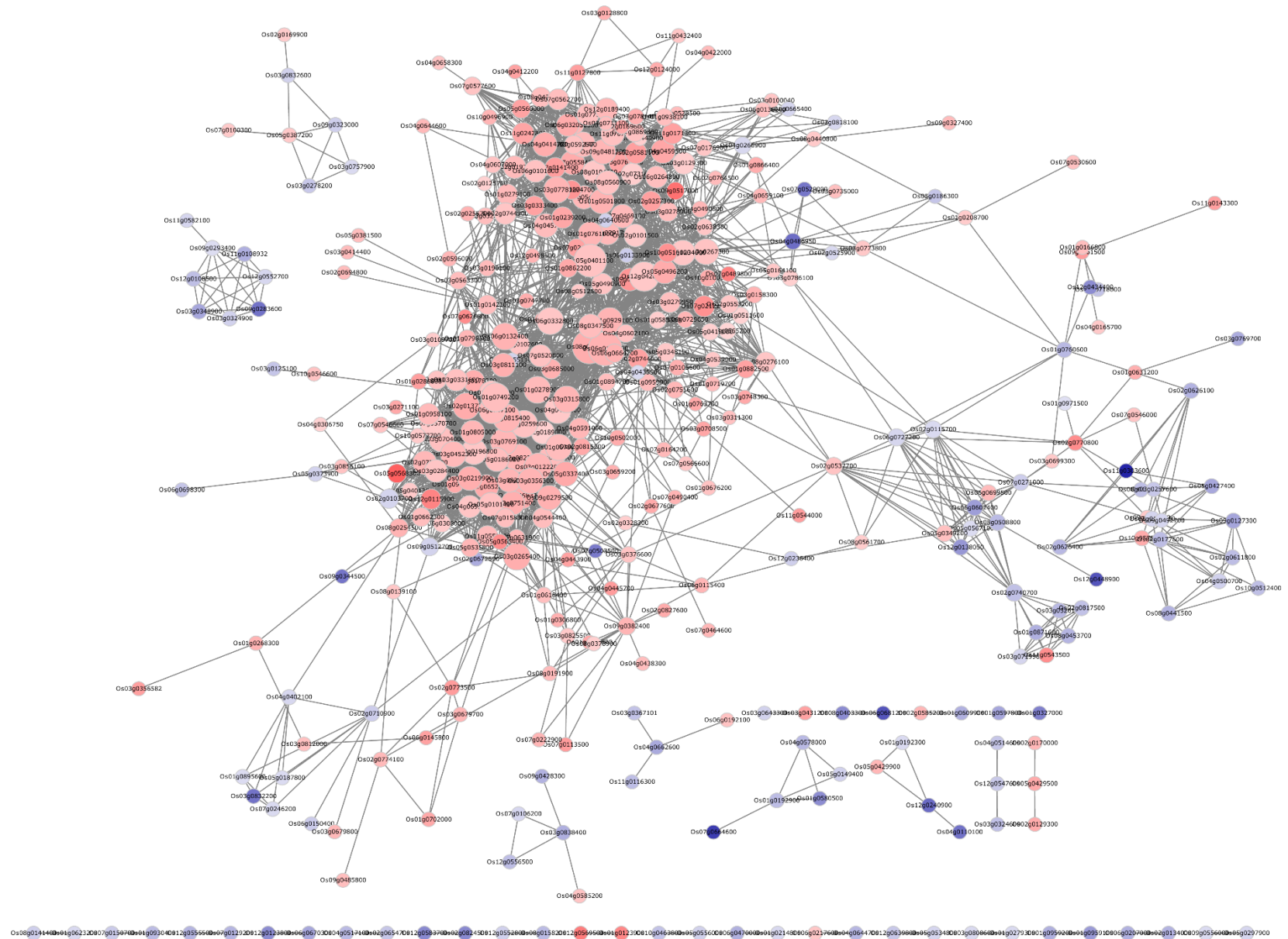


Figure S2. Graphical visualization of the generated protein-protein interaction network (PPI) including proteins encoded by differentially expressed genes in rice plants (cv. BRS AG) subjected to saline stress in the vegetative stage and water stress in the grain filling stage (primed plants) after 16 days of water stress. Nodes (circles) represent proteins, while straight lines represent known or inferred interactions. The network was built with 1,249 exclusive genes from the V-salt + R-drought versus control comparison.

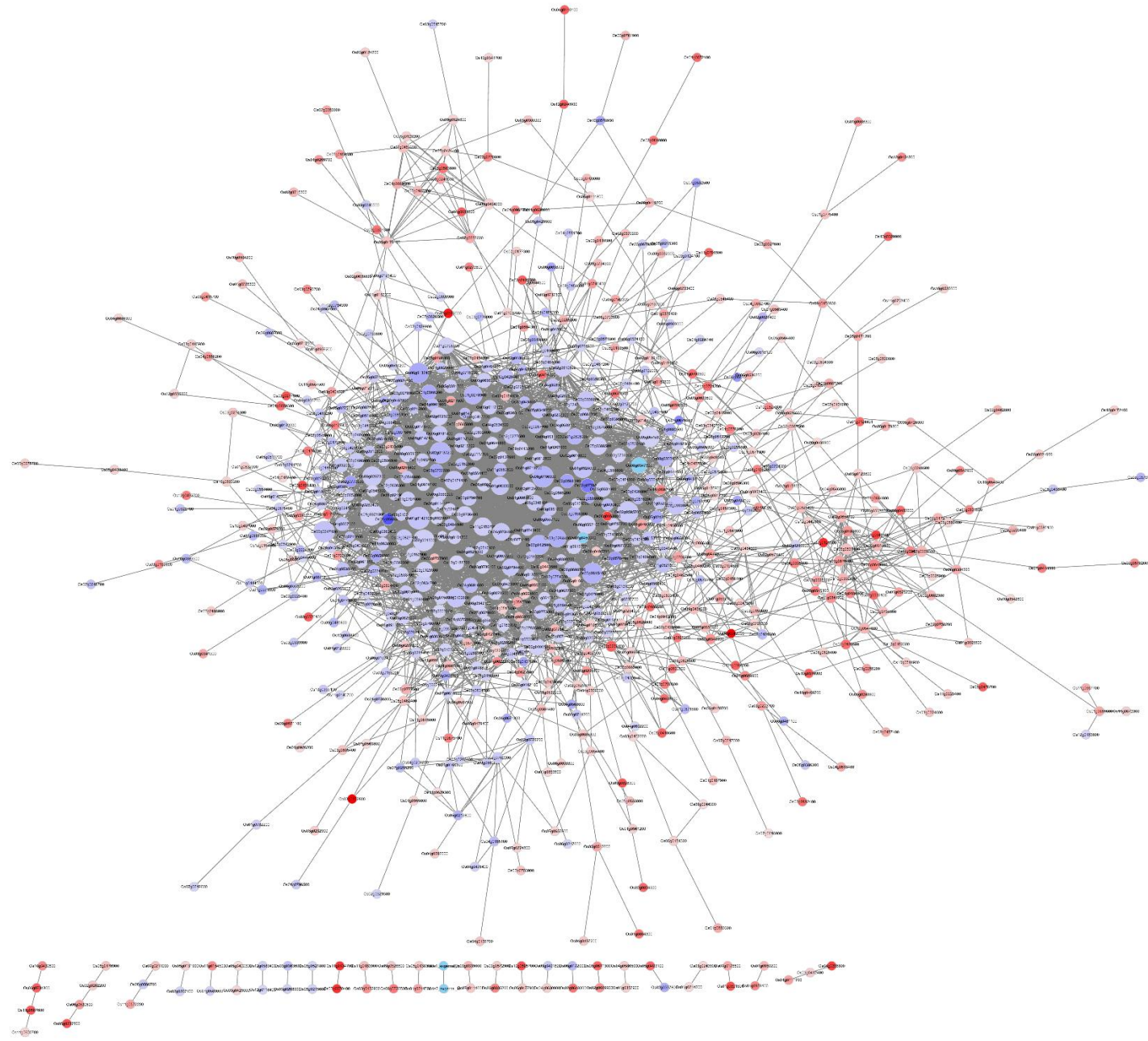


Figure S3. Graphical visualization of the generated protein-protein interaction network (PPI) including proteins encoded by differentially expressed genes in rice plants (cv. BRS AG) subjected to saline stress in the vegetative stage and water stress in the stage of grain filling stage (primed plants) after five days of recovery. Nodes (circles) represent proteins, while straight lines represent known or inferred interactions. The network was built with 1,437 exclusive genes from the T4R versus V-salt + R-drought comparison.

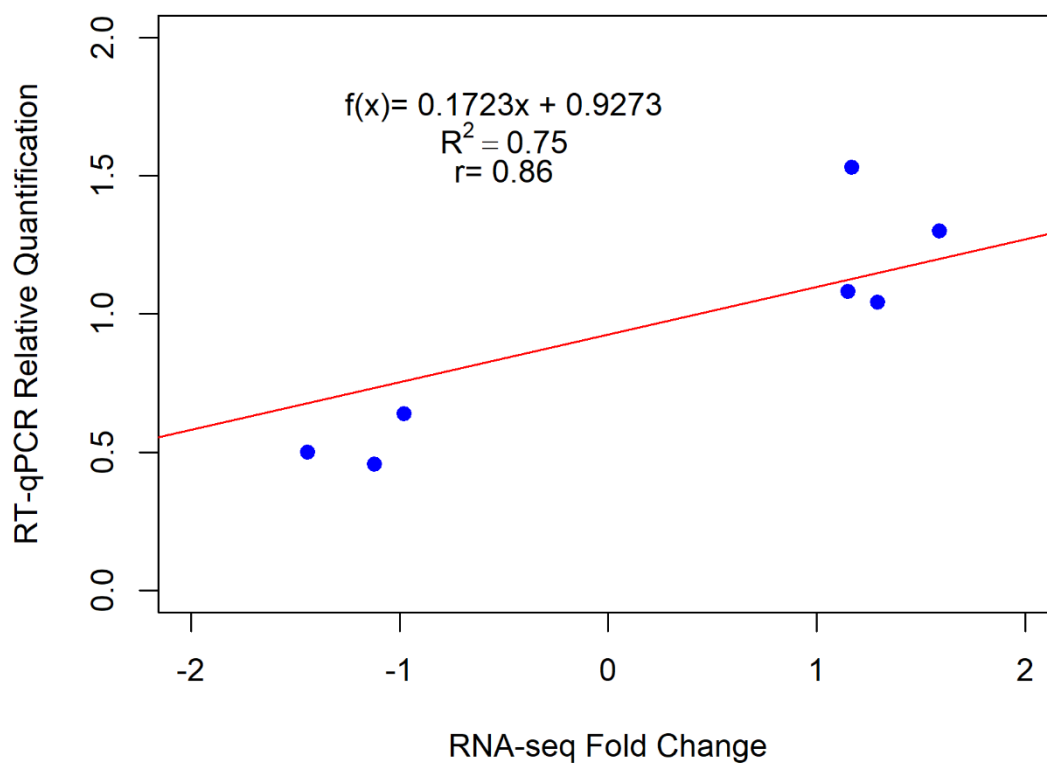


Figure S4. Correlation between the Log₂FC and the relative quantification of the data obtained by RNA-seq and RT-qPCR, respectively.

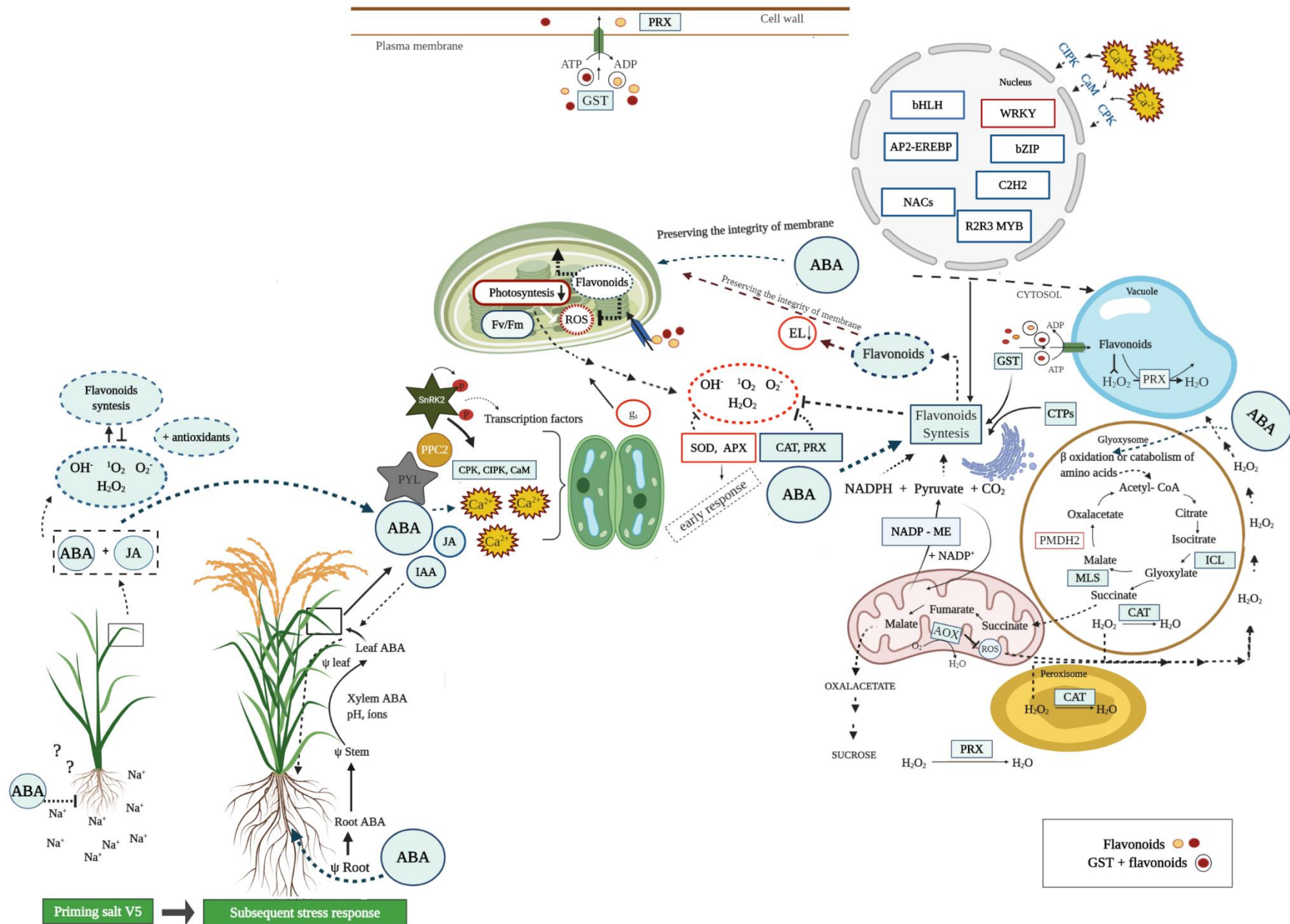


Figure S5. Routes planned to regulate the memory response to cross-stress (primed plants: V-salt + R-drought). Based on the results of this study, we believe that the responses of plants to the first stress salt V5 were mediated by the increase of both abscisic acid (ABA) and jasmonic acid (JA) acids and that the stable levels of JA in the subsequent stress contributed to the increase of ABA. In the subsequent stress event (water deficit) we believe that ABA was synthesized in the roots and transported to the aerial part where, together with JA, auxin (IAA), and high calcium levels (Ca^{2+}), it participated in the transcriptional reprogramming that contributed to improved membrane stability, better photoprotection, reduced stomatal conductance, alteration in the enzymatic antioxidant system, biosynthesis and regulation of flavonoids, and the glyoxylate cycle. Through the transcriptional results, we believe that an increase in flavonoids in these plants may have contributed to better membrane stability and less reactive oxygen species. In addition, the memory responses of the prepared plants are possibly a reflection of the transcriptional behavior of different transcription factors found in the nucleus that are capable of regulating different metabolism pathways. Primed plants showed an increase in root growth possibly due to increased ABA in the roots and the transport of IAA to this organ. Dotted lines indicate possible but not confirmed routes. Solid lines represent the routes that have been demonstrated in previous studies. Blue represents positive regulation and red represents negative regulation; boxes show the result of expression and circles show quantification/activity.

Table S1. Characteristic precursor and product ions used for the detection of indole-3-acetic acid, methylated jasmonic, salicylic acid and abscisic acid.

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
MeIAA	189	130
	130	103
[² H ₂]-MeIAA	191	132
	132	103
MeJA	151	108
	224	151
[² H ₅]-MeJA	154	111
	229	154
MeSA	152	120
	120	91
[² H ₄]-MeSA	156	124
	124	95
MeABA	162	133
	134	90
[² H ₆]-MeABA	168	139
	140	90

Table S2. Primers used for RT-qPCR.

Gene	Accession/Id	Primer F	Primer R	Reference
<i>SOD-Fe</i>	AK111656.1	5'CAAGTCACAAACCCAGAGTCAT 3'	5'GGAATACAAGATGTCAGGCTCA3'	Vighi et al. 2017
<i>SOD4-Cu/Zn</i>	Os08g0561700	5'GCACCAGAAGATGAAGTCCGT3'	5'CGAATGCTCTCCCAACAACAG3'	Vighi et al. 2017
<i>CATA</i>	AK065094.1	5'GTGAAGATTGCGAATAGGCTC3'	5'TCTGGCCTTATTTGGTTGGT3'	Vighi et al. 2017
<i>CATB</i>	AK100019.1	5'GACAAGGAGAACAATTTCCAACAG3'	5'AGTAGGAGATCCAGATGCCAC3'	Vighi et al. 2017
<i>CATC</i>	AK066378.1	5'GTGATTGCCAAGGAGAACAAC3'	5'GAGTGCGTCGATCCATCTCT3'	Vighi et al. 2017
<i>APX8</i>	AK100016.1	5'AAGGATGGGCATGTGAATGG3'	5'TGAGCCATGACAACTAGATAATGT3'	Vighi et al. 2017
<i>NIN2</i>	Os01g0332100	5'GTAGCTCCGGTGGATTCAGG3'	5'TGCAGTATGCCCTCAGCAA3'	-
<i>VIN2</i>	Os02g0106100	5'CTCAAAGGCAAGCAGAGGGT3'	5'AGAGTTTTTCAGTTGCTTACGTGT3'	-
<i>UBC-E2</i>	AK059694	5'CCGTTTGTAGAGCCATAATTGCA3'	5'AGGTTGCCTGAGTCACAGTTAAGTG3'	Jain et al. (2006)

Table S3. Differentially expressed genes exclusive at the time of recovery.

Gene ID	Annotation	Log ₂ FC
os08g0359000	OS	1.13
os02g0578400	PS.lightreaction.photosystem II.PSII polypeptide subunits	2.55
os12g0420400	PS.lightreaction.photosystem I.PSI polypeptide subunits	1.60
os01g0966200	PS.lightreaction.cytochrome b6/f	2.22
os07g0513000	PS.lightreaction.ATP synthase.gamma chain	1.22
os03g0102100	PS.photorespiration	1.05
os07g0152900	PS.photorespiration.glycolate oxydase	1.11
os04g0623500	PS.photorespiration.glycolate oxydase	-2.43
os08g0502700	PS.photorespiration.aminotransferases peroxisomal	1.10
os12g0291400	PS.calvin cycle.rubisco small subunit	1.88
os06g0608700	PS.calvin cycle.aldolase	1.48
os05g0587200	PS.calvin cycle.rubisco interacting	1.37
Os04g0517400	major CHO metabolism.synthesis.starch	-1.14
Os04g0553800	major CHO metabolism.synthesis.starch	-1.17
Os02g0624400	major CHO metabolism.synthesis.starch	-1.96
Os05g0580000	major CHO metabolism.synthesis.starch.AGPase	-2.48
Os02g0744700	major CHO metabolism.synthesis.starch.starch synthase	1.35
Os06g0367100	major CHO metabolism.synthesis.starch.starch branching	1.16
Os01g0332100	major CHO metabolism.degradation.sucrose.invertases.neutral	1.17
Os02g0106100	major CHO metabolism.degradation.sucrose.invertases.vacuolar	-5.10
Os03g0401300	major CHO metabolism.degradation.sucrose.Susy	-2.55
Os12g0555400	minor CHO metabolism.raffinose family.raffinose synthases.putative	1.11
Os04g0458600	minor CHO metabolism.others	-3.98
Os08g0566400	minor CHO metabolism.others	1.18
Os04g0568600	minor CHO metabolism.others	2.18

Os07g0409200	minor CHO metabolism.sugar kinases	1.10
Os10g0492900	minor CHO metabolism.galactose.alpha-galactosidases	-1.68
Os05g0574400	TCA/org. transformation.TCA.malate DH	1.00
Os08g0562100	TCA/org. transformation.other organic acid transformaitons.cyt MDH	1.14
Os08g0470200	TCA/org. transformation.carbonic anhydrases	-3.56
Os07g0564500	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.NADH-DH.type II.internal matrix	-2.59
Os05g0533800	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.	-1.70
Os12g0158600	hormone metabolism.abscisic acid.synthesis-degradation	-2.34
Os01g0746400	hormone metabolism.abscisic acid.synthesis-degradation	-2.78
Os03g0187500	hormone metabolism.auxin.signal transduction	1.06
Os03g0194600	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	-1.66
Os05g0437200	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	-1.14
Os04g0338000	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	-0.87
Os01g0895200	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	-3.67
Os05g0149300	hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation	-2.34
Os02g0280700	hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation	1.10
Os03g0860600	hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation	1.26
Os10g0536400	hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation	-2.06
Os04g0546800	hormone metabolism.ethylene.signal transduction	-1.39
Os01g0209700	hormone metabolism.gibberelin.synthesis-degradation.GA2 oxidase	-2.70
Os08g0509100	hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation.lipoxygenase	-2.26
Os03g0700700	hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation.lipoxygenase	-2.35
Os06g0242000	hormone metabolism.salicylic acid.synthesis-degradation	-7.36
Os05g0577500	signalling.calcium	-3.66
Os03g0128700	signalling.calcium	-1.22
Os01g0292200	protein.postranslational modification	1.14
Os10g0544900	protein.postranslational modification	-1.20
Os03g0339900	protein.postranslational modification	1.40

Os07g0114000	protein.postranslational modification	-1.39
Os11g0530600	secondary metabolism.flavonoids.chalcones	-3.62
Os03g0131200	redox.dismutases and catalases	1.31
Os07g0677600	misc.peroxidases	-3.80
Os04g0688600	misc.peroxidases	-4.53
Os04g0178400	misc.cytochrome P450	-3.28
Os05g0405600	misc.cytochrome P450	-1.01
Os10g0515400	misc.cytochrome P450	-3.37
Os10g0515200	misc.cytochrome P450	-0.95
Os06g0671300	misc.cytochrome P450	-4.24
Os02g0108800	misc.cytochrome P450	-1.36
Os04g0469800	misc.cytochrome P450	1.15
Os10g0139700	misc.cytochrome P450	-2.52
Os10g0439800	misc.cytochrome P450	-3.12
Os01g0628900	misc.cytochrome P450	-1.43
Os01g0728300	misc.cytochrome P450	-1.78
Os05g0536250	RNA.regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2	-1.99
Os01g0224100	RNA.regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2	2.03
Os07g0617000	RNA.regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2	-1.83
Os07g0628500	RNA.regulation of transcription.bHLH,Basic Helix-Loop-Helix family	1.56
Os10g0376900	RNA.regulation of transcription.bHLH,Basic Helix-Loop-Helix family	-4.40
Os03g0180800	RNA.regulation of transcription.C2C2(Zn) CO-like, Constans-like zinc finger family	-2.85
Os04g0395800	RNA.regulation of transcription.C2C2(Zn) CO-like, Constans-like zinc finger family	-3.33
Os10g0392400	RNA.regulation of transcription.C2C2(Zn) CO-like, Constans-like zinc finger family	-1.93
Os06g0571800	RNA.regulation of transcription.C2C2(Zn) GATA transcription factor family	1.65
Os02g0572900	RNA.regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	-1.62
Os09g0526600	RNA.regulation of transcription.HSF,Heat-shock transcription factor family	-1.26
Os03g0795200	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	1.42

Os08g0450900	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	3.11
Os07g0172600	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	1.64
Os08g0138600	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	1.04
Os03g0635000	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	2.04
Os01g0695900	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	-3.99
Os04g0602600	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	1.68
Os08g0515700	RNA.regulation of transcription.NAC domain transcription factor family	1.86
Os09g0493400	RNA.regulation of transcription.NAC domain transcription factor family	-2.87
Os06g0158100	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-2.01
Os05g0478700	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-4.63
Os02g0462800	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-2.02
Os02g0770500	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-4.46
Os06g0649000	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-3.34
Os05g0537100	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.71
Os05g0474800	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-2.47
Os01g0826400	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.68
Os10g0566200	RNA.regulation of transcription.bZIP transcription factor family	2.33
Os08g0176900	RNA.regulation of transcription.bZIP transcription factor family	-1.67

Table S4. Exclusive genes (1,249 genes) from the comparison of V-salt + R-drought versus the control in rice plants (cv. BRS AG) after 16 days of water stress at the grain-filling stage.

Table S5. Unique genes (1,437 genes) from the T4R versus V-salt + R-drought comparison in rice plants (cv. BRS AG) after five days of recovery at the grain-filling stage.

Table S6. Genes ID, annotation, functional category and Log₂FC of DEGs of plants rice cv. BRS AG unique to of the comparison V-salt + R-drought vs control after rehydration (recovery collection). The functional category was extracted from MapMan analysis using the list of DEGs that show Log₂FC ≥ 1 or ≤ -1 and q-value < 0.05 .

Gene ID	Annotation	Functional Category	Log ₂ FC
Os01g0847700	Aldo-keto reductase 2	minor CHO metabolism	2.06
Os01g0591000	3-Chloroallyl aldehyde dehydrogenase	fermentation	1.28
Os10g0578950	4-coumaroyl-CoA synthase family protein	secondary metabolism	1.41
Os06g0567200	L-ascorbate oxidase precursor	secondary metabolism	1.66
Os03g0791200	ALDO3_ORYSA Probable aldehyde oxidase 3	hormone metabolism	3.02
Os05g0355400	Universal stress protein (USP) family protein	hormone metabolism	-3.48
Os11g0702100	Acidic endochitinase	stress.biotic	4.54
Os11g0528500	Rubredoxin family protein, putative, expressed	redox	1.19
Os06g0567200	L-ascorbate oxidase precursor	redox	1.66
Os10g0144700	C76A1_SOLME Cytochrome P450 76A1	misc.cytochrome P450	-2.96
Os05g0515200	C71A4_SOLME Cytochrome P450 71A4	misc.cytochrome P450	1.33
Os02g0817900	C97B2_SOYBN Cytochrome P450 97B2	misc.cytochrome P450	1.19
Os06g0547400	PERP7_BRARA Peroxidase P7	misc.peroxidases	5.40
Os02g0148000	CCT motif family protein, expressed	RNA.regulation of transcription	1.62
Os01g0274800	MYB105 (myb domain protein 105)	RNA.regulation of transcription	2.81
Os05g0442400	Myb family transcription factor	RNA.regulation of transcription	4.11
Os05g0474800	WRKY70, expressed	RNA.regulation of transcription	-1.94

Os01g0826400	WRKY24, expressed	RNA.regulation of transcription	-1.97
Os03g0851000	Nascent polypeptide-associated complex (NAC)	RNA.regulation of transcription	1.01
Os06g0717400	Pseudouridine synthase family protein, putative, expressed	protein.aa activation	1.06
Os01g0962600	40S ribosomal protein S10, putative, expressed	protein.synthesis	1.37
Os01g0812800	60S ribosomal protein L30 (RPL30B)	protein.synthesis	1.27
Os07g0523300	60S ribosomal protein L36a/L44 (RPL36aB)	protein.synthesis	3.46
Os02g0529700	60S acidic ribosomal protein, putative, expressed	protein.synthesis	1.43
Os07g0114000	Protein phosphatase 2C, putative, expressed	protein.postranslational	-1.50
Os03g0429000	Cysteine proteinase inhibitor 8 precursor, putative, expressed	protein.degradation	-1.15
Os06g0192800	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	protein.degradation	-2.16
Os01g0711200	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	signalling	2.02
Os05g0472000	DUF640 domain containing protein, putative, expressed	signalling	-2.75
Os01g0188900	Ankyrin repeat domain-containing protein 28, putative, expressed	cell.organisation	1.29
Os09g0382300	Cyclin_N protein cyclin, putative, expressed	cell.cycle	1.49
Os07g0615000	Protein PPR repeat domain containing protein, putative, expressed	development	1.08
Os05g0275000	Pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	development	1.18
Os04g0460300	Transmembrane amino acid transporter protein, putative, expressed	transport	1.99
Os03g0150600	Sugar_tr protein inorganic phosphate transporter, putative, expressed	transport	-1.45
Os08g0455900	Ctr protein ctr copper transporter family protein, putative, expressed	transport	-1.61
Os03g0626700	MATE efflux family protein	transport	2.02
Os08g0412500	UPF0041 domain containing protein, putative, expressed	not assigned.unknown	-1.97
Os10g0116400	Protein expressed protein	not assigned.unknown	1.36
Os02g0585200	Protein heavy metal associated domain containing protein, expressed	not assigned.unknown	-1.80
Os12g0261300	Protein expressed protein	not assigned.unknown	-1.90
Os09g0438100	Protein expressed protein	not assigned.unknown	2.27
Os02g0674233	Protein expressed protein	not assigned.unknown	-1.69

Os08g0173300	Protein expressed protein	not assigned.unknown	-1.72
Os01g0922700	Protein expressed protein	not assigned.unknown	-1.40
Os06g0604600	Protein expressed protein	not assigned.unknown	-1.23
Os01g0888900	Protein expressed protein	not assigned.unknown	-4.12
Os04g0469000	Protein expressed protein	not assigned.unknown	-1.28
Os02g0251900	Protein VQ domain containing protein, putative, expressed	not assigned.unknown	-3.14
Os03g0280400	Protein plant-specific domain TIGR01589 family protein, expressed	not assigned.unknown	-1.90
Os01g0847100	Protein expressed protein	not assigned.unknown	-1.50
Os01g0224200	PDV1 PDV1 (PLASTID DIVISION1)	not assigned.unknown	4.13
Os06g0559400	Protein expressed protein	not assigned.unknown	-4.47

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estratégias das plantas para superar períodos de alta salinidade e baixa disponibilidade hídrica pode envolver diferentes alterações no metabolismo, levando à aquisição da memória do estresse. Como consequência, as plantas poderão responder de modo mais rápido, aumentando a tolerância a um evento estressante subsequente. Nos últimos anos têm crescido o número de estudos demonstrando o processo de aquisição de memória em plantas, no entanto, não existem muitos trabalhos com espécies cultivadas, principalmente com arroz. Neste sentido, este estudo pode ser considerado como uma importante contribuição para o entendimento de como as plantas são afetadas por eventos recorrentes de salinidade e estresse cruzado (sal x déficit hídrico), assunto ainda pouco estudado.

O trabalho indica que estresse salino recorrente e estresse cruzado melhoram a performance das plantas, em diferentes escalas: genética, bioquímica e fisiológica, indicando a ocorrência de memória somática de longo prazo em plantas de arroz, cv. BRS AG. Revelar os mecanismos envolvidos no processo de memória, além da complexa interação entre as respostas, pode ser essencial para entender como as plantas se adaptam a ambientes em constante mudança, e está surgindo como uma nova área na pesquisa de estresse em plantas.

Com isso, os próximos passos serão avaliar o efeito do *priming* nos parâmetros de produtividade e/ou enchimento de grãos tanto sob estresse recorrente (sal), quanto estresse cruzado (sal x seca). Além disso, analisar a concentração de amido e sacarose em diferentes órgãos (folhas, bainha, colmo), assim como o calibre de vasos do xilema e floema no colmo e na bainha a fim de entender como ocorre a remobilização de reservas em plantas de arroz submetidas a estresse salino recorrente. Ainda seria interessante analisar o sistema radicular dessas plantas que passaram por estresse recorrente e cruzado e com isso entender como elas respondem a esses estresses nesse órgão.

Aqui, o estresse subsequente foi aplicado no estágio de enchimento de grãos, mas a aplicação do estresse em diferentes estádios de desenvolvimento reprodutivo, como R3, R4 e R5 ainda precisa ser testada com estresse cruzado

por sal e seca, para que possamos contribuir para outras respostas melhoradas como por exemplo, a fotossíntese.