

FRED AUGUSTO LOURÊDO DE BRITO

**ALTERAÇÕES NO CRESCIMENTO E NO METABOLISMO DE PLANTAS DE
TOMATE EM RESPOSTA À SALINIDADE SÃO ATENUADAS PELA ELEVADA
CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

B862a
2016 Brito, Fred Augusto Louredo de, 1990-
Alterações no crescimento e no metabolismo de plantas de
tomate em resposta à salinidade são atenuadas pela elevada
concentração de dióxido de carbono / Fred Augusto Louredo de
Brito. – Viçosa, MG, 2016.
vii, 46f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Dimas Mendes Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.31-40.

1. *Solanum lycopersicum* - Fisiologia vegetal. 2. Plantas -
Efeito do sal. 3. Fotossíntese. 4. Carbono - Metabolismo.
5. Plantas - Metabolismo. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação
em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 583.952

FRED AUGUSTO LOURÊDO DE BRITO

**ALTERAÇÕES NO CRESCIMENTO E NO METABOLISMO DE PLANTAS DE
TOMATE EM RESPOSTA À SALINIDADE SÃO ATENUADAS PELA ELEVADA
CONCENTRAÇÃO DE DIÓXIDO DE CARBONO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 17 de julho de 2016.

Agustin Zsögön

Flávio Barcellos Cardoso

Wagner L. Araújo

Dimas Mendes Ribeiro
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal pelo suporte e pilares fundamentais da realização desse projeto. À Capes pelo apoio financeiro.

Ao Professor Dimas Mendes Ribeiro, muito obrigado pela orientação e conhecimentos passados durante a realização desse projeto.

Aos professores Agustin e Wagner Araújo e ao pós-doutorando Flávio pelo importante ensinamento e sugestões valiosas para enriquecimento desse trabalho.

Às amigas feitas há vinte e quatro meses, em especial a Duanny, Ricardo, Jessica, Gillian e João, por todos os dias de estudo, os momentos difíceis e alegres. E aos demais, não menos especiais, que participaram dessas etapas: Letícia, Vanessa, Thaline, Cileimar, Gabriela, Roberta, Ludmila.

Meu enorme agradecimento a Medina, Auxiliadora (Dora), Rodrigo, Samuel, William e Martielly, pela colaboração direta e indireta para esse estudo. E aos colegas e amigos do laboratório Nilo, Lucas, Rafael e Karla pelas contribuições.

A todos os meus amigos de 2000 Km de distância.

À Nádson, irmão de coração, pela coragem, sabedoria, companheirismo, amizade e paciência. Minha sincera gratidão.

Aos meus pais Severino e Maria Brito. Minha razão.

Aos meus irmãos de sangue e coração Petrócia, André e Petrônio.

À Deus, por tudo.

BIOGRAFIA

FRED AUGUSTO LOURÊDO DE BRITO, filho de Severino Alves de Brito e Maria José de Brito, nasceu em 11 de dezembro de 1990, em São José do Egito (Pernambuco, Brasil). Ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Serra Talhada (PE) no ano de 2008, onde participou de programas de monitorias, estágios e bolsas de iniciação científica FACEPE. Realizou período de graduação sanduíche na Espana durante 12 meses, na Universidad de Zaragoza, pelo programa do Ministério da Educação (Ciência sem Fronteiras). Graduou-se engenheiro agrônomo em julho de 2014 e em agosto do mesmo ano, iniciou estudos do curso de mestrado em Fisiologia Vegetal na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa (MG), com ênfase em regulação do desenvolvimento em plantas, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2016.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	3
2.1 <i>Material vegetal e condições de cultivo</i>	3
2.2 <i>Quantificação dos parâmetros morfológicos</i>	4
2.3 <i>Fluorescência e trocas gasosas</i>	5
2.4 <i>Quantificação de metabolitos</i>	6
2.5 <i>Perfil metabólico</i>	7
2.6 <i>Quantificação de Na⁺ e K⁺</i>	8
2.7 <i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	9
3 RESULTADOS	9
3.1 <i>Elevada [CO₂] recupera o crescimento das plantas tratadas com NaCl</i>	9
3.2 <i>A diferença na tolerância a salinidade das plantas cultivadas sob ambiente e elevada [CO₂] não é resultado da absorção seletiva ou exclusão do Na</i>	11
3.3 <i>O estresse salino modifica as trocas gasosas em plantas de tomate sob [CO₂] ambiente, mas não sob elevada [CO₂]</i>	13
3.4 <i>[CO₂] elevada modifica o metabolismo primário em resposta ao estresse salino em folhas, caule e raízes</i>	13
4 DISCUSSÃO.....	22
5 CONCLUSÃO.....	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
MATERIAL SUPLEMENTAR	41

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- A = taxa de assimilação líquida de carbono
 ABA = ácido abscísico
 AFE = área foliar específica
 ATP = adenosina trifosfato
 C_a = concentração ambiente de CO_2
 $Chl\ a$ = clorofila a
 C_i = concentração intercelular de CO_2
 E = transpiração foliar
 F_0 = fluorescência inicial
 F_m = fluorescência máxima
 FMC = fração de massa caulinar
 FMF = fração de massa foliar
 FMR = fração de massa radicular
 $FSII$ = fotossistema II
 F_v = fluorescência variável
 F_v/F_m = eficiência fotoquímica máxima do FSII
 g_s = condutância estomática
 J_{max} = taxa máxima de transporte de elétrons
 MF = massa fresca
 MS = massa seca
 NAD = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
 $NADPH$ = Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
 NPQ = coeficiente de extinção não-fotoquímico
 R_d = taxa de respiração no escuro
 RFA = radiação fotossinteticamente ativa
 TCA = ciclo dos ácidos tricarboxílicos
 TCR = taxa de crescimento relativo
 V_{cmax} = velocidade máxima de carboxilação

RESUMO

BRITO, Fred Augusto Lourêdo de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2016. **Alterações no crescimento e no metabolismo de plantas de tomate em resposta à salinidade são atenuadas pela elevada concentração de dióxido de carbono.** Orientador: Dimas Mendes Ribeiro.

O crescimento e desenvolvimento das plantas envolvem processos que são sensíveis a salinidade dos solos. O aumento da concentração de dióxido de carbono ($[CO_2]$) na atmosfera durante as últimas décadas tem despertado crescente interesse na função desse gás como um sinal do ambiente envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Apesar da conhecida associação entre elevada $[CO_2]$ e crescimento vegetal, pouco se sabe sobre as inter-relações entre o estresse salino e o metabolismo central na regulação do crescimento em plantas cultivadas sob elevada $[CO_2]$. Assim, no presente estudo, investigou-se a regulação metabólica e a modulação das trocas gasosas em resposta as alterações no crescimento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv Santa Clara) imposta pelo estresse salino em plantas cultivadas em ambiente ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e sob elevada $[CO_2]$ ($750 \mu\text{mol mol}^{-1}$). O NaCl promoveu redução na taxa de crescimento relativo (TCR) e biomassa total, atribuídas principalmente a redução na fotossíntese (A), condutância estomática (g_s) e concentração intercelular de CO_2 (C_i), sem ocorrer danos oxidativos e de fotoinibição. No entanto, os efeitos inibitórios do crescimento foram mitigados em plantas tratadas com NaCl cultivada em $[CO_2]$ elevada, via aumentos em A , g_s e C_i . Ademais, aumentos dos níveis de carboidratos e aminoácidos, redução de ácidos orgânicos e baixa respiração no escuro em plantas sob estresse salino em $[CO_2]$ ambiente afetou a capacidade energética das plantas. Por outro lado, a habilidade das plantas de tomate tratadas com NaCl em utilizar mais eficientemente o elevado nível de carbono sob $[CO_2]$ elevada influenciou diretamente o seu crescimento. Em conclusão, os resultados mostram que $[CO_2]$ elevada foi requerida para acoplar o metabolismo primário ao crescimento das plantas mantidas sob condições de estresse salino.

ABSTRACT

BRITO, Fred Augusto Lourêdo de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Changes in the growth and metabolism of tomato plants in response to salinity are attenuated by high concentration of carbon dioxide.** Adviser: Dimas Mendes Ribeiro.

The plant growth and development involve processes that are sensitive to soil salinity. The increased carbon dioxide concentration ($[CO_2]$) into the atmosphere during the latest decades has attracted increasing interest in the function of this gas as an environmental signal involved in the regulation of plant growth and development. Despite the known association between elevated $[CO_2]$ and plant growth, little is known about the interrelationships between salt stress and central metabolism in growth regulation in plants grown under elevated $[CO_2]$. Thus, in the present study, it was investigated metabolic regulation and modulation of gas exchange in response to changes in growth of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L. cv Santa Clara) imposed by salt stress in plants grown under ambient ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) and elevated $[CO_2]$ ($750 \mu\text{mol mol}^{-1}$). NaCl promoted reduction in relative growth rate (TCR) and total biomass mainly attributed to decrease in photosynthesis (A), stomatal conductance (g_s) and intercellular CO_2 concentration (C_i), without the occurrence of oxidative damage and photoinhibition. However, the growth inhibitory effects were mitigated in plants treated with NaCl grown under elevated $[CO_2]$ via increases in A , g_s e C_i . Furthermore, increases in the levels of carbohydrates and amino acids, reduction of organic acids and low dark respiration in plants under salt stress cultivated in ambient $[CO_2]$ affected the energy capacity of the plants. On the other hand, the ability of tomato plants treated with NaCl to more efficiently use the high level carbon in the elevated $[CO_2]$ directly influenced their growth. In summary, the results show that elevated $[CO_2]$ was required to couple the primary metabolism to growth of plants cultivated under salt stress.

1 INTRODUÇÃO

A salinidade é considerada um dos fatores abióticos que mais limita a produção vegetal e aproximadamente 20 % do total das terras agricultáveis apresentam altas concentrações de sal (FAO, 2016). Em solos salinos, a toxicidade do íon sódio é o principal fator limitante ao crescimento vegetal afetando inicialmente a divisão e a expansão celular (Munns and Tester 2008; Zhang et al. 2012). Além disso, a redução do crescimento sob condições salinas está fortemente associada ao decréscimo da fotossíntese, favorecida por uma limitação estomática, possivelmente, estimulado pelo ácido abscísico (ABA) (Tavakkoli et al. 2011; Jensen et al. 2013). O crescimento e desenvolvimento das plantas envolvem divisão e expansão celular e ambos os processos são também sensíveis a elevada concentração de dióxido de carbono ($[CO_2]$) (Masle 2000; Taylor et al. 2003; Tsutsumi et al. 2014). Adicionalmente, o aumento da $[CO_2]$ estimula diretamente a taxa fotossintética, potencializando o crescimento e ganho de biomassa das plantas (Xu et al. 2015). Muitos esforços têm sido recentemente direcionados para elucidar os mecanismos de tolerância das plantas à toxicidade dos solos salinos (Deinlein et al. 2014; Kurotani et al. 2015; Bencherif et al. 2015). Em contraste, estudos diretos sobre o efeito integrado do estresse salino na determinação do crescimento das plantas sob elevada $[CO_2]$ são pouco explorados. Apesar disso, alguns estudos de caracterização dos efeitos regulados pelo estresse salino no crescimento de plantas mantidas sob elevada $[CO_2]$ têm produzido resultados interessantes. Por exemplo, plantas de *Capsicum annuum* (Piñero et al. 2014) e *Lactuca sativa* (L.) (Pérez-López, Miranda-Apodaca, Muñoz-Rueda, et al. 2013) exibiram incrementos da fotossíntese sob condições de estresse salino, quando expostas a elevada $[CO_2]$. Além disso, aumento na absorção e assimilação de nutrientes bem como incrementos na concentração de solutos compatíveis para o ajustamento osmótico foram observados em plantas sob condições de

estresse salino sujeitas a elevada [CO₂] (Pérez-López et al. 2010; Pérez-López et al. 2012, 2014; AbdElgawad et al. 2015; Yu et al. 2015). Uma análise dos resultados acima leva a uma visão pontual de como estresse salino poderia controlar o crescimento das plantas sob as condições atmosféricas futuras de [CO₂]. Até o momento, no entanto, pouco é conhecido sobre as inter-relações entre o estresse salino e o metabolismo central na regulação do crescimento em plantas cultivadas sob elevada [CO₂].

A resposta adequada de adaptação a uma condição de estresse é governada via regulação da expressão de genes nas células e tecidos que alteram o metabolismo e o crescimento das plantas (Mochida and Shinozaki 2010). Em particular, a salinidade pode causar modificações no fluxo energético, tais como, decréscimo de metabólitos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), redução do catabolismo de carboidratos e menor energia na forma de poder redutor para o crescimento (Richter et al. 2015). O estresse salino, portanto, levaria a um acúmulo de carboidratos nas folhas e raízes, que possivelmente agiria como agente osmoprotetor, sendo importante indicador de mecanismos de resistência a salinidade (Juan et al. 2005; Arbona et al. 2013). Por outro lado, a elevada [CO₂] pode aumentar a capacidade energética foliar, devido ao aporte de carboidratos da fotossíntese, influenciando a disponibilidade de substratos respiratórios e consumo de ATP (Markelz et al. 2014; Watanabe et al. 2014). Assim, enquanto os efeitos gerais promovidos pelo estresse salino são conhecidos, o seu papel na determinação do crescimento seguido por exposição à concentração elevada [CO₂] é, ainda, pouco conhecido.

O estresse salino aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio tais como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ânion superóxido nas plantas (Munns and Tester 2008; Abogadallah 2010). As espécies reativas de oxigênio têm sido consideradas como moléculas-chave de sinalização em plantas, controlando processos tais como morte celular programada, abertura e fechamento dos estômatos, dentre outros (Bright et al. 2006; Oracz

et al. 2007; Leymarie et al. 2011). Entretanto, sob altas concentrações e em certas situações, os radicais oxidativos podem ser tóxicos (Dickinson and Chang 2012). Alguns estudos têm mostrado que a elevada [CO₂] pode aumentar a tolerância das plantas contra o estresse oxidativo (Pérez-López et al. 2010; Gillespie et al. 2011; AbdElgawad et al. 2015). O CO₂ possivelmente agiria reduzindo a peroxidação de lipídios e aumentando a atividade do sistema antioxidativo (Salazar-Parra et al. 2012). Assim, no presente trabalho, as atividades de várias enzimas do sistema antioxidante foram também investigadas em plantas tratadas com NaCl cultivadas em ambiente e elevada [CO₂].

O aumento de CO₂ na atmosfera durante as últimas décadas tem despertado um crescente interesse na função desse gás como um sinal do ambiente envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. A compreensão de como a elevada [CO₂] coordena o crescimento e desenvolvimento das plantas, particularmente sob condição de estresse salino, permitirá certamente o desenvolvimento de tecnologias mais adequadas de exploração do ambiente. Assim, o presente trabalho objetivou analisar o efeito da elevada [CO₂] no metabolismo primário e no crescimento de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv Santa Clara) cultivadas em solo suplementado com NaCl. Propôs-se, ainda, investigar as ações integrativas entre o estresse salino e a elevada [CO₂] no controle da alocação de carboidratos não estruturais entre a parte aérea e as raízes das plantas de tomate.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Para realização dos ensaios sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv Santa Clara) foram semeadas em solo em vasos plásticos. Os vasos foram mantidos em casa-de-

vegetação, na Universidade Federal de Viçosa (20° 45' S, 42° 15' W), em Viçosa, Minas Gerais. Após duas semanas, as plântulas foram transferidas para vasos de polietileno de 3,5 L de capacidade contendo substrato comercial e receberam adubação de cobertura com 5,0 g⁻¹ vaso de N-P-K (20-5-20), parcelada em duas aplicações, durante o estado vegetativo das plantas. Uma semana após o transplante, correspondente ao estágio de aparecimento do primeiro par de folhas verdadeiras, os vasos foram irrigados com 100 mL de água desionizada (controle) ou com 100 mL de solução de NaCl à concentração de 50 mM. A cada dois dias, a concentração da solução de NaCl foi incrementada em 50 mM até atingir a concentração final de 150 mM. Em seguida, as plantas foram transferidas para câmaras de topo aberto (1,6 m de diâmetro e 1,8 m de altura) montadas em casa de vegetação e suplementadas com CO₂ à concentração de 400 µmol mol⁻¹ (ambiente) e 750 µmol mol⁻¹ (elevada), respectivamente. A irrigação das plantas nas câmaras de topo aberto foi realizada a cada dois dias com água desionizada (controle) ou com solução de NaCl (150 mM). O experimento foi repetido exatamente como descrito acima em três diferentes épocas. A variação diária global da intensidade de luz, temperatura e déficit de pressão de vapor (VPD) durante a condução dos experimentos, em cada câmara de topo aberto, estão dispostos na figura S1 (Material Suplementar).

2.2 *Quantificação dos parâmetros morfológicos*

Ao final de cada experimento (21 dias de suplementação com CO₂ em câmaras de topo aberto), a altura das plantas tomada do nível do solo até o nó apical superior foi mensurada e as plantas foram separadas em caule, folhas e raízes. A área foliar total foi determinada usando medidor de área foliar (Li-Cor Model 3100 Area Meter, Lincoln, NE, USA). As raízes foram lavadas com água sobre uma peneira com malha de 0,5 mm. Os tecidos das plantas foram secos em estufa de circulação forçada, a 70 °C, até atingir massa

constante; posteriormente, a massa seca das folhas, caules e raízes foi determinado. Com os dados de massa seca dos órgãos e área foliar foram calculados as seguintes características de crescimento: biomassa total; fração de massa foliar, FMF (g de massa seca foliar g^{-1} de biomassa seca total), fração de massa radicular, FMR (g de massa seca radicular g^{-1} de biomassa seca total) e fração de massa caulinar, FMC (g de massa seca caulinar g^{-1} de biomassa seca total). Também foi calculado a taxa de crescimento relativo da biomassa (TCR) da planta bem como a área foliar específica (AFE), conforme Hunt (1982).

2.3 Fluorescência e trocas gasosas

A taxa de assimilação líquida de carbono (A), a condutância estomática (g_s), a concentração subestomática de CO_2 (C_i), a razão entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) e os parâmetros de fluorescência foram medidos entre 9:00 e 11:00 h, sob radiação fotossinteticamente ativa equivalente à do ambiente ($500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com um analisador de gases a infravermelho (Li-Cor 6400, Lincoln, NE, USA) equipado com uma câmara de fluorescência integrada (Li-6400-40; Li-Cor Inc.). A concentração de CO_2 de referência foi de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ de ar para plantas em atmosfera ambiente de CO_2 e $750 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ de ar para plantas sob alta $[\text{CO}_2]$. A fluorescência inicial (F_0) foi obtida via excitação dos tecidos foliares por luz vermelha modulada de baixa intensidade de ($0,03 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Em seguida, um pulso de 0,8 s de luz act\u00ednica saturante ($8000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Foi aplicado para determinar a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m). Procedeu-se a estimativa da efici\u00eancia fotoqu\u00edmica m\u00e1xima do fotossistema II (FSII) (F_v/F_m) e do coeficiente de extin\u00e7\u00e3o n\u00e3o-fotoqu\u00edmica (NPQ), conforme descrito em Lima et al (2002). A respira\u00e7\u00e3o no escuro (R_d) foi quantificada utilizando-se o mesmo equipamento descrito anteriormente, ap\u00f3s duas horas do termino do per\u00edodo de luz. A determina\u00e7\u00e3o das trocas gasosas e dos par\u00e2metros de fluoresc\u00eancia foram realizadas em 10 plantas para cada

tratamento, utilizando uma média entre medições de duas folhas individualmente (terceira e quarta folha a partir do ápice) totalmente expandidas por planta. As medidas foram efetuadas sob umidade relativa 50-60 % e temperatura 26-31 °C, correspondente ao topo das câmaras.

As respostas de A à concentração interna de CO_2 (curva A/C_i) foram determinadas com um analisador de gases a infravermelho (Li-Cor 6200, Lincoln, NE, USA), a 25 °C, sob 1000 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (valor saturante, mas não fotoinibitório), variando-se a pressão parcial de CO_2 , de 5 a 200 Pa (Long e Bernacchi 2003; Flexas et al. 2007). A partir dessas curvas foram calculadas a taxa de carboxilação máxima (V_{cmax}) e a taxa de carboxilação máxima limitada pelo transporte de elétrons (J_{max}), conforme descritos em Sharkey et al. (2007).

2.4 Quantificação de metabolitos

Para investigar-se como o estresse salino coordena o metabolismo primário em relação ao nível de CO_2 , os níveis de glicose, frutose, sacarose, amido, nitrato, aminoácidos totais, clorofilas e proteínas, foram determinados em plantas tratadas com NaCl, crescendo sob condições ambientes e elevada $[\text{CO}_2]$. A amostra de folha, caule e raiz foram coletadas no meio do período de luz e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, até análise. Uma fração das amostras (30 mg) liofilizada foram utilizada para extração etanólica, como descrito por Geigenberger et al. (1996). Glicose, frutose e sacarose foram determinadas usando-se um ensaio de substrato enzimático contínuo, como descrito por Fernie et al. (2001). Para a determinação de amido, o precipitado da extração etanólica foi solubilizado por aquecimento a 95 °C em 0,1 M NaOH. Em seguida, 70 μl de solução de ácido acético (1 M) foram adicionados às amostras, e o conteúdo de amido foi determinado como equivalentes de glicose, como descrito por Fernie et al. (2001).

A quantificação de nitrato foi realizada como descrito por Fritz et al. (2006). A reação enzimática foi iniciada pela adição de uma alíquota de 5 μL do extrato etanólico em um volume de reação de 150 μL , constituído de tampão fosfato de potássio, 0,1 mM (pH 7,5), NADPH 0,25 mM, e nitrato redutase 0,005 U. Depois de 30 min de incubação à temperatura ambiente, 20 μL de fenazina metanosulfato (5 mM) foram adicionados à reação e as microplacas foram incubadas, por mais 10 min, no escuro. Em seguida foram adicionados à reação 30 μL de sulfamilamida (2 % m/v) dissolvida em H_3PO_4 (2 mM) e 30 μL de *N*-(1-naftil)-etilenodiamino dihidroclorito (0,04 % m/v); o nitrato foi quantificado em leitor de microplacas (Molecular Devices Sunny Valle, EUA), a 540 nm.

Utilizou-se a técnica de Bradford (1976), com algumas modificações (Gibon et al. 2004), para determinação dos teores de proteínas nos extratos. Uma série de soluções de albumina soro bovina (BSA) diluída com o mesmo tampão de extração serviu como padrão para quantificação das proteínas. As proteínas foram quantificadas em um leitor de microplacas (Molecular Devices Sunny Valle, EUA), a 595 nm.

A determinação de clorofilas totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cross et al. (2006), a partir de 50 μL do extrato diluído em 120 μL de etanol.

2.5 Perfil metabólico

Para determinação do perfil metabólico foram utilizados os procedimentos descritos por Lisec et al. (2006). Aproximadamente 30 mg das amostras liofilizadas foram colocadas em tubos de 2 mL de capacidade e extraída em 750 μL de metanol contendo 30 μL de ribitol (0,2 mg mL^{-1}). Após agitação vigorosa em vórtex por 10 s, as amostras foram incubadas a 70 °C sob agitação (1000 g), por 15 min. Decorrido esse tempo, as amostras passaram por centrifugação a 14000 g, por 10 min, a 4 °C. Foi adicionado 750 μL de clorofórmio a 500 μL do sobrenadante. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex durante 10 s

seguindo-se de uma nova centrifugação a 4000 g, por 15 min, a 4 °C. A camada superior (fase polar) foi recolhida em alíquotas de 100 µL e adicionada em um novo tubo. Em seguida, as amostras foram secas a vácuo e armazenadas à -80 °C. Para a derivatização, adicionou-se 40 µL do reagente de metoxiaminação a cada amostra e agitou-se a 1000 g, por 2 h, a 37°C. Após esse tempo, foi adicionado 70 µL de N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) às amostras, do qual foram submetidas à agitação 1000 g, por 30 min, a 37°C. As amostras foram transferidas para frascos de vidro e analisadas por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS).

Os cromatogramas e os espectros de massa gerados foram analisados utilizando o software TAGFINDER (Luedemann et al. 2008) e a identificação e a anotação dos dados apresentados foram realizadas como descrito por Fernie et al. (2011).

2.6 *Quantificação de Na⁺ e K⁺*

Para determinação dos níveis de Na⁺ e K⁺ em tecido vegetal foram utilizados os procedimentos descritos por Miyazawa et al. (1999). Amostras de folhas, caules e raízes foram secas em estufa de circulação forçada, a 65 ° C, até atingir peso constante; posteriormente, as folhas, caules e raízes foram trituradas em moinho do tipo Willey (CINELAB CE-430; 8 lâminas, 1725 rpm, peneira de 20 mesh). Para quantificar os níveis de Na⁺ e K⁺ as amostras foram submetidas a uma digestão nitro-perclórica (65% e 70%), seguido de análise em um espectrofotômetro de emissão ótica em plasma induzido (ICP-OES, Perkin Elmer Optima 3000 DV).

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado (DIC). A unidade experimental dos experimentos de análise de metabólitos foi composta por 30 mg de material vegetal, por reação, com seis repetições, por tratamento. Para a quantificação de Na⁺ e K⁺, a unidade experimental foi composta por 500 mg de material vegetal, por reação, com quatro repetições, por tratamento. Para os experimentos relacionados ao crescimento de plantas, a unidade experimental foi composta por sete repetições, constituída de duas plantas cada. As diferenças entre as médias foram examinadas pelo teste Tukey ou pelo teste *t*. Todos os dados foram analisados usando-se o software SAEG (Sistema para Análises Estatísticas, versão 9.1, UFV).

3 RESULTADOS

3.1 Elevada [CO₂] recupera o crescimento das plantas tratadas com NaCl

O NaCl promoveu uma redução significativa na biomassa total (48 %), TCR (23 %), altura (33 %) e na FMC (18 %) das plantas de tomate mantidas a [CO₂] ambiente (400 μmol CO₂ mol⁻¹) (Figuras 1A-D). Apesar da redução na biomassa total das plantas de tomate tratadas com NaCl, não houve diminuição do número de folhas, AFE e na FMF das plantas (Figuras 1E-G). Em adição, o NaCl aumentou a FMR das plantas de tomate mantidas a [CO₂] ambiente (Figura 1H). Uma imagem diferente para o crescimento do tomateiro surgiu quando as plantas tratadas com NaCl foram cultivadas sob [CO₂] elevada (750 μmol CO₂ mol⁻¹). Neste contexto, os efeitos inibitórios do NaCl foram revertidos, pelo menos em parte, quando as plantas foram mantidas sob [CO₂] elevada. A redução na biomassa total, TCR e na altura promovida pelo estresse salino foi significativamente menor nas plantas cultivadas sob [CO₂] elevada em relação às plantas sob [CO₂] ambiente (Figuras 1A-C).

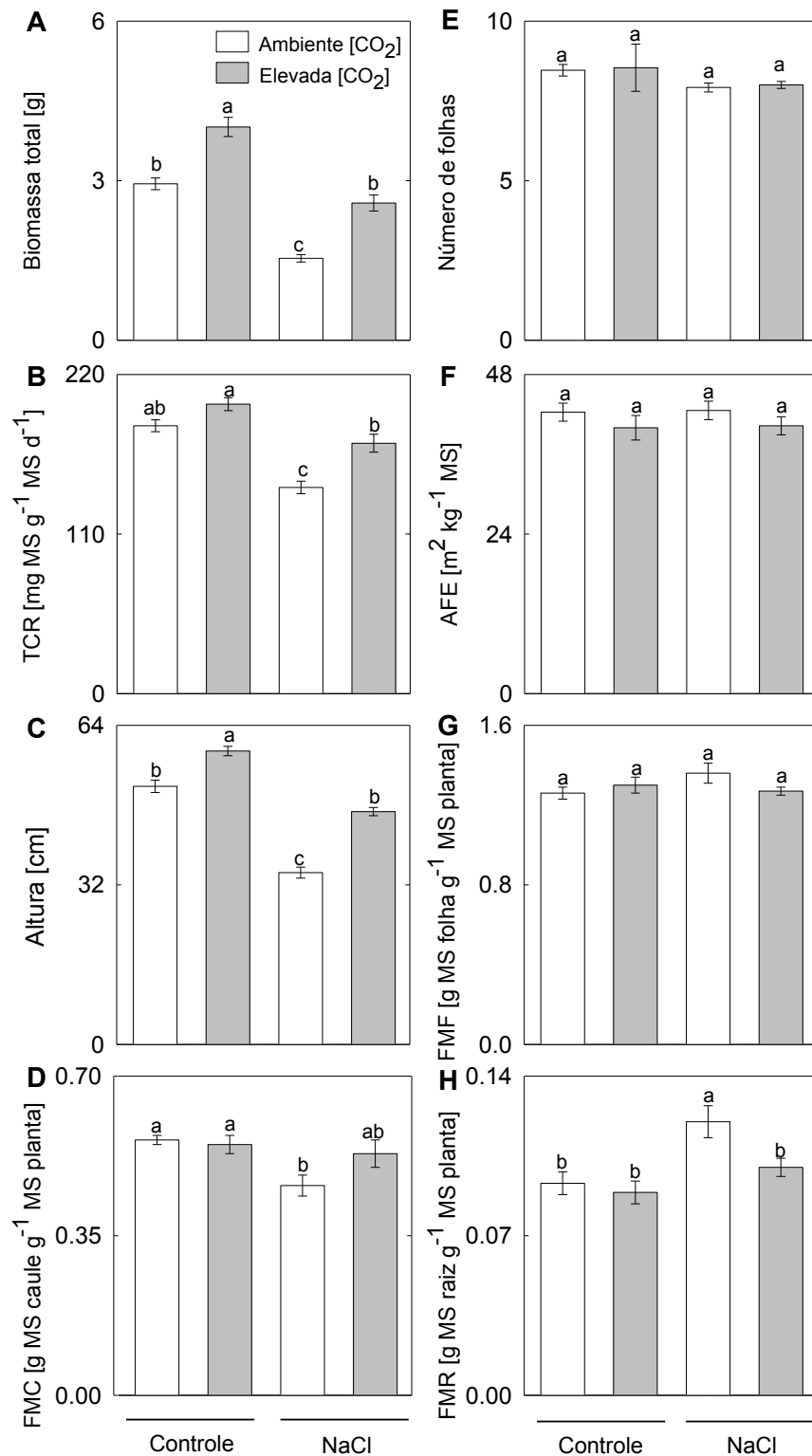


Figura 1. Análise do crescimento de plantas de tomate tratadas com NaCl sob [CO₂] ambiente e [CO₂] elevada. Biomassa total (A), taxa de crescimento relativo (B), altura da planta (C), fração de massa caular (D), número de folhas (E), área foliar específica (F), fração de massa foliar (G), fração de massa radicular (H). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Os resultados representam a média de 14 plantas por tratamento \pm erro da média.

O tratamento com NaCl não reduziu a FMC das plantas mantidas sob [CO₂] elevada, quando comparadas com as plantas do controle (Figuras 1D). Uma tendência diferente também foi encontrada para o crescimento da raiz, quando as plantas tratadas com NaCl foram cultivadas sob [CO₂] elevada. O estresse salino não afetou a FMR das plantas cultivadas em [CO₂] elevada em comparação com as plantas do controle (Figura 1H). Ademais, o NaCl também não afetou o número de folhas, a AFE e a FMF das plantas crescidas sob [CO₂] elevada (Figuras 1E-G). Interessantemente, a elevada [CO₂] aumentou a biomassa total e a altura das plantas, mas nenhum efeito significativo foi observado na TCR, FMC, número de folhas, AFE, FMF e FMR das plantas cultivadas sob [CO₂] elevada em comparação com as plantas mantidas sob [CO₂] ambiente (Figuras 1A-H).

3.2 A diferença na tolerância a salinidade das plantas cultivadas sob ambiente e elevada [CO₂] não é resultado da absorção seletiva ou exclusão do Na

Quando as plantas de tomate foram crescidas em solo suplementado com NaCl, os níveis de Na nos tecidos da folha, caule e raiz foram cerca de 11, 21 e 15 vezes maior em relação aos respectivos controles, tanto sob [CO₂] ambiente e elevada (Figuras 2A-C). Assim, esses resultados indicam que a absorção seletiva ou exclusão de Na não estão associadas com as diferenças na tolerância à salinidade entre as plantas de tomate que foram cultivadas sob [CO₂] ambiente e elevada. Por outro lado, os níveis de K foram ligeiramente reduzidos nos tecidos das folhas das plantas tratadas com NaCl mantidas sob elevada [CO₂], mas não em plantas que foram crescidas sob [CO₂] ambiente em comparação com as plantas do controle (Figura 2D). No entanto, os níveis de K nos tecidos do caule e da raiz não foram significativamente afetados pelo estresse salino em plantas cultivadas sob [CO₂] ambiente e elevada (Figuras 2E, F). Ademais, o estresse salino aumentou significativamente a razão Na:K em folhas, caule e raízes das plantas mantidas tanto sob [CO₂] ambiente e elevada,

quando comparadas com as plantas do controle (Figuras 2G, I). Entretanto, a salinidade não alterou a razão Na:K em folhas, caule e raízes das plantas cultivadas sob [CO₂] ambiente em comparação com as plantas mantidas sob [CO₂] elevada.

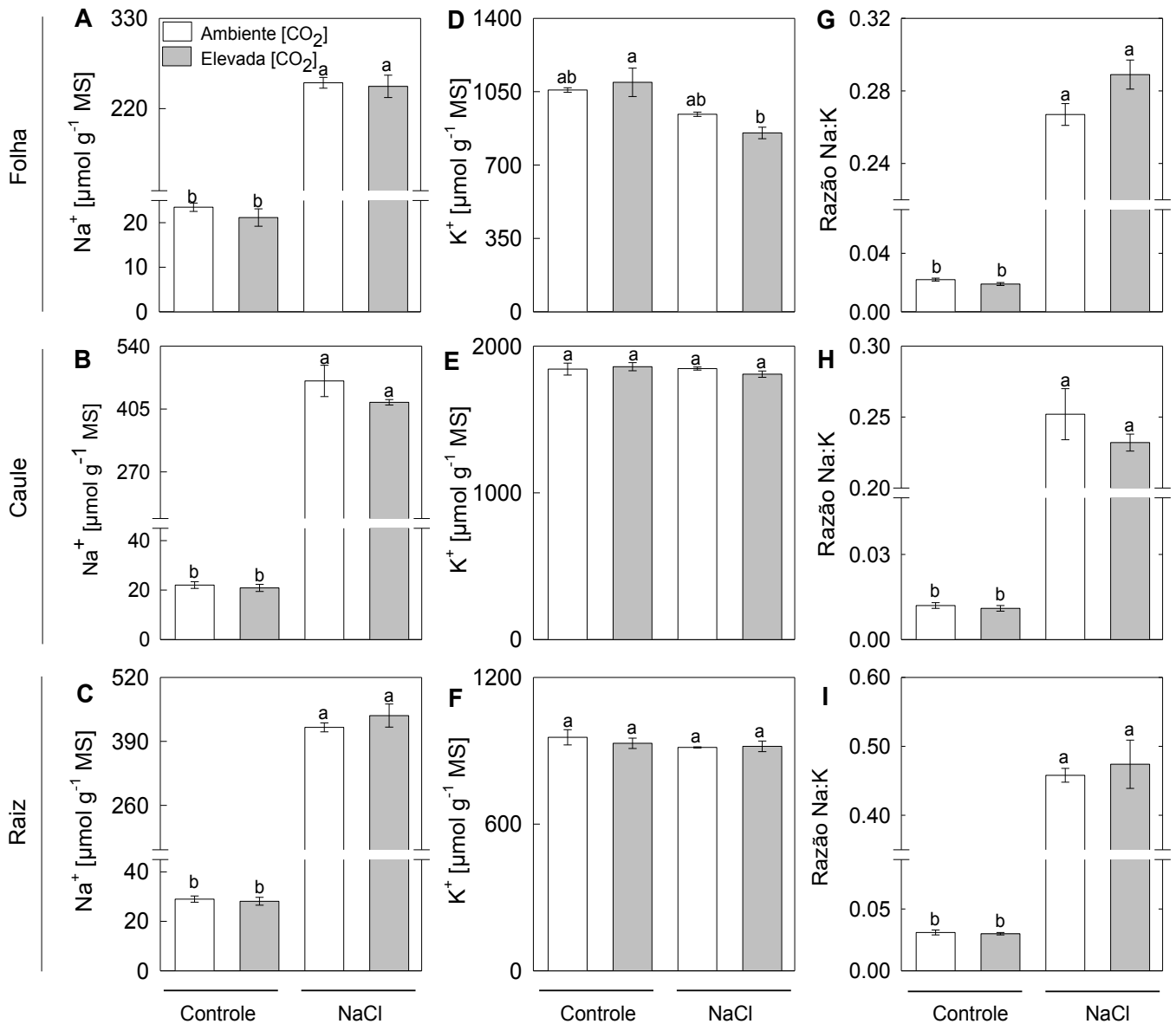


Figura 2. Acúmulo de Na e K em tecidos da folha, caule e raiz em plantas de tomate tratadas com NaCl, sob [CO₂] ambiente (400 μmol mol⁻¹) e [CO₂] elevada (750 μmol mol⁻¹). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias de 4 repetições ± erro da média.

3.3 O estresse salino modifica as trocas gasosas em plantas de tomate sob [CO₂] ambiente, mas não sob elevada [CO₂]

O NaCl promoveu uma redução significativa na A (19 %), C_i (18 %), C_i/C_a (18 %), g_s (42 %), E (34 %) e na R_d (30 %) das plantas de tomate mantidas à [CO₂] ambiente, em comparação com as plantas do controle (Figuras 3A-F). Ademais, o estresse salino não afetou significativamente a NPQ, V_{cmax} , J_{max} , J_{max}/V_{cmax} e F_v/F_m das plantas de tomate cultivadas sob [CO₂] ambiente (Figuras 3G-K). Em elevada [CO₂], todos os parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência avaliados em plantas tratadas com NaCl foram semelhantes aos das plantas do controle (Figuras 3A-K). Claramente, houve um aumento significativo na A , C_i e na razão C_i/C_a tanto em plantas do controle e tratadas com NaCl cultivadas sob [CO₂] elevada, em comparação com as plantas de tomate mantidas sob [CO₂] ambiente (Figuras 3A-C). Interessantemente, os níveis de clorofila permaneceram invariáveis nas plantas tratadas com NaCl, tanto sob [CO₂] ambiente e elevada, quando comparadas com as plantas do controle (Figura 3L).

3.4 [CO₂] elevada modifica o metabolismo primário em resposta ao estresse salino em folhas, caule e raízes

Os níveis de glicose e frutose permaneceram estáveis nas folhas das plantas tratadas com NaCl, em comparação com os das plantas do controle que cresceram sob [CO₂] ambiente (Figuras 4A, B). Além disso, os níveis de sacarose e amido aumentaram em 33 % e 17 % em folhas de plantas tratadas com NaCl e cultivadas sob [CO₂] ambiente, em comparação com as plantas do controle, respectivamente (Figuras 4C, D). Por outro lado, estresse salino reduziu os níveis de glicose (35 %) e frutose (24 %), mas não os níveis de sacarose e amido em folhas das plantas de tomate cultivadas sob elevada [CO₂], em comparação com as plantas do controle (Figuras 4A-D). Em caule das plantas tratadas com

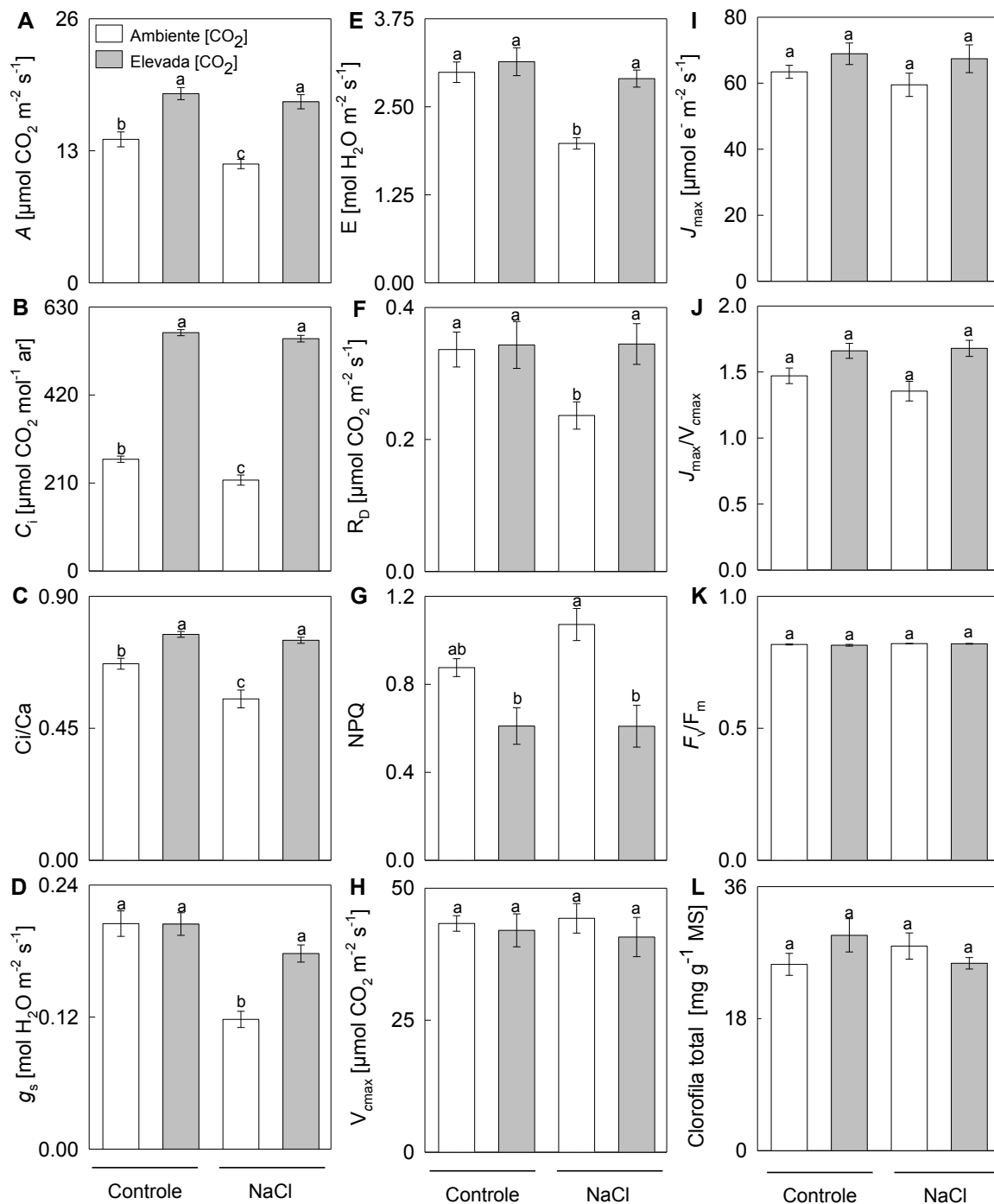


Figura 3. Trocas gasosas e fluorescência em plantas de tomate tratadas com NaCl, sob ambiente e [CO₂] elevada. Taxa de assimilação líquida de carbono (A), concentração subestomática de CO₂ (B), razão Ci/Ca (C), condutância estomática (D), taxa transpiratória (E), respiração no escuro (F), coeficiente de extinção não-fotoquímica (G), taxa de carboxilação máxima (H), taxa de carboxilação máxima limitada pelo transporte de elétrons (I) razão taxa de carboxilação máxima limitada pelo transporte de elétrons: taxa de carboxilação máxima (J), eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (K) e níveis de clorofila (L). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias de 10 repetições \pm erro da média.

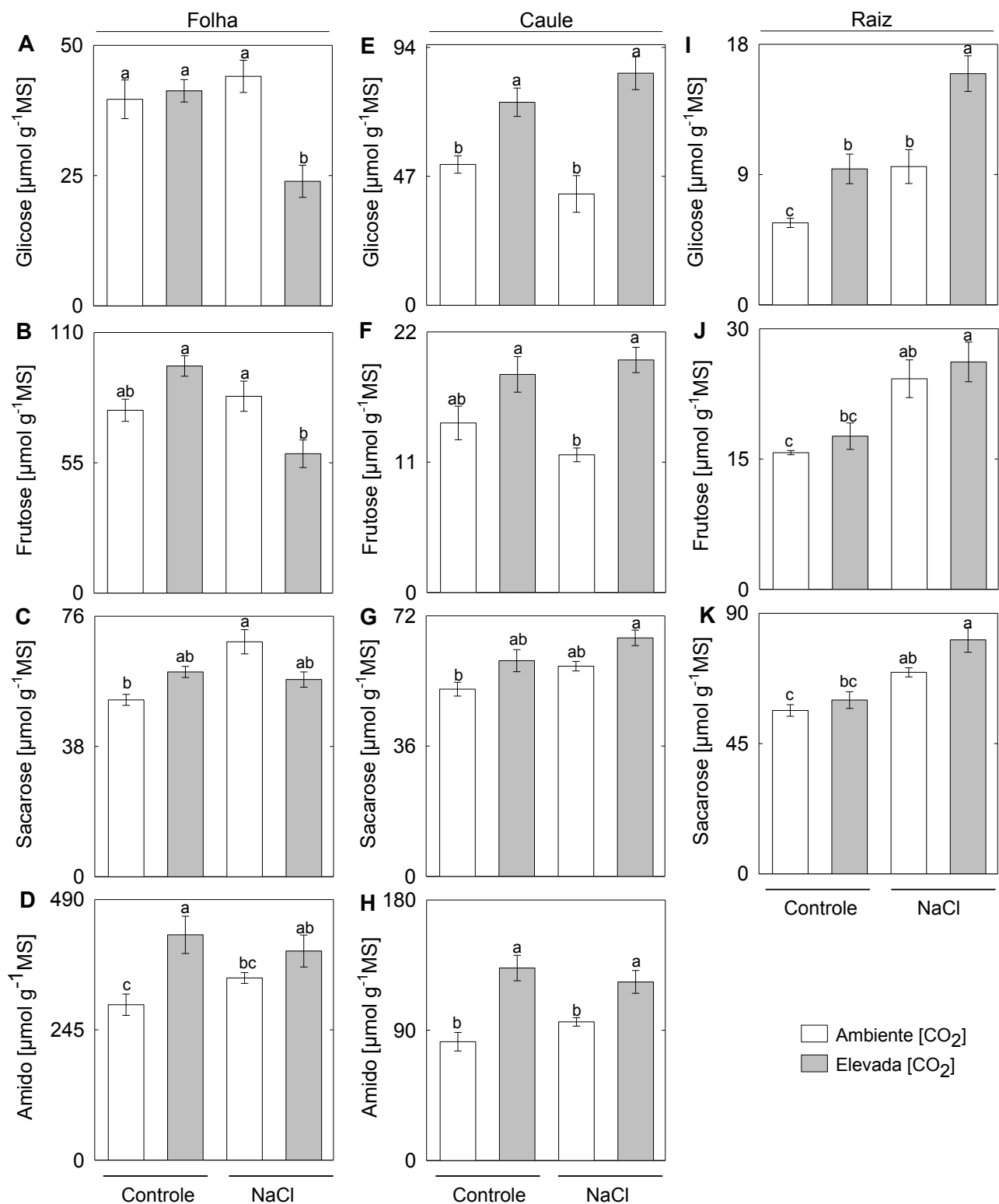


Figura 4. Níveis de metabolitos nos tecidos da folha, caule e raiz de plantas de tomate tratadas com NaCl, sob [CO_2] ambiente ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e [CO_2] elevada ($750 \mu\text{mol mol}^{-1}$). Glucose (A), frutose (B), sacarose (C) e amido (D) em folha; Glucose (E), frutose (F), sacarose (G) e amido (H) em caule; glicose (I), frutose (J) e sacarose (K) em raiz. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias de 6 repetições \pm erro da média.

NaCl, os níveis de glicose, frutose, sacarose e amido sob ambiente ou elevada [CO₂] foram semelhantes ao caule de plantas dos respectivos controles (Figuras 4E-H). Interessantemente, houve um aumento significativo nos níveis de glicose e amido nos tecidos do caule tanto das plantas do controle como das tratadas com NaCl cultivadas sob [CO₂] elevada, em comparação com o caule das plantas de tomate mantidas sob [CO₂] ambiente (Figuras 4E, H). Ademais, o estresse salino aumentou os níveis de glicose, frutose e sacarose nas raízes das plantas de tomate, tanto sob [CO₂] ambiente e elevada, em comparação com as plantas controle (Figuras 4I-K).

Os níveis de aminoácidos e proteínas totais permaneceram estáveis nas folhas das plantas tratadas com NaCl, tanto sob [CO₂] ambiente e elevada (Figuras 5A, B). Por outro lado, o estresse salino promoveu uma redução nos níveis de nitrato nos tecidos das folhas das plantas cultivadas sob [CO₂] elevada, mas não afetou os níveis de nitrato em folhas de plantas sob [CO₂] ambiente, em comparação com as plantas controle (Figura 5C). Ademais, nenhuma mudança nos níveis de aminoácidos e proteínas foi observada no caule das plantas tratadas com NaCl, tanto sob [CO₂] ambiente quanto sob [CO₂] elevada (Figuras 5D, E). Sob [CO₂] ambiente, os níveis de nitrato não foram afetados no caule das plantas tratadas com NaCl e cultivadas sob [CO₂] ambiente (Figura 5F). Entretanto, o nitrato reduziu nos tecidos do caule em plantas tratadas com NaCl mantidas sob [CO₂] elevada, quando comparado com as plantas controle (Figura 5F). O tratamento com NaCl aumentou os níveis de aminoácidos nas raízes das plantas crescidas, tanto sob [CO₂] ambiente e elevada (Figura 5G). Entretanto, os níveis de proteína foram semelhantes em plantas tratadas com NaCl, em comparação com os seus respectivos controles (Figura 4H). Ademais, os níveis de nitrato reduziram nas raízes das plantas de tomate tratadas com NaCl, tanto sob [CO₂] ambiente e elevada, em comparação com as plantas controle (Figura 5I).

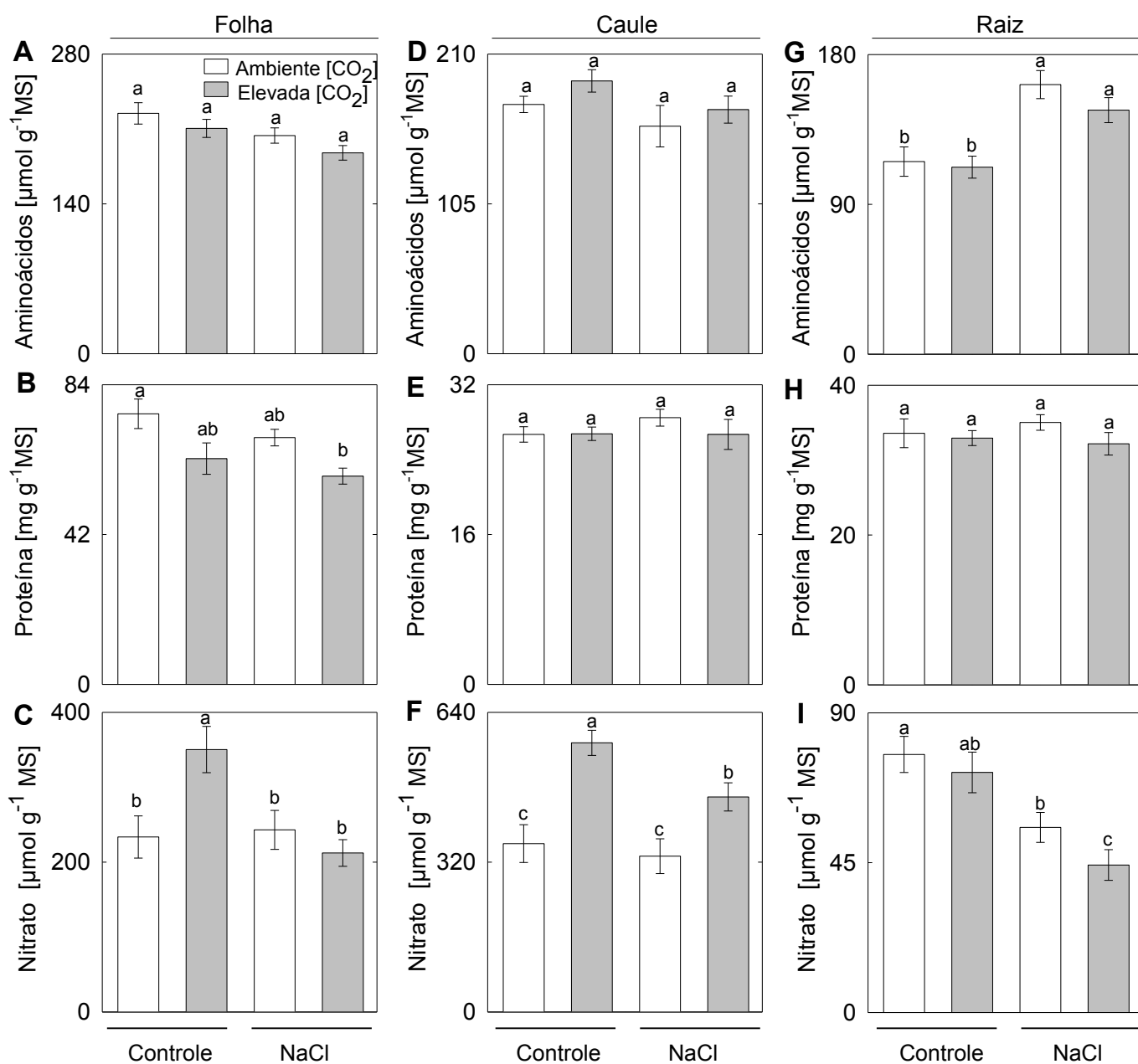


Figura 5. Níveis de aminoácidos, proteína e nitrato nos tecidos da folha, caule e raiz de plantas de tomate tratadas com NaCl, sob [CO₂] ambiente (400 μmol mol⁻¹) e [CO₂] elevada (750 μmol mol⁻¹). Aminoácidos (A), proteína (B) e nitrato (C) em folha; aminoácidos (D), proteína (E) e nitrato (F) em caule; aminoácidos (G), proteína (H) e nitrato (I) em raiz. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias de 6 repetições ± erro da média.

Para um melhor entendimento das alterações acima descritas no metabolismo primário das plantas de tomate, o perfil metabólico foi analisado usando cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) (Figuras 6A, B). Os níveis de fenilalanina, GABA, lisina, metionina, ornitina, treonina, triptofano, glutamato, glutamina e valina nas folhas das plantas tratadas com NaCl foram semelhantes aos observados nas plantas-controle, tanto sob [CO₂] ambiente quanto sob [CO₂] elevada (Figuras 6A). O estresse salino aumentou os níveis de arginina, asparagina, cisteína, glicina, serina e tirosina em folhas das plantas crescidas sob [CO₂] ambiente, mas não em plantas cultivadas sob elevada [CO₂], em relação aos respectivos controles. Em contraste, os níveis de alanina e aspartato foram aumentados em folhas das plantas tratadas com NaCl cultivadas sob [CO₂] ambiente, enquanto reduziram em plantas expostas à solução de NaCl sob [CO₂] elevada. Os níveis de prolina aumentaram nas folhas das plantas de tomate tratadas com NaCl, tanto sob [CO₂] ambiente quanto sob [CO₂] elevada (Figura 6A).

Claramente, houve um aumento significativo nos níveis dos aminoácidos alanina, arginina, aspartato, GABA, glicina, glutamina, glutamato, serina e treonina nas raízes das plantas tratadas com NaCl cultivadas sob [CO₂] ambiente, mas não em plantas sob estresse salino mantidas em [CO₂] elevada, em relação aos respectivos controles (Figura 6B). Por outro lado, o estresse salino não alterou os níveis de asparagina, fenilalanina, lisina, metionina e ornitina nas raízes das plantas de tomate cultivadas tanto em [CO₂] ambiente e elevada. Os níveis de prolina aumentou nas raízes das plantas tratadas com NaCl, tanto sob [CO₂] ambiente quanto sob [CO₂] elevada. Ademais, o estresse salino reduziu os níveis de triptofano nas raízes das plantas crescidas sob [CO₂] ambiente, mas não em plantas cultivadas sob elevada [CO₂] (Figura 6B).

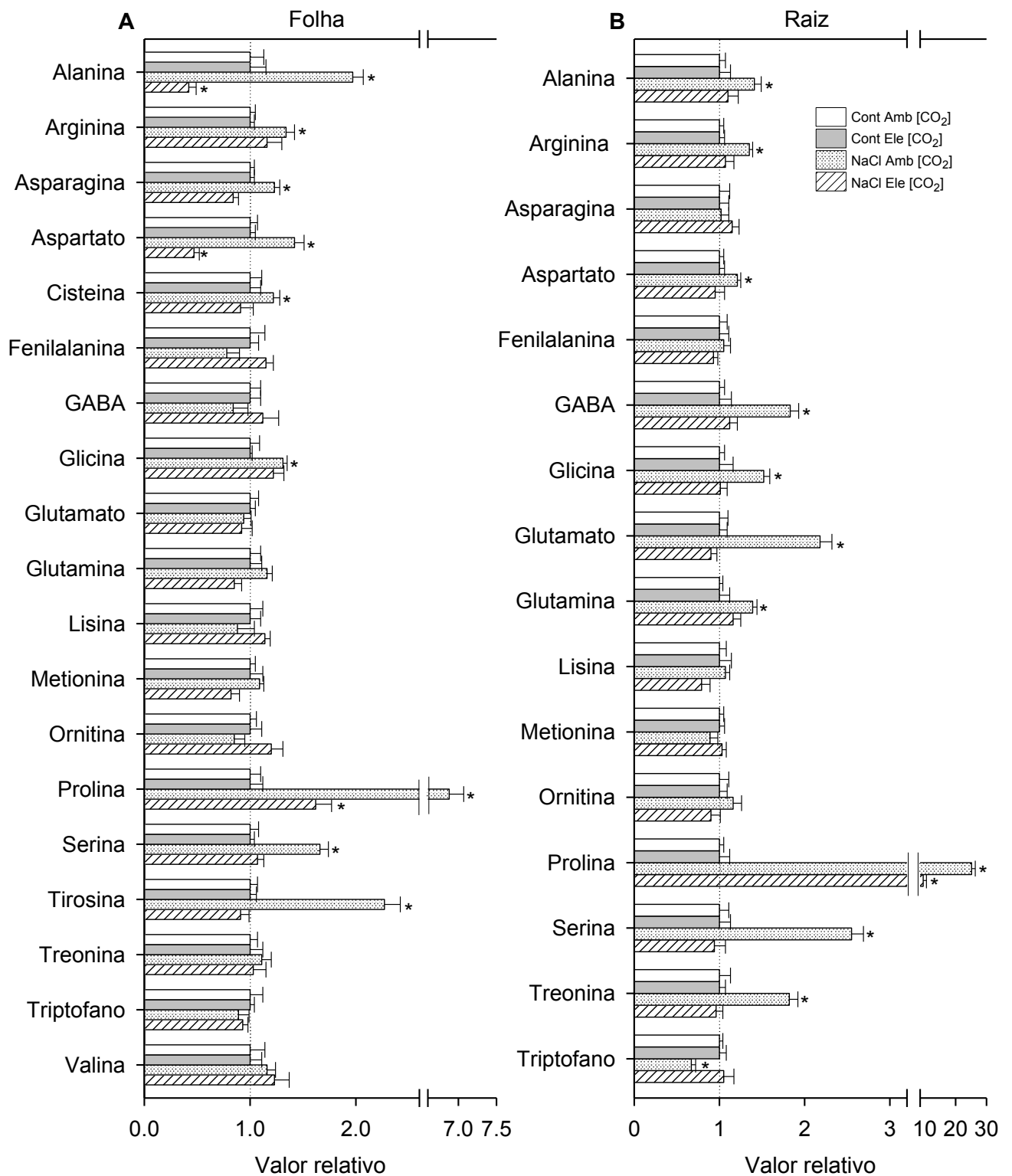


Figura 6. Mudanças nos níveis de aminoácidos nos tecidos da folha (A) e raiz (B) em plantas de tomate tratadas com NaCl, sob [CO₂] ambiente (400 μmol mol⁻¹) e [CO₂] elevada (750 μmol mol⁻¹). Uma lista completa de todos os aminoácidos medidos no GC-MS foi apresentada na Tabela S1, Material Suplementar. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente dos respectivos controles, em nível de 5% pelo teste *t*. Médias de 6 repetições ± erro da média.

A análise dos ácidos orgânicos associados ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) revelou que os níveis de citrato, isocitrato, 2-oxoglutarato, succinato, fumarato e malato foram significativamente reduzidos em folhas das plantas de tomate tratadas com NaCl e cultivadas em [CO₂] ambiente, enquanto se mantiveram estáveis em plantas sob [CO₂] elevada, em relação aos respectivos controles (Figura 7A). Ademais, os níveis de oxaloacetato foram significativamente reduzidos em folhas das plantas tratadas com NaCl cultivadas sob [CO₂] ambiente, enquanto aumentaram em plantas expostas à solução de NaCl sob [CO₂] elevada. Os níveis de citrato, isocitrato e 2-oxoglutarato foram significativamente aumentados nas raízes das plantas de tomate tratadas com NaCl e cultivadas em [CO₂] ambiente, enquanto se manteve estável em plantas sob [CO₂] elevada, em comparação com os respectivos controles (Figura 7B). Interessantemente, o estresse salino reduziu os níveis de succinato, fumarato, malato e oxaloacetato nas raízes das plantas crescidas sob [CO₂] ambiente, mas não em plantas cultivadas sob elevada [CO₂] (Figura 7B).

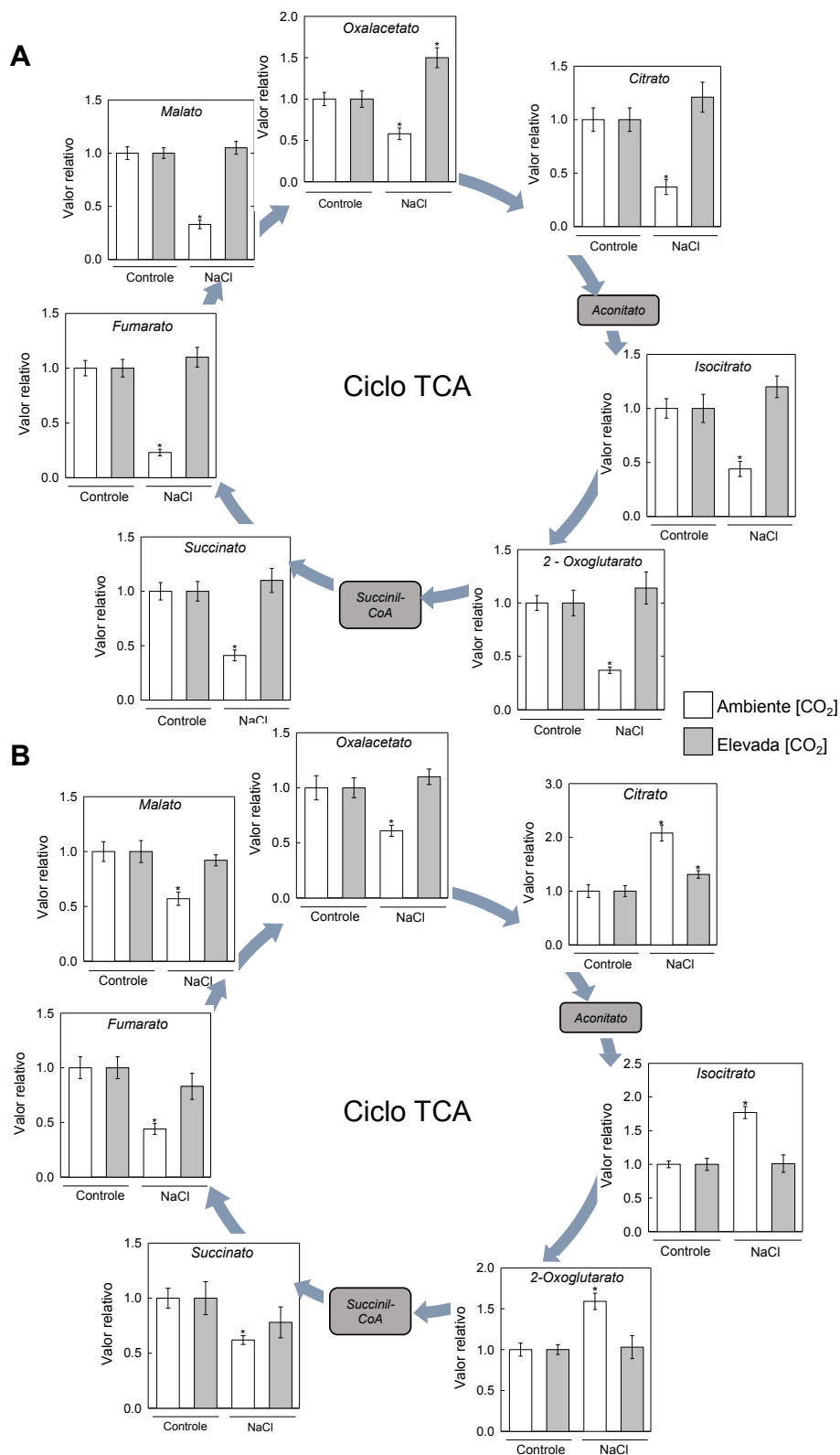


Figura 7. Mudanças nos níveis de metabólitos do ciclo TCA em folha (A) e raiz (B) de plantas tratadas com NaCl, sob ambiente e [CO₂] elevada. Uma lista completa dos metabólitos medidos no GC-MS foi apresentada na Tabela S2, Material Suplementar. Médias indicadas por asterisco diferem estatisticamente dos respectivos controles, em nível de 5% pelo teste *t*. Médias de 6 repetições \pm erro da média.

4 DISCUSSÃO

Os resultados aqui descritos indicam que os efeitos do NaCl na inibição do crescimento das plantas de tomate cultivadas sob [CO₂] ambiente foram mitigadas quando as plantas foram cultivadas sob [CO₂] elevada (Figura 1). A diferença na tolerância à salinidade entre as plantas de tomate cultivadas sob ambiente e [CO₂] elevada tem sido associada a absorção seletiva ou exclusão do íon Na⁺, visto que algumas evidências sugerem que a elevada [CO₂] possa ter um papel importante na proteção contra os efeitos tóxicos da salinidade, via redução na absorção de Na⁺ em plantas de tomate (Del Amor 2013; Yi et al. 2015). Assim, o acúmulo de Na⁺ nos tecidos da folha, caule e raiz foi quantificado. A exposição das plantas de tomate à solução de NaCl levou a um aumento acentuado nos níveis de Na⁺ nos tecidos da folha, caule e raiz tanto sob [CO₂] ambiente e elevada, sugerindo que a absorção seletiva ou exclusão de Na⁺ não estão associadas com a tolerância à salinidade entre as plantas cultivadas sob [CO₂] ambiente e elevada (Figura 2). A toxicidade ao Na⁺ pode, também, causar redução na absorção e no transporte de K⁺ da raiz para a parte aérea da planta (Bartels and Sunkar 2005). Na Figura 2, observa-se também que a razão Na⁺:K⁺ nos tecidos da folha, caule e raiz não foi afetada pelo estresse salino em plantas cultivadas sob [CO₂] ambiente e elevada. Assim, esses resultados indicam que a homeostase do íon K⁺ não foi afetada pelo estresse salino em plantas de tomate cultivadas tanto sob [CO₂] ambiente e elevada.

O efeito do NaCl na inibição do crescimento das plantas pode ser atribuído a inibição da fotossíntese promovida pela redução em g_s (Chaves et al. 2009; Del Amor 2013; Pérez-López, Miranda-Apodaca, Mena-Petite, et al. 2013). Em [CO₂] ambiente, o estresse salino reduziu A , com decréscimos paralelos nos valores de g_s e C_i (Figura 3). Entretanto, aumentos em A , g_s e C_i foram observados em plantas tratadas com NaCl cultivadas em [CO₂] elevada,

em comparação com as plantas sob estresse salino mantidas sob [CO₂] ambiente (Figura 3). Assim, os resultados indicam que a mitigação dos efeitos do NaCl no crescimento das plantas cultivadas sob [CO₂] elevada foram determinadas, pelo menos em parte, pela manutenção das trocas gasosas. Em cevada e tomate, a manutenção de g_s (e paralelamente em A) parece depender mais diretamente da conservação da turgescência (Pérez-López et al. 2009; Takagi et al. 2009). Assim, a alteração das relações hídricas poderia explicar o maior ganho de carbono (maiores valores de g_s , A , biomassa total e TCR) das plantas tratadas com NaCl cultivadas sob [CO₂] elevada, em relação as plantas sob estresse salino mantidas em [CO₂] ambiente. Interessantemente, o estresse salino não alterou o teor relativo de água e o potencial hídrico foliar no período da antemanhã em plantas de tomate cultivadas tanto em [CO₂] ambiente e elevada (Figuras S2). Portanto, outras potenciais limitações às trocas gasosas poderiam estar atuando em plantas tratadas com NaCl mantidas sob [CO₂] ambiente, como envolvendo ABA. De fato, a salinidade ativa a expressão de genes da biossíntese do ABA que desempenha um papel fundamental na integração da regulação da sinalização do hormônio e a adaptação da planta ao estresse salino (Wang et al. 2015). Neste contexto, a maior sensibilidade estomática das plantas tratadas com NaCl cultivadas sob [CO₂] ambiente se traduziu em maiores decréscimos em E (Figura 3).

NaCl promove limitações bioquímicas ao ciclo de Calvin e diminuição da atividade e quantidade de Rubisco (Flexas et al. 2004; James et al. 2006; Pérez-López et al. 2012; He et al. 2014; Piñero et al. 2014). Entretanto, aqui o estresse salino não afetou J_{max} e V_{cmax} das plantas de tomate cultivadas sob [CO₂] ambiente (Figura 3). Ademais, a AFE e a FMF foram semelhantes em plantas tratadas com NaCl, em comparação com o controle (Figura 1). Aparentemente, estes resultados são consistentes com um padrão de aclimação da maquinaria bioquímica das plantas tratadas com NaCl cultivadas sob [CO₂] ambiente. A redução dos valores de A , juntamente com reduções em g_s e C_i , sem alteração em F_v/F_m

(Figura 3), em plantas tratadas com NaCl e cultivadas sob [CO₂] ambiente, indica que a fotossíntese foi limitada grandemente pelo fechamento dos estômatos. Como a fixação de CO₂, etapa que consome a maior fração do poder redutor e ATP produzido durante a fotoquímica (Peterhansel et al. 2010), foi limitada, uma maior quantidade de energia absorvida pelas folhas deveria ser usada na fotoquímica da fotossíntese. Portanto, espera-se uma maior pressão de excitação nas folhas das plantas tratadas com NaCl mantidas sob [CO₂] ambiente, o que potencializaria a probabilidade de ocorrência de fotoinibição. Como não houve alterações em NPQ (Figura 3) e na atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante nas plantas tratadas com NaCl cultivadas sob [CO₂] ambiente (Figura S3), outras rotas alternativas de dissipação energética poderiam estar atuando, como a fotorrespiração. Em [CO₂] ambiente, os níveis dos aminoácidos glicina e serina bem como os níveis de glicerato foram aumentados em folhas de plantas tratadas com NaCl (Figura 5, Tabela S1). Por outro lado, sob [CO₂] elevada, os níveis de glicina, serina e glicerato em plantas tratadas com NaCl foram semelhantes em comparação com os seus respectivos controles. Assim, estes resultados reforçam o papel da fotorrespiração na proteção da maquinaria fotossintética, particularmente sob condições de estresse, como nas plantas tratadas com NaCl mantidas sob [CO₂] ambiente (Bauwe et al. 2010; Obata et al. 2015).

Existe um consenso geral de que a [CO₂] elevada aumenta a fixação de carbono, os níveis de carboidratos nas folhas e o crescimento das plantas (Ainsworth et al. 2002; Kirschbaum 2011). Além disso, o crescimento e desenvolvimento das plantas é altamente dependente da disponibilidade de carbono (Wiese et al. 2007; Pantin et al. 2011). Assim, o efeito da [CO₂] elevada no metabolismo primário das plantas de tomate crescendo em solo suplementado com NaCl foi investigado acompanhando-se os níveis de metabólitos envolvidos no metabolismo central das plantas. O NaCl promoveu um aumento nos níveis de sacarose em folhas de plantas mantidas sob [CO₂] ambiente (Figura 4). Ademais, o

estresse salino não alterou os níveis glicose, frutose e amido nas folhas das plantas de tomate cultivadas em [CO₂] ambiente, em comparação com o controle. Juntos esses resultados sugerem que a redução na R_D (Figura 3), em folhas de plantas tratadas com NaCl mantidas sob [CO₂] ambiente, não foi limitada pela disponibilidade de carbono, mas sim pela baixa demanda do dreno. Nesse contexto, a salinidade promoveu redução na biomassa total e na TCR, bem como nos intermediários do ciclo do TCA em folhas das plantas cultivadas sob [CO₂] ambiente, em comparação com as plantas controle (Figuras 1 e 7). Por outro lado, a redução nos níveis de glicose e frutose em folhas de plantas tratadas com NaCl mantidas sob [CO₂] elevada pode ter colaborado para manter a taxa respiratória bem como os níveis dos intermediários do TCA (Figuras 4 e 7).

Em raízes, o NaCl aumentou os níveis de glicose, frutose e sacarose sob [CO₂] ambiente e [CO₂] elevada (Figura 4). Sob seca e salinidade o acúmulo de açúcares não estruturais, principalmente sacarose, são importantes na resposta a esses fatores (Pérez-López et al. 2010; Arbona et al. 2013), pois além da manutenção do crescimento (Wu et al. 2013), atuam como osmoprotetores que permitem a manutenção da turgescência, estabilidade de membranas celulares e previnem a degradação de proteínas (Juan et al. 2005; Pérez-López et al. 2010; Almeida et al. 2014). De fato, os níveis de proteínas mantiveram estáveis nas raízes das plantas tratadas com NaCl cultivadas sob ambiente e [CO₂] elevada, em comparação com os controles (Figura 5). Por outro lado, sob ambas concentrações de CO₂, as raízes de plantas sob estresse salino apresentaram-se reduzidos níveis de nitrato, acompanhado por aumento nos níveis de aminoácidos totais (Figura 5). A salinidade aumentou os níveis de alanina, arginina, aspartato, GABA, glutamato, glutamina, glicina, prolina, serina e treonina em raízes das plantas sob [CO₂] ambiente, bem como o aumento de prolina em raízes de plantas sob alta [CO₂] (Figura 6). Ressalta-se que sob salinidade os valores relativos de prolina em raízes foram elevados em torno de 25 e 12 vezes para [CO₂]

ambiente e elevada, respectivamente, em detrimento de folhas com aumentos de aproximadamente 7 e 2 vezes, respectivamente. A prolina é um importante indicador de estresses abióticos, como déficit hídrico e salino, e tem papel fundamental na manutenção de proteínas, membranas celulares bem como atua na eliminação de espécies reativas de oxigênio e como uma reserva orgânica de N quando catabolizada (Hayat et al. 2012; Krasensky and Jonak 2012; Del Amor 2013; Guo et al. 2015). O acúmulo de prolina varia entre estresses e níveis de tolerância, embora não existam padrões de acúmulo que sejam atribuídos à tolerância a salinidade (Chen et al. 2007; Hayat et al. 2012; Jaarsma et al. 2013). Contudo, estudos vêm mostrando que em plantas sujeitas ao estresse salino, o aumento da [CO₂] favorece a redução das concentrações de prolina, juntamente com a mitigação dos efeitos da salinidade no crescimento (Pérez-López et al. 2010; Del Amor 2013).

O tratamento com NaCl aumentou a FMR em plantas crescidas sob [CO₂] ambiente, mas não em plantas cultivadas sob [CO₂] elevada (Figura 1). Interessantemente, o estresse salino aumentou os níveis dos ácidos orgânicos (citrato, isocitrato e 2-oxoglutarato) envolvidos na primeira parte do ciclo do TCA, enquanto os níveis de succinato e dos outros intermediários da segunda parte do ciclo do TCA foram reduzidos nas raízes das plantas cultivadas sob [CO₂] ambiente (Figura 7). A respiração mitocondrial é dividida em três vias principais (glicólise, ciclo do TCA e cadeia de transporte de elétrons) e várias características únicas do metabolismo respiratório estão presentes nas plantas (Araújo et al 2012). Assim, os resultados sugerem a ocorrência de uma regulação específica da respiração; em vista do acúmulo de açúcares para suportar o crescimento das raízes em condição estresse salino em plantas mantidas sob [CO₂] ambiente. Além disso, resultados acima descritos também sugerem que nas raízes, a salinidade modulou o fluxo de 2-oxoglutarato para a síntese de aminoácidos (glutamato, glutamina, aspartato e arginina) responsáveis pela assimilação de nitrogênio que pode estar associada com redução dos níveis de succinato, intermediário

subsequente ao 2-oxoglutarato no ciclo do TCA (Figuras 6 e 7). Esses resultados indicam mudanças do metabolismo respiratório em função da biossíntese de prolina e GABA, ambos produzidos a partir do glutamato por rotas distintas (Buchanan et al. 2015). Assim, tomados em conjunto, pode-se sugerir que em raízes sob estresse salino, a demanda energética e o ajustamento osmótico é mais importante para o desenvolvimento das raízes, como observado pelas altas concentrações de açúcares. Por outro lado, a elevada [CO₂] facilita de forma energética os mecanismos de tolerância a salinidade, a partir do acúmulo de carboidratos, conservação do fluxo respiratório, refletido na manutenção de níveis de ácidos orgânicos e da maioria dos aminoácidos em condições de estresse salino.

Para uma análise mais completa da ação [CO₂] elevada na determinação do crescimento das plantas sob condição de salinidade, os níveis de amido, açúcares solúveis, aminoácidos totais, proteína e nitrato foram quantificados em caules de plantas tratadas com NaCl e cultivadas sob [CO₂] ambiente ou sob [CO₂] elevada. O NaCl reduziu ligeiramente a FMC das plantas de tomate cultivadas sob [CO₂] ambiente, mas nenhum efeito foi observado na FMC das plantas cultivadas em [CO₂] elevada (Figura 1). Os níveis de amido, açúcares solúveis, aminoácidos totais e proteínas permaneceram estáveis no caule das plantas tratadas com NaCl, em comparação com o caule das plantas controle tanto sob ambiente e [CO₂] elevada (Figuras 4 e 5). Os níveis de nitrato permaneceram estáveis no caule das plantas tratadas com NaCl sob [CO₂] ambiente, mas não no caule das plantas sob [CO₂] elevada (Figura 5). No entanto, o maior nível nitrato, glicose e amido ocorreu no caule das plantas cultivadas sob [CO₂] elevada, em comparação com as plantas mantidas sob [CO₂] ambiente (Figuras 4 e 5). Os níveis de amido das folhas das plantas desempenham um papel fundamental na integração da regulação da produção de biomassa (Sulpice et al. 2009; Stitt et al. 2010). Assim, as altas concentrações de carboidratos nos caules das plantas de tomate sob [CO₂] elevada podem sinalizar para um aumento da taxa de crescimento (O'Hara

et al. 2013; Lastdrager et al. 2014). Em outras palavras, a habilidade das plantas de tomate tratadas com NaCl em utilizar mais eficientemente os elevados níveis de carbono sob [CO₂] elevada influenciou diretamente o seu crescimento. Isto desempenhou um papel importante ao possibilitar uma maior taxa de crescimento das plantas tratadas com NaCl sob [CO₂] elevada.

5 CONCLUSÃO

Em $[\text{CO}_2]$ ambiente, o estresse salino reduziu a biomassa total e a TCR, sem alterar a AFE e a FMF das plantas de tomate. A redução dos valores de A , juntamente com reduções em g_s e C_i , sem alteração de F_v/F_m , em plantas tratadas com NaCl e cultivadas sob $[\text{CO}_2]$ ambiente, indica que a fotossíntese foi limitada pelo fechamento dos estômatos. Ademais, o estresse salino não afetou J_{\max} e $V_{c\max}$ das folhas das plantas de tomate cultivadas sob $[\text{CO}_2]$ ambiente, em contraste com o que vem sendo exaustivamente relatado em várias espécies de plantas, incluindo o tomate. Assim, a manutenção da capacidade máxima de carboxilação, sem ocorrência de danos fotoquímicos, são consistentes com um padrão de aclimação da maquinaria bioquímica das plantas tratadas com NaCl cultivadas sob $[\text{CO}_2]$ ambiente. A exposição das plantas de tomate a concentrações crescentes de NaCl pode ter contribuído para o processo de aclimação da maquinaria bioquímica. O NaCl, também, reduziu R_D e a E das plantas de tomate cultivadas sob $[\text{CO}_2]$ ambiente. Destaca-se que a maioria dos estudos de crescimento das plantas em condição de estresse salino são realizados sob condições controladas, sem mudanças periódicas da temperatura, radiação e umidade. Nessas condições, espera-se que características morfológicas (e.g. AFE e FMF) sejam mais relevantes na determinação da TCR do que variáveis fisiológicas (e.g. fotossíntese e respiração), que são variáveis com resposta mais flexível às variações da disponibilidade de recursos do ambiente.

Por outro lado, o efeito da redução do crescimento das plantas de tomate tratadas com NaCl sob $[\text{CO}_2]$ ambiente foi mitigado quando as plantas foram mantidas sob $[\text{CO}_2]$ elevada. A maior TCR e biomassa total das plantas de tomate tratadas com NaCl sob $[\text{CO}_2]$ elevada parece ser resultado das maiores taxas fotossintéticas que contribuíram para um balanço de carbono mais favorável. Uma questão importante é compreender como os níveis de CO_2 são

detectados nas plantas sob condições de estresse salino, e como a estreita coordenação do crescimento e do metabolismo primário é alcançada em plantas cultivadas em um ambiente com mudanças nas concentrações de CO₂.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AbdElgawad H, Farfan-Vignolo ER, Vos D de, Asard H. 2015.** Elevated CO₂ mitigates drought and temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes. *Plant Science* **231**: 1–10.
- Abogadallah GM. 2010.** Antioxidative defense under salt stress. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 369–374.
- Ainsworth EA, Davey PA, Bernacchi CJ, Orla C. 2002.** A meta-analysis of elevated [CO₂] effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. *Global Change Biology* **8**: 695–709.
- Almeida P, Feron R, de Boer G-J, de Boer AH. 2014.** Role of Na⁺, K⁺, Cl⁻, proline and sucrose concentrations in determining salinity tolerance and their correlation with the expression of multiple genes in tomato. *AoB Plants* **6**: 1–13.
- Amor FMD. 2013.** Variation in the leaf δ¹³C is correlated with salinity tolerance under elevated CO₂ concentration. *Journal of Plant Physiology* **170**: 283–290.
- Araújo WL, Nunes-Nesi A, Nikoloski Z, Sweetlove LJ, Fernie AR. 2012.** Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant, Cell and Environment* **35**: 1–21.
- Arbona V, Manzi M, de Ollas C, Gómez-Cadenas A. 2013.** Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 4885–4911.
- Bartels D, Sunkar R. 2005.** Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 23–58.
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR. 2010.** Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science* **15**: 330–336.

- Bencherif K, Boutekrabt A, Fontaine J, Laruelle F, Dalpè Y, Lounès-Hadj Sahraoui A. 2015.** Impact of soil salinity on arbuscular mycorrhizal fungi biodiversity and microflora biomass associated with *Tamarix articulata* Vahl rhizosphere in arid and semi-arid Algerian areas. *Science of The Total Environment* **533**: 488–494.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ. 2006.** ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant Journal* **45**: 113–122.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2015.** *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. 2009.** Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**: 551–560.
- Chen Z, Cuin TA, Zhou M, Twomey A, Naidu BP, Shabala S. 2007.** Compatible solute accumulation and stress-mitigating effects in barley genotypes contrasting in their salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **58**: 4245–4255.
- Cross JM, von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M. 2006.** Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology* **142**: 1574–1588.
- Deinlein U, Stephan AB, Horie T, Luo W, Xu G, Schroeder JI. 2014.** Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science* **19**: 371–379.
- Dickinson BC, Chang CJ. 2012.** Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology* **7**: 504–511.
- FAO. 2016.** Soil Management. *FAO Soils Portal*. Disponível em <http://www.fao.org/soils->

portal/en/

- Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, DeLuca V. 2011.** Recommendations for reporting metabolite data. *The Plant Cell* **23**: 2477–2482.
- Fernie RA, Roscher A, Ratcliffe GR, Kruger JN. 2001.** Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* **212**: 250–263.
- Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD. 2004.** Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology* **6**: 269–279.
- Flexas J, Díaz-Espejo A, Berry JA, Cifre J, Galmés J, Kaldenhoff R, Medrano H, Ribas-Carbó M. 2007.** Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization. *Journal of Experimental Botany* **58** : 1533–1543.
- Fritz C, Palacios-Rojas N, Feil R, Stitt M. 2006.** Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal* **46**: 533–548.
- Geigenberger P, Lerchi J, Stitt M, Sonnewald U. 1996.** Phloem-specific expression of pyrophosphatase inhibits long distance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. *Plant, Cell & Environment* **19**: 43–55.
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M. 2004.** A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness.

The Plant Cell **16**: 3304–3325.

Gillespie KM, Rogers A, Ainsworth EA. 2011. Growth at elevated ozone or elevated carbon dioxide concentration alters antioxidant capacity and response to acute oxidative stress in soybean (*Glycine max*). *Journal of Experimental Botany* **62**: 2667–2678.

Guo R, Yang Z, Li F, Yan C, Zhong X, Liu Q, Xia X, Li H, Zhao L. 2015. Comparative metabolic responses and adaptive strategies of wheat (*Triticum aestivum*) to salt and alkali stress. *BMC Plant Biology* **15**: 170.

Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A. 2012. Role of proline under changing environments: a review. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 1456–66.

He Y, Yu C, Zhou L, Chen Y, Liu A, Jin J, Hong J, Qi Y, Jiang D. 2014. Rubisco decrease is involved in chloroplast protrusion and Rubisco-containing body formation in soybean (*Glycine max.*) under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **74**: 118–124.

Hunt R. 1982. *Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis.* Edward Arnold Ltd.

Jaarsma R, de Vries RSM, de Boer AH. 2013. Effect of salt stress on growth, Na⁺ accumulation and proline metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *PLoS ONE* **8**.

James RA, Munns R, Von Caemmerer S, Trejo C, Miller C, Condon T. 2006. Photosynthetic capacity is related to the cellular and subcellular partitioning of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in salt-affected barley and durum wheat. *Plant, Cell and Environment* **29**: 2185–2197.

Jensen MK, Lindemose S, Masi F de, Reimer JJ, Nielsen M, Perera V, Workman CT, Turck F, Grant MR, Mundy J, Petersen M, Skriver K. 2013. ATAF1 transcription factor directly regulates abscisic acid biosynthetic gene NCED3 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Open Bio* **3**: 321–327.

- Juan M, Rivero RM, Romero L, Ruiz JM. 2005.** Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. *Environmental and Experimental Botany* **54**: 193–201.
- Kirschbaum MUF. 2011.** Does enhanced photosynthesis enhance growth? Lessons learned from CO₂ enrichment studies. *Plant Physiology* **155**: 117–124.
- Krasensky J, Jonak C. 2012.** Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1593–1608.
- Kurotani K, Hayashi K, Hatanaka S, Toda Y, Ogawa D, Ichikawa H, Ishimaru Y, Tashita R, Suzuki T, Ueda M, Hattori T, Takeda S. 2015.** Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the jasmonate response and enhance salt tolerance in rice. *Plant and Cell Physiology* **56**: 779–789.
- Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S. 2014.** Sugar signals and the control of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* **65**: 799–807.
- Leymarie J, Vitkauskaitė G, Hoang HH, Gendreau E, Chazoule V, Meimoun P, Corbineau F, El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C. 2012.** Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. *Plant and Cell Physiology* **53** (1): 96–106.
- Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME. 2002.** Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and Experimental Botany* **47**: 239–247.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. 2006.** Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**: 387–396.
- Long SP, Bernacchi CJ. 2003.** Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal*

of Experimental Botany **54**: 2393–2401.

Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J. 2008. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography--mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics (Oxford, England)* **24**: 732–737.

Markelz RJC, Lai LX, Vosseler LN, Leakey ADB. 2014. Transcriptional reprogramming and stimulation of leaf respiration by elevated CO₂ concentration is diminished, but not eliminated, under limiting nitrogen supply. *Plant, Cell and Environment* **37**: 886–898.

Masle J. 2000. The Effects of elevated CO(2) concentrations on cell division rates, growth patterns, and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization, and genotype. *Plant Physiology* **122**: 1399–1416.

Miyazama M, Pavan MA, Muraoka T et al. 1999. Análises químicas de tecido vegetal. In: Silva FC, et al, eds. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: 1999, 171–224.

Mochida K, Shinozaki K. 2010. Genomics and Bioinformatics Resources for Crop Improvement. *Plant and Cell Physiology* **51**: 497–523.

Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 651–81.

O'Hara LE, Paul MJ, Wingler A. 2013. How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate. *Molecular Plant* **6**: 261–274.

Obata T, Witt S, Lisek J, Palacios-Rojas N, Florez-Sarasa I, Araus JL, Cairns JE, Yousfi S, Fernie AR. 2015. Metabolite profiles of maize leaves in drought, heat and combined stress field trials reveal the relationship between metabolism and grain yield. *Plant Physiology* **169**: 2665–2583.

Oracz K, Bouteau HEM, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau

- F, Bailly C. 2007.** ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant Journal* **50**: 452–465.
- Pantin F, Simonneau T, Rolland G, Dauzat M, Muller B. 2011.** Control of leaf expansion: A developmental switch from metabolics to hydraulics. *Plant Physiology* **156**: 803–815.
- Pérez-López U, Miranda-Apodaca J, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A. 2013.** Barley growth and its underlying components are affected by elevated CO₂ and salt concentration. *Journal of Plant Growth Regulation* **32**: 732–744.
- Pérez-López U, Miranda-Apodaca J, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A. 2014.** Responses of nutrient dynamics in barley seedlings to the interaction of salinity and carbon dioxide enrichment. *Environmental and Experimental Botany* **99**: 86–99.
- Pérez-López U, Miranda-Apodaca J, Muñoz-Rueda A, Mena-Petite A. 2013.** Lettuce production and antioxidant capacity are differentially modified by salt stress and light intensity under ambient and elevated CO₂. *Journal of Plant Physiology* **170**: 1517–1525.
- Pérez-López U, Robredo A, Lacuesta M, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A. 2009.** The impact of salt stress on the water status of barley plants is partially mitigated by elevated CO₂. *Environmental and Experimental Botany* **66**: 463–470.
- Pérez-López U, Robredo A, Lacuesta M, Mena-Petite A, Muñoz-Rueda A. 2012.** Elevated CO₂ reduces stomatal and metabolic limitations on photosynthesis caused by salinity in *Hordeum vulgare*. *Photosynthesis Research* **111**: 269–283.
- Pérez-López U, Robredo A, Lacuesta M, Muñoz-Rueda A, Mena-Petite A. 2010.** Atmospheric CO₂ concentration influences the contributions of osmolyte accumulation and cell wall elasticity to salt tolerance in barley cultivars. *Journal of Plant Physiology* **167**: 15–22.
- Pérez-López U, Robredo A, Lacuesta M, Sgherri C, Mena-Petite A, Navari-Izzo F, Muñoz-Rueda A. 2010.** Lipoic acid and redox status in barley plants subjected to

salinity and elevated CO₂. *Physiologia Plantarum* **139**: 256–268.

Peterhansel C, Horst I, Niessen M, Blume C, Kebeish R, Kürkcüoğlu S, Kreuzaler F. 2010. Photorespiration. The Arabidopsis book / *American Society of Plant Biologists* **8**: e0130.

Piñero MC, Houdusse F, Garcia-Mina JM, Garnica M, del Amor FM. 2014. Regulation of hormonal responses of sweet pepper as affected by salinity and elevated CO₂ concentration. *Physiologia Plantarum* **151**: 375–389.

Richter JA, Erban A, Kopka J, Zörb C. 2015. Metabolic contribution to salt stress in two maize hybrids with contrasting resistance. *Plant Science* **233**: 107–115.

Salazar-Parra C, Aguirreolea J, Sánchez-Díaz M, Irigoyen JJ, Morales F. 2012. Climate change (elevated CO₂, elevated temperature and moderate drought) triggers the antioxidant enzymes' response of grapevine cv. Tempranillo, avoiding oxidative damage. *Physiologia Plantarum* **144**: 99–110.

Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL. 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C₃ leaves. *Plant, Cell & Environment* **30**: 1035–1040.

Stitt M, Lunn J, Usadel B. 2010. Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism - More than the icing on the cake. *Plant Journal* **61**: 1067–1091.

Sulpice R, Pyl E-T, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, Von Korff M, Steinhauser MC, Keurentjes JJB, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Altmann T, Stitt M. 2009. Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 10348–10353.

Takagi M, El-Shemy H a., Sasaki S, Toyama S, Kanai S, Saneoka H, Fujita K. 2009. Elevated CO₂ concentration alleviates salinity stress in tomato plant. *Acta Agriculturae*

Scandinavica, Section B - Plant Soil Science **59**: 87–96.

- Tavakkoli E, Fatehi F, Coventry S, Rengasamy P, McDonald GK. 2011.** Additive effects of Na⁺ and Cl⁻ ions on barley growth under salinity stress. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2189–2203.
- Taylor G, Tricker PJ, Zhang FZ, Alston VJ, Miglietta F, Kuzminsky E. 2003.** Spatial and Temporal Effects of Free-Air CO₂ Enrichment (POPFACE) on Leaf Growth, Cell Expansion, and Cell Production in a Closed Canopy of Poplar. *Plant Physiology* **131**: 177–185.
- Tsutsumi K, Konno M, Miyazawa SI, Miyao M. 2014.** Sites of action of elevated CO₂ on leaf development in rice: Discrimination between the effects of elevated CO₂ and nitrogen deficiency. *Plant and Cell Physiology* **55**: 258–268.
- Wang T, Tohge T, Ivakov A, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Mutwil M, Schippers JHM, Persson S. 2015.** Salt-related MYB1 coordinates abscisic acid biosynthesis and signaling during salt stress in arabidopsis. *Plant Physiology* **169**: 1027–1041.
- Watanabe CK, Sato S, Yanagisawa S, Uesono Y, Terashima I, Noguchi K. 2014.** Effects of elevated CO₂ on levels of primary metabolites and transcripts of genes encoding respiratory enzymes and their diurnal patterns in arabidopsis thaliana: Possible relationships with respiratory rates. *Plant and Cell Physiology* **55**: 341–357.
- Wiese a., Christ MM, Virnich O, Schurr U, Walter a. 2007.** Spatio-temporal leaf growth patterns of *Arabidopsis thaliana* and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New Phytologist* **174**: 752–761.
- Wu D, Cai S, Chen M, Ye L, Chen Z, Zhang H, Dai F, Wu F, Zhang G. 2013.** Tissue Metabolic Responses to Salt Stress in Wild and Cultivated Barley. *PLoS ONE* **8**.
- Xu Z, Jiang Y, Zhou G. 2015.** Response and adaptation of photosynthesis, respiration, and antioxidant systems to elevated CO₂ with environmental stress in plants. *Frontiers in*

Plant Science **6**: 701.

Yi C, Yao K, Cai S, Li H, Zhou J, Xia X, Shi K, Yu J, Foyer CH, Zhou Y. 2015. High atmospheric carbon dioxide-dependent alleviation of salt stress is linked to RESPIRATORY BURST OXIDASE 1 (*RBOH1*)-dependent H₂O₂ production in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Experimental Botany*: erv435.

Yu J, Sun L, Fan N, Yang Z, Huang B. 2015. Physiological factors involved in positive effects of elevated carbon dioxide concentration on Bermudagrass tolerance to salinity stress. *Environmental and Experimental Botany* **115**: 20–27.

Zhang HJ, Dong HZ, Li WJ, Zhang DM. 2012. Effects of soil salinity and plant density on yield and leaf senescence of field-grown cotton. *Journal of Agronomy and Crop Science* **198**: 27–37.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

Tabela S1. Níveis de metabólitos em folhas de plantas tratadas com NaCl, sob ambiente (400 mol mol⁻¹) e [CO₂] elevada (750 μmol mol⁻¹). Valores definidos em negrito diferem estatisticamente do respectivo controle, em nível de 5 % pelo teste *t*. Os dados são a média de 6 repetições ± erro da média.

Metabólitos	400 μmol CO ₂ mol ⁻¹		750 μmol CO ₂ mol ⁻¹	
	Controle	NaCl	Controle	NaCl
Frutose	1.00±0.06	0.89±0.07	1.00±0.15	0.58±0.05
Glicose	1.00±0.08	0.88±0.11	1.00±0.14	0.55±0.07
Glicerato	1.00±0.09	1.79±0.07	1.00±0.07	0.46±0.04
3-P-glicerato	1.00±0.10	0.61±0.05	1.00±0.11	1.64±0.15
Ácido láctico	1.00±0.08	1.15±0.14	1.00±0.07	1.04±0.12
<i>Myo</i> -inositol	1.00±0.04	1.63±0.02	1.00±0.08	1.15±0.14
Alanina	1.00±0.13	1.97±0.10	1.00±0.14	0.42±0.07
Arginina	1.00±0.05	1.34±0.08	1.00±0.04	1.16±0.14
Asparagina	1.00±0.04	1.23±0.05	1.00±0.04	0.84±0.05
Aspartato	1.00±0.07	1.42±0.09	1.00±0.06	0.47±0.05
Cisteína	1.00±0.11	1.22±0.06	1.00±0.11	0.91±0.12
Glutamato	1.00±0.08	0.94±0.07	1.00±0.05	0.92±0.10
Glutamina	1.00±0.10	1.16±0.05	1.00±0.12	0.85±0.07
Glicina	1.00±0.09	1.31±0.04	1.00±0.08	1.22±0.10
Lisina	1.00±0.12	0.88±0.16	1.00±0.10	1.14±0.05
Metionina	1.00±0.05	1.09±0.04	1.00±0.12	0.82±0.08
Ornitina	1.00±0.06	0.85±0.10	1.00±0.13	1.20±0.11
Fenilalanina	1.00±0.14	0.78±0.12	1.00±0.08	1.15±0.07
Prolina	1.00±0.10	6.88±0.19	1.00±0.12	1.62±0.15
Serina	1.00±0.08	1.66±0.08	1.00±0.04	1.07±0.06
Treonina	1.00±0.07	1.11±0.09	1.00±0.11	1.03±0.12
Triptofano	1.00±0.12	0.89±0.10	1.00±0.06	0.93±0.05
Tirosina	1.00±0.07	2.27±0.15	1.00±0.07	0.91±0.08
Valina	1.00±0.14	1.16±0.08	1.00±0.11	1.23±0.14
Citrato	1.00±0.11	0.37±0.07	1.00±0.11	1.21±0.14
Fumarato	1.00±0.07	0.23±0.03	1.00±0.08	1.10±0.09
GABA	1.00±0.10	0.84±0.14	1.00±0.10	1.12±0.15
Isocitrato	1.00±0.09	0.44±0.07	1.00±0.13	1.20±0.10
Malato	1.00±0.06	0.33±0.04	1.00±0.05	1.05±0.06
2 OxoGlutarato	1.00±0.07	0.37±0.03	1.00±0.12	1.14±0.15
Oxalacetato	1.00±0.08	0.58±0.07	1.00±0.10	1.50±0.12
Piruvato	1.00±0.05	0.78±0.14	1.00±0.07	1.18±0.09
Succinato	1.00±0.08	0.41±0.05	1.00±0.09	1.10±0.11

Tabela S2. Níveis de metabólitos em raízes de plantas tratadas com NaCl, sob ambiente (400 mol mol⁻¹) e [CO₂] elevada (750 μmol mol⁻¹). Valores definidos em negrito diferem estatisticamente do respectivo controle, em nível de 5 % pelo teste *t*. Os dados são a média de 6 repetições ± erro da média.

Metabólitos	400 μmol CO ₂ mol ⁻¹		750 μmol CO ₂ mol ⁻¹	
	Controle	NaCl	Controle	NaCl
Frutose	1.00±0.07	1.74±0.14	1.00±0.09	1.15±0.16
Glicose	1.00±0.06	1.86±0.10	1.00±0.13	1.11±0.10
3-P-glicerato	1.00±0.10	2.85±0.16	1.00±0.10	1.03±0.08
Ácido láctico	1.00±0.15	1.17±0.13	1.00±0.06	1.07±0.14
Manose	1.00±0.04	1.21±0.09	1.00±0.08	1.11±0.09
Alanina	1.00±0.07	1.41±0.08	1.00±0.13	1.10±0.12
Arginina	1.00±0.05	1.35±0.04	1.00±0.06	1.07±0.10
Asparagina	1.00±0.12	1.02±0.09	1.00±0.11	1.15±0.08
Aspartato	1.00±0.05	1.21±0.04	1.00±0.06	0.95±0.11
Glutamato	1.00±0.10	2.18±0.14	1.00±0.09	0.90±0.07
Glutamina	1.00±0.04	1.39±0.05	1.00±0.12	1.16±0.09
Glicina	1.00±0.06	1.52±0.07	1.00±0.16	1.01±0.08
Lisina	1.00±0.08	1.07±0.05	1.00±0.14	0.79±0.10
Metionina	1.00±0.05	0.89±0.09	1.00±0.06	1.03±0.05
Ornitina	1.00±0.11	1.16±0.10	1.00±0.09	0.90±0.11
Fenilalanina	1.00±0.09	1.05±0.08	1.00±0.11	0.93±0.05
Prolina	1.00±0.05	25.18±1.20	1.00±0.12	9.52±1.04
Serina	1.00±0.11	2.55±0.14	1.00±0.13	0.94±0.13
Treonina	1.00±0.13	1.82±0.10	1.00±0.07	0.96±0.08
Triptofano	1.00±0.04	0.67±0.05	1.00±0.08	1.05±0.12
Citrato	1.00±0.12	2.08±0.15	1.00±0.10	1.31±0.07
Fumarato	1.00±0.10	0.44±0.05	1.00±0.10	0.83±0.12
GABA	1.00±0.06	1.83±0.10	1.00±0.14	1.12±0.09
Isocitrato	1.00±0.05	1.77±0.09	1.00±0.09	1.01±0.13
Malato	1.00±0.09	0.57±0.06	1.00±0.10	0.92±0.05
2 Oxoglutarato	1.00±0.08	1.59±0.10	1.00±0.06	1.03±0.14
Oxalacetato	1.00±0.11	0.61±0.05	1.00±0.09	1.10±0.07
Piruvato	1.00±0.05	1.11±0.09	1.00±0.10	0.88±0.06
Succinato	1.00±0.09	0.62±0.04	1.00±0.15	0.78±0.14

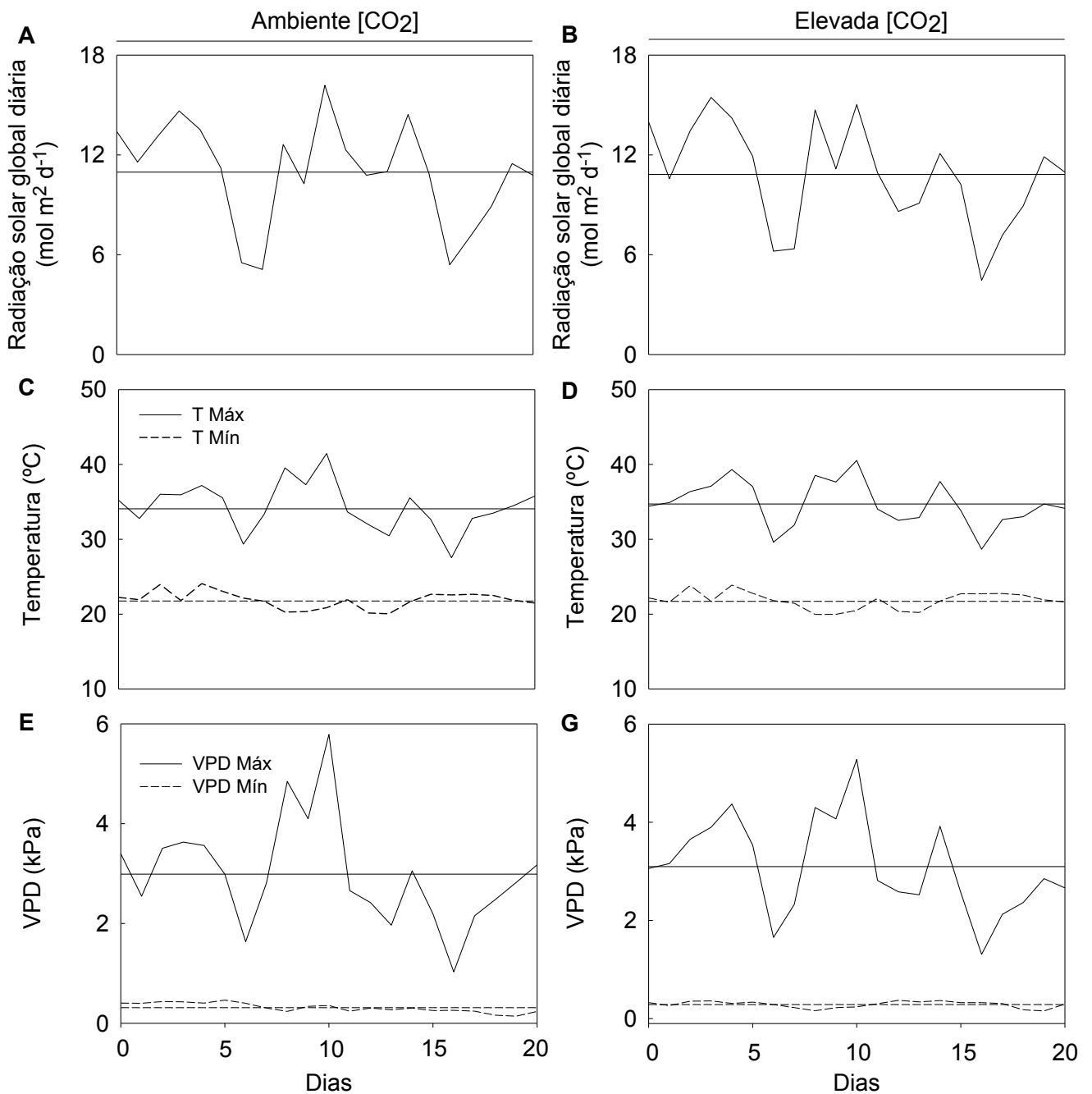


Figura S1. Variação da radiação solar diária global (A e B), temperaturas máximas e mínimas diárias (C e D) e déficit de pressão de vapor (E e G) máximos e mínimos ao longo do período de condução dos experimentos. Câmara de topo aberto suplementada com $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ (Esquerda), câmara de topo aberto suplementada com $750 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ (Direita). Linhas horizontais representam as médias dos valores. Os sensores de temperatura, umidade relativa foram instalados em abrigo meteorológico dentro das câmaras de topo aberto. Todos os sensores (LICOR) foram conectados a um sistema de aquisição de dados (LI-1400, LICOR, EUA), coletando-se os dados a cada minuto e armazenando-se o valor médio a cada 30 min.

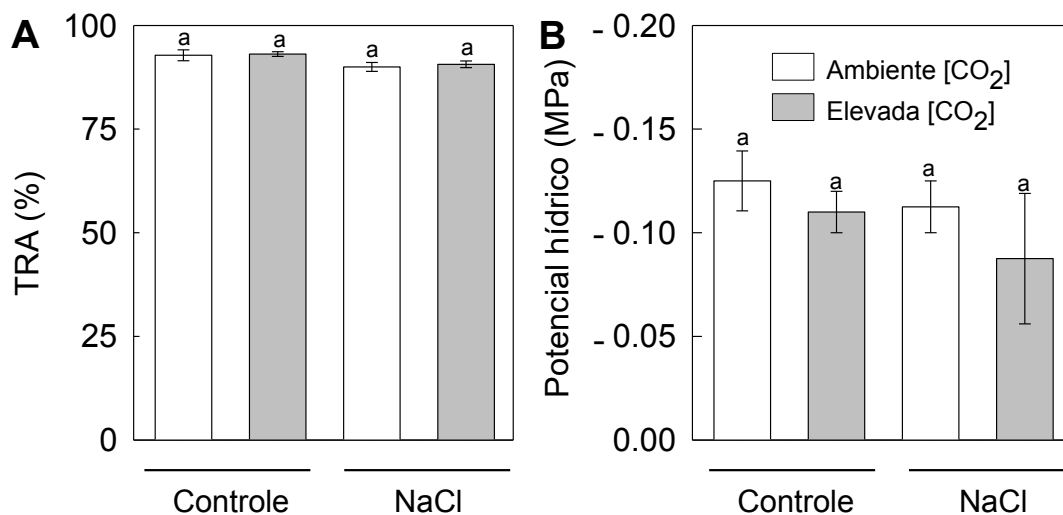


Figura S2. Teor relativo de água (TRA) e Potencial hídrico de plantas de tomate tratadas com NaCl, sob [CO₂] ambiente (400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e [CO₂] elevada (750 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias de 6 repetições \pm erro da média. O potencial hídrico foliar determinado em folhas individuais com uma bomba de pressão tipo Scholander, na antemanhã (González e González-Vilar 2001).

González L, González-Vilar M. 2001. Determination of Relative Water Content. In: *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Editor: Roger MJR. 2001. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

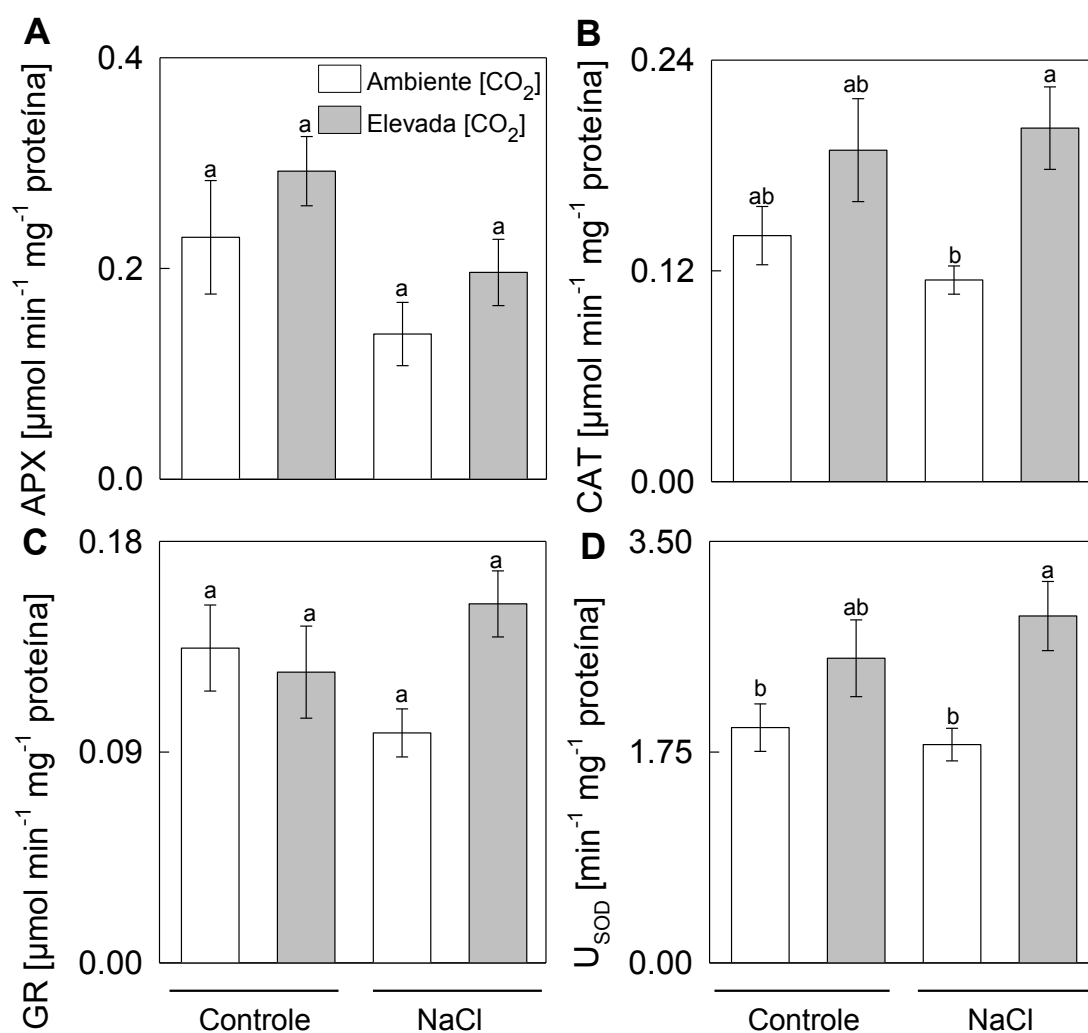


Figura S3. Atividade de enzimas do metabolismo antioxidativo em folhas de plantas de tomate tratadas com NaCl, sob $[\text{CO}_2]$ ambiente ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e $[\text{CO}_2]$ elevada ($750 \mu\text{mol mol}^{-1}$). Peroxidase do ascorbato (APX - EC 1.11.1.11) (A), Catalase (CAT - EC 1.11.1.6) (B), Redutase da glutathiona (GR - EC 1.6.4.2) (C) e Dismutase do superóxido (SOD - EC 1.15.1.1) (D). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si em nível de 5% pelo teste Tukey. Médias de 6 repetições \pm erro da média. Extração e determinações de atividades enzimáticas foram seguidas de acordo com Pinheiro et al (2004).

Pinheiro HÁ, DaMatta FM, Chaves A RM, Fontes EPB, Loureiro ME. 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canaphora* subjected to long-term drought. *Plant Science*. **167**: 1387-1314.