



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

LÍVIA LEITÃO CARDOSO

RESPOSTAS METABÓLICAS DE PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS AO
ESTRESSE SALINO

FORTALEZA

2024

LÍVIA LEITÃO CARDOSO

RESPOSTAS METABÓLICAS DE PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS AO ESTRESSE
SALINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará para obtenção do grau de mestre em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C264r Cardoso, Livia Leitão.

Respostas metabólicas de plantas de arroz submetidas ao estresse salino / Livia Leitão Cardoso. – 2024.

55 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso.

1. Oryza sativa L. 2. Metabolômica. 3. Perfil metabólico. 4. Variação espacial. 5. Plasticidade metabólica. I.

Título.

CDD 572

LÍVIA LEITÃO CARDOSO

RESPOSTAS METABÓLICAS DE PLANTAS DE ARROZ SUBMETIDAS AO ESTRESSE
SALINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará para obtenção do grau de mestre em Bioquímica.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 29/05/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Priscila Ariane Auler
Universidade de São Paulo (USP)

Dra. Stelamaris de Oliveira Paula Marinho
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

AGRADECIMENTOS

A Jesus meu guia e protetor que me relembra todo dia desse mundo maior que é feito de provas, expiações e qualquer etapa pode ser conquistada com fé, resiliência e paciência.

À minha mãe Vera por seu imenso e incomparável amor, carinho e porto seguro. Obrigada por ser minha amiga, minha guia e o meu exemplo de pesquisadora resiliente e acolhedora que me motiva sempre.

Ao meu pai Werther por todo o apoio, todos os abraços e todas as conversas acalmadoras durante momentos de desânimo e crises. Obrigada por ser uma brisa leve num redemoinho.

Ao meu irmão Bryan por ser o meu parceiro sempre, meu ombro amigo. Obrigada por ser um irmão incrível que me alegra sempre em momentos de tristeza.

Ao meu orientador professor Danilo por ter aceitado mais essa etapa da minha carreira científica e profissional. Obrigada pelo constante apoio, pelos ensinamentos, e pelas conversas profundas em momentos de decisões importantes e difíceis.

À família LabPlant, principalmente Alana, Bruno, Eva, Humaira, Jonatas, Samuel, Mateus, Janaína que contribuíram para a construção e execução desse projeto. Obrigada por fazer esse projeto tornar-se real e por compartilhar momentos incríveis na bancada.

Ao professor Simone Castellarin e a todos do grupo de pesquisa do *Wine Research Center* da Universidade de British Columbia por terem me acolhido e aberto tantas portas para expandir meu conhecimento e obter trocas internacionais na experiência de intercâmbio como pesquisadora visitante.

À professora Joana Pico Carbajo pelos dias e noites de experimentos e treinamentos que me permitiu aprofundar mais os meus conhecimentos.

À Beatriz Leitão por ter sido minha prima e amiga presente em todos os momentos difíceis e fez questão de me lembrar que a vida é mais leve e feliz com uma risada e uma amizade verdadeira.

À Gabrielle Fernandes e Ítalo Gomes, parceiros desde a graduação em Biotecnologia com constante apoio e motivação durante todo o processo compartilhado de continuar na pesquisa e na academia.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Universidade Federal do Ceará pelo suporte e infraestrutura durante estes dois anos.
As profas. Priscila Auler e Stelamaris de Oliveira pela participação na banca avaliadora.

*“A realização de todo feito extraordinário
consiste em ter um sonho
e acreditar nele”.*

Augusto Branco

RESUMO

As respostas das plantas à salinidade do solo tem sido investigada, porém, pouco se sabe sobre como o excesso de NaCl afeta o metabolismo de diferentes órgãos da planta. Objetivou-se investigar o efeito do estresse salino no crescimento e perfil metabólico de diferentes órgãos de plantas de arroz. Utilizou-se plantas de arroz crescidas em solução nutritiva contendo diferentes doses de NaCl (0, 16, 25 e 50 mM), análises comparativas de folhas, colmo e raiz a nível iônico (Na^+ e K^+), metabólico e de crescimento, usando material vegetal coletado de diferentes partes da planta. Os dados foram comparados via análise de variância, teste de Tukey e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Como esperado, plantas sob estresse salino apresentaram maiores concentrações de Na^+ e redução na razão K^+/Na^+ na raiz. Resultados similares foram encontrados nas diferentes porções do colmo (basal, médio e ápice) e das folhas basal e média sob quase todas as concentrações de NaCl. No entanto, não houve alterações nos níveis de Na^+ , K^+ e na razão entre eles nas folhas do ápice da planta, nas folhas bandeiras e panículas. O excesso de NaCl reduziu o crescimento das plantas, evidenciado pela menor biomassa acumulada nos diferentes órgãos da planta. No entanto, somente a biomassa da folha bandeira foi menor sob 16 mM de NaCl, quando comparado com o controle. A raiz foi o órgão que apresentou menor número de metabólitos em que os níveis foram significativamente alterados (apenas 4), quando comparado com o controle. No entanto, o perfil metabólico da raiz foi o mais discrepante entre os órgãos, independente da presença ou não do estresse. PLS-DA demonstrou que o único tratamento claramente separado do controle nos diferentes órgãos da planta foi o de 50 mM de NaCl, embora essa separação foi menos evidente na panícula e folha bandeira. Ademais, sob 16 mM de estresse salino, uma separação interessante foi observada, em que três grupos principais foram formados, compostos por raiz, panícula+colmo e folhas. Sob 25 mM de NaCl, as folhas bandeiras foram clusterizadas com os colmos e panícula, e não com as folhas, enquanto sob 50 mM de NaCl, quatro grupos foram formados, compostos por folhas, colmo+panícula, raiz e folha bandeira. Resultados de perfil metabólico indicam uma forte discrepância metabólica entre as diferentes partes da planta e o excesso de NaCl acentua essas diferenças espaciais na planta. As respostas iônicas, metabólicas e de crescimento ao estresse salino variam fortemente conforme os diferentes órgãos da parte aérea e radicular da planta de arroz.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L; metabolômica; perfil metabólico; variação espacial; plasticidade metabólica.

ABSTRACT

Although plant responses to soil salinity have been investigated, little is known about how excess NaCl affects the metabolism of different plant organs. The aim was to investigate the effect of the saline stress on the growth and metabolic profile of different organs of rice plants. Rice plants grown in nutrient solution containing different doses of NaCl (0, 16, 25 and 50 mM) were used. Comparative analyzes of leaves, stem and root were carried out at ionic (Na^+ and K^+), metabolic and growth levels, using plant material collected from different parts of the plant. The data obtained were compared using analysis of variance and Tukey's test, as well as partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). As expected, plants under saline stress contain higher concentrations of Na^+ and a reduction in the K^+/Na^+ ratio in the root. Similar results were found in different portions of the stem (basal, middle and apex) and in the basal and middle leaves under almost all NaCl concentrations. However, there were no changes in the levels of Na^+ , K^+ and the relationship between them in the apex leaves, flag leaves and panicles of the plant. Excess NaCl harms plant growth, evidenced by the lower biomass accumulated in the different organs of the plant as the NaCl concentration increases. However, only flag leaf biomass was lower under 16 mM NaCl when compared to control. The root was the organ that presented the lowest number of metabolites whose levels were significantly altered (only 4), when compared to the control. However, the metabolic profile of the root was the most discrepant among the organs, regardless of the presence or absence of stress. PLS-DA stated that the only treatment clearly separated from the control in different organs of the plant was 50 mM NaCl, although this separation was less evident in the panicle and flag leaf. Furthermore, under 16 mM salt stress, an interesting separation was observed, in which three main groups were formed, composed of root, panicle+stem and leaves. Under 25 mM NaCl, the flag leaves were grouped with the culms and panicle, and not with the leaves, while under 50 mM NaCl four groups were formed, composed of leaves, stem+panicle, root and flag leaf. The metabolic profile results show that there is a strong metabolic discrepancy between the different parts of the plant, which is independent of the presence of stress, but that excess NaCl accentuates these spatial differences in the plant. The ionic, metabolic and growth responses to salt stress vary strongly according to different shoot and root organs of the rice plant.

Keywords: *Oryza sativa* L; metabolomics; metabolic profiling; spatial variance; metabolic plasticity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Principais influências das mudanças nas condições ambientais na relação entre a dinâmica fonte-dreno.....	16
Figura 2 –	Mecanismo de resposta das plantas ao estresse salino.....	17
Figura 3 –	Esquema das quantidades de vasos e órgãos/partes da planta que foram coletados.....	20
Figura 4 –	Delineamento experimental. Plantas de arroz no estágio V6 foram submetidas a dois ciclos de estresse salino, considerado como 7 dias sob excesso de NaCl seguidos de 3 dias de recuperação com solução nutritiva de Hoagland.....	20
Figura 5 –	Representação visual de plantas de arroz para controle e tratamentos 16 mM, 25 mM e 50 mM de NaCl.....	27
Figura 6 –	Representação visual das plantas de arroz na ausência de NaCl (Controle), evidenciando o começo do desenvolvimento da panícula e perfilhos.....	27
Figura 7 –	Representação visual das plantas de arroz no tratamento 16 mM de NaCl, sintomas visuais de clorose em folhas senescentes e panícula.....	28
Figura 8 –	Representação visual das plantas de arroz no tratamento 25 mM de NaCl, panícula e sintomas visuais de clorose.....	28
Figura 9 –	Representação visual das plantas de arroz no tratamento 50 mM de NaCl, panícula, sintomas visuais de clorose em folhas senescentes e perfilhos em morte celular.....	29
Figura 10 –	Representação na forma de mapa de calor das concentrações de K^+ e Na^+ em diferentes órgãos de plantas de arroz. Plantas de arroz foram submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	30
Figura 11 –	Box plot das concentrações de Cl^- ($\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca) em diferentes partes (basal, mediana e apical) do colmo e folhas de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	31
Figura 12 –	Box plot das concentrações de Cl^- ($\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca) na folha bandeira e raiz de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	32
Figura 13 –	Box plot das concentrações de dano de membrana em folhas de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	33

Figura 14 –	Box plot da altura da planta (cm) (a) e comprimento da raiz (cm) (b) em plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	34
Figura 15 –	Box plot do número de folhas (a), panículas (b) e perfilhos (c) de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	35
Figura 16 –	Box plot da biomassa acumulada em diferentes partes de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	36
Figura 17–	Box plot da biomassa acumulada em diferentes partes (basal, mediana e apical) do colmo e folhas de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	37
Figura 18 –	Representação na forma de mapa de calor dos níveis relativos de metabólitos identificados na raiz de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	39
Figura 19 –	Representação na forma de mapa de calor dos níveis relativos de metabólitos identificados em diferentes partes (basal, mediana e apical) de folhas de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	40
Figura 20 –	Representação na forma de mapa de calor dos níveis relativos de metabólitos identificados em diferentes partes (basal, mediana e apical) do colmo de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	41
Figura 21	Representação na forma de mapa de calor dos níveis relativos de metabólitos identificados em panículas e folhas bandeiras de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	42
Figura 22 –	Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) usando os dados de perfil metabólico de diferentes órgãos de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.....	43
Figura 23 –	Diagrama de Venn demonstrando metabólitos que apresentam diferença estatística entre os órgãos nas diferentes condições (controle e sob 16mM, 25mM ou 50 mM de NaCl).....	43
Figura 24 –	Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) usando-se os dados de perfil metabólico de diferentes órgãos de plantas de arroz submetidas a 0 (a), 16 (b), 25 (c) ou 50 (d) mM de NaCl.....	44

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Lista de metabólitos encontrados na parte aérea e nas raízes da cultivar de arroz com seu nome, tempos de retenção e razão massa/carga utilizada para identificação.....	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
AgCl	Cloreto de prata
AgNO ₃	Nitrato de prata
Ca (NO ₃) ₂	Nitrato de cálcio
DM	Dano de membrana
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
K ⁺	Íon potássio
K ₂ CrO ₄	Cromato de potássio
Na ⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
PLS-DA	Análise discriminante de mínimo quadrados parciais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Definição de órgãos fonte-dreno e o metabolismo vegetal.....	14
1.2	Efeitos do estresse salino em plantas.....	16
2	HIPÓTESE.....	18
3	OBJETIVOS.....	18
4	METODOLOGIA.....	19
4.1	Material vegetal e condições de crescimento.....	19
4.2	Caracterização iônica.....	21
4.2.1	<i>Concentração de Sódio e Potássio.....</i>	21
4.2.2	<i>Concentração de Cloreto.....</i>	21
4.3	Extravasamento de Eletrólitos (dano de membrana).....	22
4.4	Extração e Análise metabólica.....	22
4.5	Análise Estatística.....	23
5	RESULTADOS.....	24
5.1	Parâmetros de crescimento e sintomas visuais de estresse.....	24
5.2	Caracterização do nível de estresse salino e o efeito no crescimento dos diferentes órgãos de plantas de arroz.....	24
5.3	As respostas metabólicas ao estresse salino variam entre os órgãos de plantas arroz.....	25
5.4	Diferenças espaciais nas respostas metabólicas de plantas de arroz ao estresse salino.....	26
6	DISCUSSÃO.....	45
6.1	Respostas de plantas de arroz à salinidade.....	45
6.2	Organização espacial do metabolismo de plantas de arroz sob salinidade.....	46
7	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura alimentar básica importante, sendo cultivada em áreas como Ásia, América Latina e África, com a produção de mais de 700 milhões de toneladas métricas no ano de 2017-2018 em uma área de aproximadamente 160 milhões de hectares (Razzaq *et al.*, 2019). No mercado mundial de arroz, a produção global em 2023/24 está projetada em um recorde de 518,1 milhões de toneladas, 5,1 milhões de toneladas a mais que o ano anterior. Em dezembro de 2023, a revisão da produção da Argentina, Paraguai, Coreia do Sul e Tailândia o que compensou ligeiramente as revisões em baixa da Colômbia, Haiti, Moçambique e Uganda. O uso doméstico e residual global em 2023/24 é projetado em um recorde de 525,0 milhões de toneladas (Childs; Lebeau, 2023).

É o segundo cereal mais cultivado no mundo, compondo a base da dieta de aproximadamente três bilhões de pessoas e particularmente no Brasil é um alimento tradicional e altamente consumido (Horn *et al.*, 2023). Dados de abril/2024 da safra 2023/24 mostram que a média ponderada na semeadura de arroz pela área total semeada dos estados de Tocantins (TO), Maranhão (MA), Mato Grosso (MT), Goiás (GO), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS) juntos correspondem a 88% da área cultivada no Brasil (Companhia Nacional de Abastecimento, 2024). Porém, apesar do arroz possuir extrema importância econômica e alto nível de produção, estresses abióticos causados pelas mudanças climáticas e ainda mais sobrecarregado pela crescente competição para recursos escassos como terra e água, limitam a produção de colheitas para suprir a demanda crescente da população humana (Shahid; Zaman; Heng, 2018).

A irrigação é a prática agrícola que utiliza um conjunto de equipamentos e técnicas para suprir a deficiência total ou parcial de água para as plantas. No RS, em determinadas épocas do ano, a água utilizada para irrigação pode ser contaminada com água do mar, elevando a concentração de sais no solo, prejudicando o desenvolvimento da cultura do arroz. Dentro desse contexto, o manejo inadequado em áreas com as águas de baixa qualidade, influencia ao aumento do estresse salino nessas culturas

A salinização está aumentando rapidamente em escala global e atualmente afeta mais de 10% das terras aráveis, o que resulta em um declínio dos rendimentos médios das principais culturas superior a 50% da produção (Wang *et al.*, 2009; Kleine *et al.*, 2021). Os níveis de produtividade são diretamente afetados com o aumento de sais no solo devido aos efeitos osmóticos iniciais e, conseqüentemente, aos efeitos iônicos que diminuem os processos-chaves de desenvolvimento, como a produção de grãos. Nesse contexto, entender como as

plantas de arroz respondem à salinidade do solo pode fornecer subsídios teóricos e práticos para melhorar as condições de crescimento e produção de arroz em escala global. Além disso, considera-se de extrema importância entender como as plantas de arroz respondem a essas condições adversas para a melhoria de culturas mais tolerantes aos efeitos negativos da salinidade.

Sabendo que as respostas à salinidade e sua tolerância são diferentes nos distintos estádios de desenvolvimento, torna-se uma característica complexa a ser estudada. Com isso, faz-se necessário investigar como o arroz responde aos constantes contatos a doses de NaCl para mimetizar essas áreas de produção afetada (Gheyi *et al.*, 2016).

O excesso de sal induz efeitos adversos em processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Em parâmetros morfofisiológicos, os efeitos incluem a inibição da germinação, o retardo do crescimento de raízes e brotos, inibição do crescimento e fotossíntese, resultando em biomassa reduzida e esterilidade parcial do grão, o que leva à diminuição da produção de arroz (HAQUE *et al.*, 2021). Os efeitos osmóticos, incluídos também nas respostas fisiológicas, são as modificações no potencial osmótico da planta, reduzindo o transporte da água. Com relação aos efeitos bioquímicos, tem-se a superprodução de radicais livres nos cloroplastos, diminuindo a concentração de gás carbônico e ocorrendo o fechamento dos estômatos (Ma; Dias; Freitas, 2020; Razzaq *et al.*, 2020; Marcondes; Garcia, 2021). Além disso, há também a redução na disponibilidade de NADP^+ que é aceptor de elétrons do fotossistema 1(FS1), ocorrendo a geração das espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir da hidrólise da água, que causam reações tóxicas mediadas por O_2^- e H_2O_2 que prejudicam as membranas celulares, levando a morte celular. A morte celular é caracterizada pelo aparecimento de manchas amareladas nas folhas principalmente, sendo então o sintoma visual predominante para avaliar o efeito do estresse salino (Silva, 2022; Cunha, 2023). Porém, para se obter um delineamento mais preciso do metabolismo vegetal durante essas respostas bioquímicas e fisiológicas, desperta-se a ideia de entender como são afetadas as rotas metabólicas e quais são os metabólitos presentes nessa resposta molecular.

As respostas moleculares podem ser estudadas por ferramentas analíticas. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) é o principal equipamento utilizado para separar, identificar e quantificar compostos voláteis e de até 1kDa de massa, incluindo açúcares, álcoois de açúcar, aminoácidos, ácidos orgânicos e poliaminas (Obata; Fernie, 2012). Com isso, estudos metabolômicos podem ajudar a identificar os principais possíveis metabólitos úteis como indicadores de adaptabilidade das espécies ao excesso de sal, a detectar os ajustes de grupos de compostos envolvidos na mediação da tolerância ao estresse

como osmorreguladores, e a investigar a flexibilidade de uma espécie de reorganizar as principais vias metabólicas para tolerar os efeitos adversos do estresse. Dentre as vias metabólicas, o estresse salino induz o acúmulo de componentes do metabolismo primário, destacando-se o metabolismo do carbono com moléculas como sacarose, tagatose, psicose, glucoheptose, idose, allose, talose, lactulose e celobiose, e o álcool de açúcar (inositol) e o metabolismo do nitrogênio com alantoína, ureia e glutamina (Slama *et al.*, 2015; Rajkumari *et al.*, 2023). Entretanto, existem poucos estudos referentes ao acúmulo desses metabólitos nos diferentes órgãos de plantas de arroz, mostrando uma deficiência no entendimento da planta como um todo.

No contexto da variação espacial, plantas são organismos sésseis com partes semiautônomas constituídas por diversos módulos, dentre estes tem-se as partes aéreas com folhas senescentes, folhas intermediárias e colmo, e partes radiculares (Lima Neto *et al.*, 2021). Esta divisão espacial destaca a variação como um componente crucial a ser investigado e para uma compreensão da planta é essencial integrar dados de seus diferentes órgãos. Embora haja numerosos estudos comparativos entre folhas bandeira e folhas senescentes) quando se trata da relação fonte-dreno (Pandey *et al.*, 2021), a pesquisa integrativa que abrange folhas, colmo e raiz de forma sistemática é escassa, especialmente utilizando ferramentas de bioinformática integrativas.

Com o intuito de examinar os efeitos prolongados do estresse salino no metabolismo das plantas, propõe-se a análise da adição de sal em intervalos e em doses diferentes, seguido por períodos de recuperação subsequentes (ciclos de estresse), visando compreender o impacto cumulativo no arroz. Essa abordagem visa identificar os níveis mínimos necessários para induzir modulações fenotípicas significativas, ao mesmo tempo em que se busca fortalecer a imunidade e promover o crescimento das plantas (Gomes, 2022; Villagómez-Aranda *et al.*, 2022). Essa pesquisa assume extrema importância para a produção global de arroz, pois ajuda a mitigar os efeitos adversos e as respostas variáveis às diferentes doses de estresse salino em grandes plantações.

1.1 Definição de órgãos fonte-dreno e o metabolismo vegetal

A assimilação de carbono nas plantas ocorre principalmente nas folhas, que convertem o carbono em glicose e outros açúcares para transporte para os órgãos dreno, como raízes e frutos e, para o crescimento vegetal (Dong; Beckles, 2019). Esse transporte pelo floema é crucial para o desenvolvimento das plantas, sendo afetado por estresses ambientais. Durante

o desenvolvimento do arroz, as panículas são os principais dreno, enquanto as folhas são as principais fontes de carboidratos, e fatores como a idade das folhas influenciam diretamente a atividade fonte-dreno e, conseqüentemente, o rendimento das culturas (Paul; Foyer, 2001; Durand *et al.*, 2018). Com isso, torna-se importante entender quais mecanismos são utilizados para o transporte de carbono.

Os carboidratos assimilados têm três destinos principais: armazenamento, alocação de energia para órgãos dreno e uso como precursores para vias metabólicas (Albacete; Martínez-Andújar; Pérez-Alfocea, 2014; Smith; Rao; Merchant, 2018; Rosado-Souza *et al.*, 2023). A regulação do "particionamento de carboidratos" entre diferentes órgãos é crucial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Fatores ambientais, como estresse abiótico, afetam essa relação, influenciando a senescência prematura das folhas, o acúmulo de assimilados e a atividade fotossintética, características da atividade fonte-dreno (Figura 1) (Durand *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021).

Dentre os carboidratos importantes para a dinâmica fonte-dreno, a sacarose desempenha um papel fundamental no transporte de açúcares entre órgãos das plantas, regulando a sinalização fisiológica e celular e atuando como um osmoprotetor importante (Chourasia *et al.*, 2021; Saddhe; Manuka; Penna, 2021). Em resposta ao estresse ambiental, enzimas catabólicas como a invertase e a sintase de sacarose convertem a sacarose em glicose, frutose e UDP-glicose. Outros açúcares, como a trealose, também desempenham papéis cruciais, atuando como osmólitos e protegendo a integridade da membrana. Metabólitos como trealose-6-fosfato (T6P) regulam a fotossíntese e o metabolismo de açúcares, influenciando diretamente o nível de sacarose por meio de um mecanismo de feedback negativo. Os frutanos, sintetizados no vacúolo, são essenciais para a estabilidade da membrana e são regulados por fructosiltransferases. Portanto, açúcares, fosfolipídios e osmólitos orgânicos são fundamentais para o entendimento das respostas da planta ao estresse salino.

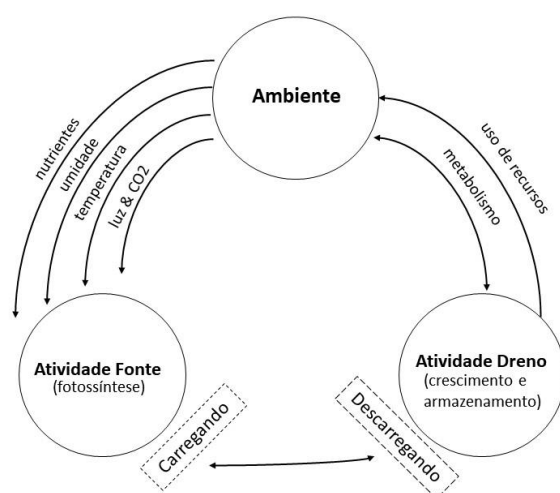


Figura 1 – Principais influências das mudanças nas condições ambientais na relação entre a dinâmica fonte-dreno.

Adaptado de Smith *et al* (2018).

1.2 Efeitos do estresse salino em plantas

A salinidade do solo representa um desafio significativo para a agricultura devido ao seu impacto negativo na produtividade das culturas (Huong; Anh; Tran *et al.*, 2020). O excesso de sal inibe diversos processos essenciais nas plantas, como germinação, crescimento de raízes e fotossíntese, levando à redução da biomassa, especialmente evidente em culturas sensíveis como o arroz. Além disso, ocorre a superprodução de radicais livres nos cloroplastos, resultando em danos celulares e morte celular, o que pode ser observado visualmente por meio de manchas amareladas nas folhas (Fraga *et al.*, 2010).

A compreensão desses mecanismos é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de mitigação e adaptação. Biomarcadores como a prolina e os açúcares são utilizados para monitorar o estresse salino e auxiliar na aclimação das plantas ao ambiente adverso, reduzindo os danos causados pelo excesso de radicais livres e combatendo o estresse oxidativo (Slama *et al.*, 2015; Munns *et al.*, 2020). No entanto, ainda há muito a ser compreendido sobre os processos-chave envolvidos na adaptação das plantas ao estresse abiótico, principalmente no recorte do metabolismo primário e secundário.

Os mecanismos de tolerância ao sal envolvem tanto ajustes fisiológicos, como a exclusão iônica e a compensação osmótica, quanto respostas moleculares complexas, incluindo a percepção de sinais no citosol e a expressão de genes relacionados ao estresse (Figura 2). Para enfrentar o estresse salino, as plantas empregam uma variedade de respostas metabólicas e

moleculares. Isso inclui a produção de osmoprotetores, como prolina, glicina betaína, trealose e mio-inositol, que protegem as células da desidratação e da salinidade (Kumar *et al.*, 2013; Shahzad *et al.*, 2022).

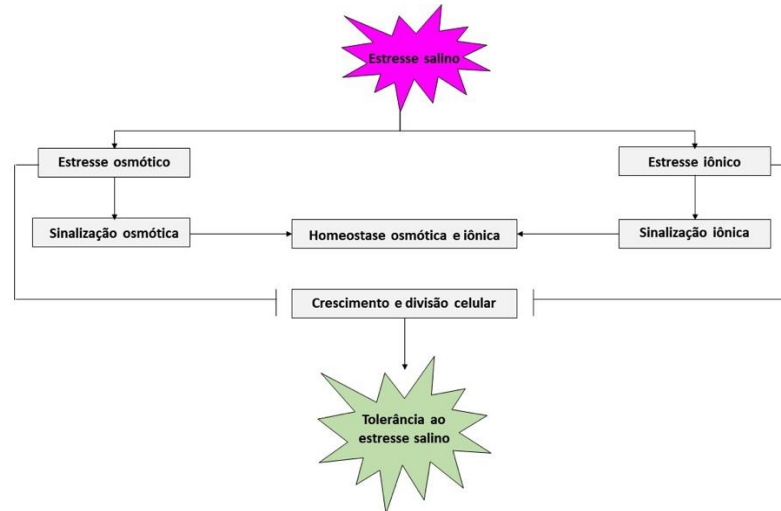


Figura 2 – Mecanismo de resposta das plantas ao estresse salino. Adaptado de Kumar *et al* (2013).

2 HIPÓTESE

As respostas metabólicas de plantas de arroz submetidas ao estresse salino apresentam variações espaciais entre as diferentes folhas, partes do colmo e raiz, com diferenças conforme a intensidade do estresse, sendo essas respostas associadas às vias metabólicas adaptativas em cada local da planta.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar o efeito do estresse salino no crescimento e perfil metabólico de diferentes órgãos de plantas de arroz

Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de aclimação das plantas em diferentes níveis de estresse salino.
- Analisar o efeito do estresse salino no acúmulo de biomassa de diferentes órgãos de plantas de arroz.
- Avaliar a variabilidade espacial das respostas metabólicas de órgãos fonte e dreno de plantas de arroz sob diferentes intensidades de estresse salino.
- Avaliar quais metabólitos primários são responsivos ao estresse salino nos diferentes órgãos de plantas de arroz.

4 METODOLOGIA

4.1 Material vegetal e condições de crescimento

O experimento foi feito em esquema fatorial 4 x 9, sendo 4 níveis de concentração de NaCl (0, 16 mM, 25 mM e 50 mM) e 9 partes da planta analisadas (raiz, folha bandeira, panícula e três partes das folhas e colmo (basal, mediana e apical), escolhidas para avaliar os diferentes tecidos e órgãos aos efeitos adversos da salinização (Figura 3).

Destaca-se que a folha bandeira nas plantas de arroz é a última a surgir num caule florido maduro, indicado a transição do crescimento da lavoura para a produção dos grãos sendo a folha mais importante com para o potencial de rendimento, pois é nela que a fotossíntese fornece a maioria dos carboidratos necessários para o enchimento dos grãos (Acevedo-Siaca *et al.*, 2021). Já a panícula é uma inflorescência (conjunto de flores) do arroz. Localiza-se sobre o último entrenó do caule. É composta pelo ráquis, que possui nós, em número de 8 a 10, dos quais saem as ramificações primárias que, por sua vez, dão origem às ramificações secundárias (Guimarães; Fageria; Barbosa Filho, 2002).

Os níveis de concentração salina utilizados foram de 16 mM, baseado no estudo de Granja (2010), 25mM e 50mM, de acordo com estudos anteriores do grupo de pesquisa a que faz parte esse estudo. A menor concentração foi utilizada com o intuito de mimetizar as culturas de irrigação com águas contaminadas em baixas doses. As concentrações foram consideradas como níveis diferentes de estresse, sendo o controle a ausência de estresse, 16 mM de NaCl considerado leve, 25 mM de NaCl considerada moderada e 50mM de NaCl considerada severo, com base em estudos anteriores (Negrão *et al.*, 2011).

As sementes foram primeiramente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio 1,5% por 15 minutos, seguido da lavagem com água esterilizada e depois colocadas para germinar em papel Germitest embebido em água destilada, na proporção de 2.5 vezes o peso seco do substrato. Os rolos de papéis com as sementes foram colocados em uma câmara de crescimento a temperatura de 30 °C e um fotoperíodo (12:12) por dez dias, período suficiente para que o coleóptilo pudesse apresentar um tamanho aproximado de 5cm.

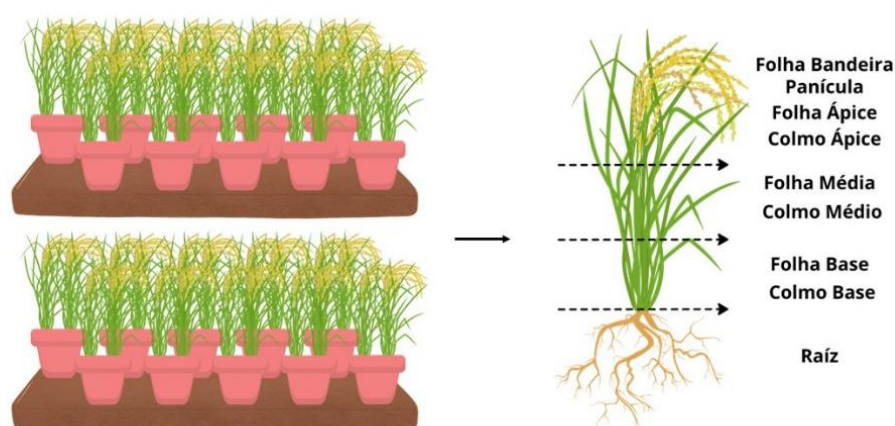


Figura 3 – Esquema das quantidades de vasos e órgãos/partes da planta que foram coletados.
Fonte: Elaborada pela autora

Após o período na câmara, as sementes foram transferidas para suportes de isopor fixados em potes de 3,7 L, com as raízes completamente submergidas em solução nutritiva de Hoagland (Hoagland; Arnon, 1950). Após o período de aclimação e atingir o estágio V6, as plantas receberam o tratamento de adição de sal nas proporções descritas anteriormente e seguindo o esquema: 7 dias sob estresse salino e 3 dias sob recuperação apenas com solução nutritiva de Hoagland, sendo trocada a cada fim dos períodos, totalizando duas trocas por ciclo (Figura 4). No final do experimento, 2 ciclos de estresse e recuperação seguidos foram contabilizados e a coleta ocorreu após um terceiro e último ciclo de estresse (41 dias contínuos), quando as plantas já estavam no estágio reprodutivo R5, evidenciando o aparecimento da diferenciação da panícula.

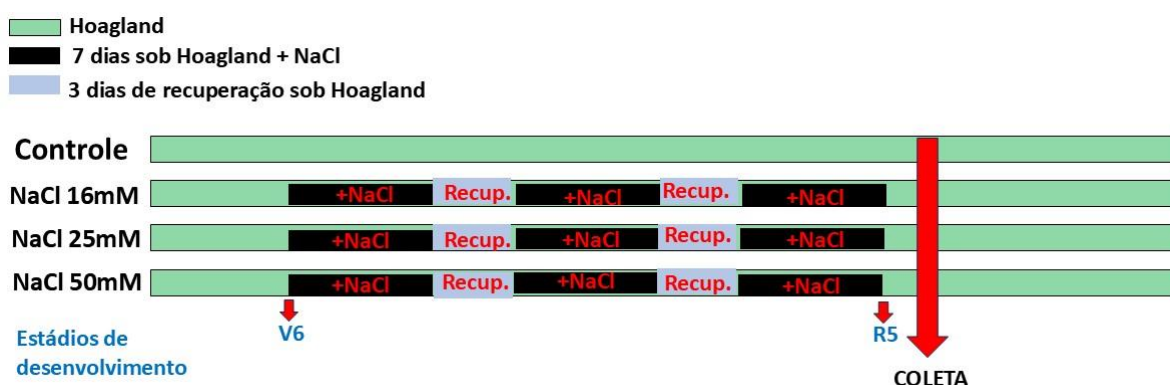


Figura 4 – Delineamento experimental. Plantas de arroz no estágio V6 foram submetidas a dois ciclos de estresse salino, considerado como 7 dias sob excesso de NaCl seguidos de 3 dias de recuperação com solução nutritiva de Hoagland.

Nota: Após esses dois ciclos, as plantas foram novamente submetidas ao excesso de NaCl por 7 dias, quando então foram coletadas para análises de crescimento e bioquímicas.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2 Caracterização iônica

4.2.1 Concentração de Sódio e Potássio

Após a coleta do material, foram feitas as medições de sódio e potássio, utilizando o método por fotometria de chama. A fotometria de chama é uma técnica espectroscópica de emissão em que a amostra em solução é introduzida na chama em forma de aerossol (nebulizada). A função da chama neste caso é excitar os elétrons nos íons (cátions) constituintes da amostra. A radiação emitida (que é diretamente proporcional à concentração do íon na amostra) é então quantificada através de uma célula fotoelétrica, a qual conectada a um galvanômetro permite a avaliação da concentração do íon que fora excitado, por comparação com soluções padrões. Então, foram transferidos 50,0 mg do material liofilizado para tubos de ensaio (com rosca e tampa), depois adicionado 20 mL de água deionizada e levados ao banho-maria por 1 hora a 100 °C. Após a extração o extrato foi filtrado e coletado o sobrenadante (extrato total) para posterior determinação de sódio e potássio. De posse das leituras fotométricas das amostras, proceder os cálculos das concentrações de Na^+ e K^+ , tendo como referência as equações obtidas para as curvas padrões e os resultados são expressos em $\text{mol Na}^+.\text{kg}^{-1}$ de matéria seca e $\text{mol K}^+.\text{kg}^{-1}$ matéria seca.

4.2.2 Concentração de Cloreto

O método de concentração de cloreto por titulação foi utilizado baseado nos trabalhos de Lacroix, Keeney e Walsh (1970). O cloro extraído pela solução de nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), na forma de íon cloreto foi titulado com solução padronizada de nitrato de prata (AgNO_3), na presença de cromato de potássio (K_2CrO_4) como indicador. O ponto final da titulação é identificado pela coloração vermelha, resultante da formação de cloreto de prata (AgCl) depois de toda a precipitação do cloreto, pois o cromato de prata é mais solúvel que o cloreto de prata. Após a titulação, é calculado a porcentagem de cloreto no material vegetal pela fórmula: $\% \text{Cl}^- = (\text{V1} - \text{V0}) * \text{fc}$.

Onde: V1 = Volume gasto de AgNO_3 na titulação da amostra, em mL; V0 = Volume gasto na titulação da prova em branco, em mL; fc = fator de correção da solução de AgNO_3 .

4.3 Extravasamento de eletrólitos (dano de membrana)

Para analisar e quantificar o nível de estresse oxidativo das plantas, foram realizadas medições de dano de membrana utilizando a metodologia de extravasamento de eletrólitos. O método baseou-se em avaliar indiretamente os danos, nas membranas, causados pelo tratamento. A estimativa do dano de membrana (DM) em vegetais foi utilizada como ferramenta para avaliação da integridade celular. Essa medida baseou-se no vazamento de eletrólitos das células para o meio extracelular, que foi obtida por meio de medidas de condutividade elétrica em meio líquido contendo segmentos do tecido. Essa medida de dano de membrana teve o objetivo de avaliar a perda da integridade da estrutura de membranas celulares, o que indicou um mau funcionamento do organismo. Para a obtenção desses dados, foi calculada uma razão entre o conteúdo de substâncias eletrolíticas presentes no apoplasto e o conteúdo total de eletrólitos (obtido após fervura), seguindo a fórmula: $\%DM = C1 / C2 * 100$.

Onde: %DM = percentual de danos de membrana; C1 = Condutividade inicial; C2 = Condutividade final.

4.4 Extração e Análise metabólica

Após a coleta, as amostras foram liofilizadas e armazenadas em freezer a -80 °C. A extração de metabólitos polares das folhas, dos colmos e das raízes foi realizada de acordo com Lisec *et al.* (2006). Primeiramente, 50 mg de tecidos macerados foram pesados e homogeneizados no Thermoshaker por 3 minutos a 15 Hz. Em seguida, foram adicionados 700 µL de metanol 100% e 30 µL de solução estoque de ribitol como padrão quantitativo interno. A mistura foi aquecida a 70 °C por 15 minutos e centrifugada a 12.000 g. Posteriormente, uma alíquota de 500 µL foi transferida para um novo tubo de 2mL, ao qual foi adicionado clorofórmio, com posterior agitação no vórtex por 15 segundos. Esse processo foi repetido após a adição de água MiliQ para promover a separação das fases polar e apolar, que através da centrifugação por 15 minutos a 10.000 Rgf.

Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi seca em SpeedVac por no mínimo 12 horas e ressolubilizada em 20 µL de solução de cloridrato de metoxiamina em piridina (10mg/0,5mL de piridina). A solução foi mantida a 37 °C por 120 minutos para formação de oximas, bloqueando a interconversão de estruturas cíclicas e a acilação de açúcares redutores, ou seja, evitando a mutarotação (Gullberg *et al.*, 2004). Em seguida, 35 µL de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) foram adicionados a cada microtubo, que foi

aquecido a 37 °C por 30 minutos, concluindo o processo de derivatização.

Os cromatogramas foram obtidos utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS, QP-PLUS 2010, Shimadzu, Japão). Uma alíquota de 1,0 µL de amostra foi injetada em modo split (proporção 1:10) em uma coluna capilar RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) para separar os metabólitos. A vazão do gás de arraste (He) foi ajustada para 1,2 mL/min, e o forno foi programado com uma temperatura inicial de 80 °C por 2 minutos, aumentando a 10 °C/min até 315 °C, sendo mantido nessa temperatura por 8 minutos. A temperatura de injeção e da fonte de íons foi mantida a 250 °C, e a temperatura da interface do espectrômetro de massa foi ajustada para 230 °C. O espectrômetro de massa foi operado a 70 eV (ionização eletrônica, EI). A faixa de varredura utilizada abrangeu a razão massa-carga de 40–700 (m/z), iniciada após o tempo de corte do solvente de 4 minutos. Tanto o cromatograma quanto a análise espectral de massa foram processados utilizando o *software* MassHunter B.07.00 da Agilent Technologies.

A identificação dos compostos foi baseada em seus tempos de retenção espectral de massa e fragmentação, utilizando os espectros de massa da biblioteca NIST, além dos tempos de retenção de metabólitos padrão previamente realizados com base no banco de dados Golm Metabolome Database. O nível relativo de cada metabólito foi determinado dividindo-se sua respectiva área de massa de pico mais alta pela área de massa de pico mais alta do padrão interno (ribitol, Sigma-Aldrich) e, posteriormente, pela massa fresca utilizada na extração. A quantificação relativa dos metabólitos para folhas e raízes foi carregada separadamente no servidor MetaboAnalyst 5.0 ([//www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca)) para análises estatísticas.

4.5 Análise Estatística

Diferenças significativas entre os tratamentos foram determinadas usando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($P < 0.05$) usando o software Minitab versão 21.1.0 (Minitab Inc., State College, PA, USA). Os dados de perfil metabólico foram analisados por Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) usando a plataforma Metaboanalyst® 5.0 (Chong *et al.*, 2018). Os dados de perfil metabólico foram normalizados por raiz cúbica e usando a opção *pareto scaling* na mesma plataforma.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros de crescimento e sintomas visuais de estresse

Foram observados sintomas de estresse logo na primeira semana após adição do NaCl na solução nutritiva. A altura das plantas foi uma característica fenotípica importante para aclimação com diferenças perceptíveis. Plantas dos vasos controle mantiveram o crescimento esperado durante todo os ciclos de estresse, enquanto os demais tratamentos apresentaram retardamento do crescimento (Figura 5). O estresse salino aumentou a incidência de sintomas de clorose nas plantas, inclusive em folhas mais novas, sendo mais evidente no tratamento de estresse mais severo. As plantas de vasos do tratamento 50 mM apresentaram sintomas de clorose mais evidente em comparação as plantas sob 16 mM e 25 mM de NaCl (Figuras 6-9).

5.2 Caracterização do nível de estresse salino e o efeito no crescimento dos diferentes órgãos de plantas de arroz

Plantas sob estresse salino exibem aumentos substanciais nas concentrações de Na^+ e Cl^- bem como alterações nas concentrações de K^+ em seus tecidos (Batista *et al.*, 2019). Assim, visto que nosso trabalho envolve a investigação dos efeitos do estresse salino de forma espacial na planta, diferentes órgãos das plantas foram coletados separadamente para análise de Na^+ , K^+ e Cl^- . Maior acúmulo de Na^+ foi observado na raiz, colmos (basal, médio e ápice) e folhas (basal e médio) sob quase sob todas as concentrações de NaCl. Embora a variação das concentrações de K^+ foram menores do que de Na^+ nesses órgãos, a razão K^+/Na^+ foi substancialmente reduzida na raiz, colmo e folhas basais sob todas as concentrações de NaCl. Interessantemente, não houve alterações nos níveis de Na^+ e K^+ nas folhas ápice, folha bandeira e panícula, com exceção de um aumento e diminuição na concentração de K^+ na folha bandeira e panícula respectivamente sob 50 mM de NaCl (Figura 10). No que concerne às concentrações de cloreto, observamos um aumento na concentração deste íon em todos os órgãos de acordo com o aumento da concentração de NaCl aplicada, sendo o tratamento de 50 mM o com maior contraste ao controle, com exceção das folhas basais (Figuras 11 e 12).

Não houve alterações nos danos de membrana (DM) em plantas submetidas ao estresse salino (Figura 13). No entanto, o crescimento foi substancialmente afetado pelo excesso de NaCl. Enquanto a altura da planta e os números de folhas, panículas e perfilhos diminuíram,

o comprimento da raiz aumentou de acordo com os aumentos das concentrações de NaCl (Figuras 14 e 15).

Posteriormente, determinou-se a biomassa acumulada nos diferentes órgãos da planta. A biomassa total da planta, da parte aérea, da panícula bem como de todas as folhas e todas as partes do colmo diminuíram com o aumento da concentração de NaCl, em que as reduções foram significativas somente sob 25 mM e 50 mM de NaCl, comparado com o controle. Já a biomassa da folha bandeira foi reduzida em todas as concentrações de NaCl, incluindo 16 mM. Não houve diferenças no acúmulo de biomassa nas folhas mortas, raízes e na razão parte aérea/raiz (Figura 16). Comparando as folhas e as partes do colmo da base, porção mediana e apical da planta, a redução no crescimento imposta pelo estresse salino variou de acordo com o local e órgão. No colmo, não houve alteração no acúmulo de biomassa na parte apical, enquanto nas porções média e basal a redução foi progressiva de acordo com o aumento na concentração de NaCl. Nas folhas, não houve alteração no acúmulo de biomassa na parte basal, enquanto somente a concentração de 50 mM NaCl reduziu esse parâmetro nas folhas ao ápice e medianas (Figura 17).

5.3 As respostas metabólicas ao estresse salino variam entre os órgãos de plantas de arroz

Diferentes partes de plantas de arroz foram congeladas separadamente para análise de perfil metabólico usando uma plataforma de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) que identifica principalmente metabólitos primários (Lisec *et al.*, 2006). Foram identificados entre 27 e 42 metabólitos entre os grupos (Tabela 1).

A raiz foi o órgão que apresentou menor número de metabólitos significativamente alterados (apenas 4), quando comparado com o respectivo controle (Figura 18). Nos outros órgãos, o número de metabólitos significativamente alterado variou entre 10 nas folhas (basal, média e ápice), 14 nos colmos (basal, média e ápice), 16 na folha bandeira e 9 na panícula (Figura 19-21). Em comum, nota-se o acúmulo de valina na raiz, folha basal, folha ápice e panícula sob diferentes concentrações de NaCl. Ademais, os níveis de malato foram menores nas folhas (basal, média e ápice) em quase todas as concentrações de NaCl bem como no colmo médio nas três concentrações de NaCl (Figuras 19-20). No entanto, as raízes apresentaram aumento na concentração deste metabólito, assim como de citrato e piroglutamato sob 50 mM de NaCl (Figura 18). Interessantemente, os níveis de diversos metabólitos como asparagina, erythronic acid, valina e glicose apresentaram aumento e diminuição na panícula e folha bandeira em resposta ao sal, respectivamente (Figura 21).

Esses dados foram posteriormente analisados via PLS-DA (*Partial Least Square Discriminant Analysis*), para verificar o quão diferente foram as respostas ao sal em relação ao controle em cada órgão. Os resultados demonstraram que o único tratamento claramente separado do controle foi o de 50 mM de NaCl, em que foi separado do controle pelo componente 1 na raiz, folhas (basal, média e ápice) e colmos (basal, média e ápice). No entanto, essa separação foi menos evidente na panícula e folha bandeira, em que uma certa intersecção entre todos os tratamentos (controle e NaCl) foi observado (Figura 22). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que as respostas metabólicas à salinidade variam fortemente entre os órgãos e até mesmo entre órgãos de diferentes partes da planta (basal, média e ápice), porém em menor grau.

5.4 Diferenças espaciais nas respostas metabólicas de plantas de arroz ao estresse salino

Como forma de melhor entender as respostas metabólicas espaciais nas plantas de arroz, os diferentes órgãos foram comparados entre si nas diferentes doses de sal. Primeiramente, foi criado um diagrama de Venn com dados oriundos da análise de variância realizada para desvendar quais metabólitos diferem estatisticamente entre os órgãos em cada tratamento. 14 metabólitos foram identificados com alguma diferença estatística entre os órgãos independente da condição da planta (estressada ou não). Dentre estes metabólitos, destaca-se os níveis de glicose e metabólitos do ciclo de Krebs (malato, succinato, 2-oxoglutarato e citrato), além de outros (Figura 23). Diversos metabólitos foram encontrados nas intersecções dos diferentes níveis de estresse salino, sendo que tagatose, serina, piroglutamato, glicoheptose e asparagina apresentaram diferenças significativa entre os órgãos sob excesso de NaCl. Metabólitos sabidamente responsivos a diversos fatores de estresse abióticos como valina, mio-inositol, sacarose, trehalose, alanina e treonina diferiram entre os órgãos somente sob 25 mM de NaCl. Oxaloacetato, ácido quínico e glutamato foram encontrados na intersecção 16x25 mM enquanto lactato e GABA foram encontrados na intersecção 25x50 mM de NaCl (Figura 23). Esses resultados indicam que há uma forte discrepância metabólica entre as diferentes partes da planta, que é independente da presença de estresse, mas que o excesso de NaCl acentua essas diferenças espaciais na planta, em que outros 16 metabólitos apresentam diferenças entre os órgãos sob NaCl.

Os diferentes órgãos foram também comparados via PLS-DA. De maneira geral, a raiz foi o órgão mais discrepante, independente da presença ou não do estresse, sendo separado dos demais tratamentos no controle e sob NaCl (Figuras 24a-d). Na ausência de estresse e sob

16mM de estresse salino, uma separação interessante foi observada, em que três grupos principais foram formados, compostos por raiz, panícula+colmos (basal, média e ápice) e folhas (basal, média, ápice e bandeira) (Figuras 24a-b). Os resultados de PLS-DA foram similares sob 25 mM de NaCl, com exceção de que as folhas bandeiras foram clusterizadas junto aos colmos e panícula e não com as folhas (basal, média e ápice) (Figura 24c). Sob 50 mM de NaCl, quatro grupos foram formados, compostos por folhas (basal, média e ápice), colmos + panícula, raiz e folha bandeira (Figura 24d). Esses resultados indicam uma completa distinção metabólica entre órgãos fonte (folhas) e dreno (raiz), enquanto colmos apresenta-se como um órgão intermediário entre fonte e dreno (do ponto de vista metabólico).

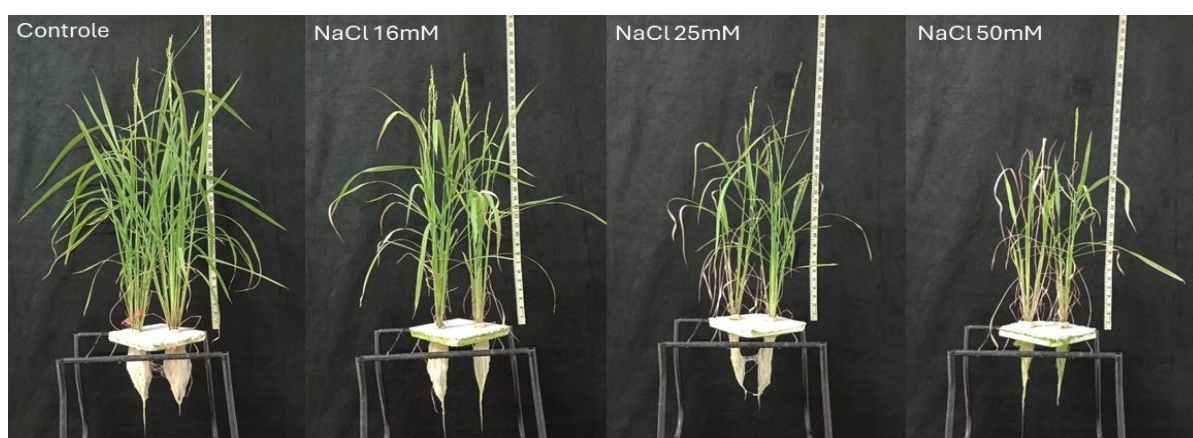


Figura 5 – Representação visual de plantas de arroz para controle e tratamentos 16 mM, 25 mM e 50 mM de NaCl.

Nota: As imagens das plantas foram obtidas no dia da coleta.



Figura 6 – Representação visual das plantas de arroz na ausência de NaCl (Controle), evidenciando o começo do desenvolvimento da panícula e perfilhos.



Figura 7 – Representação visual das plantas de arroz no tratamento 16 mM de NaCl, sintomas visuais de clorose em folhas senescentes e panícula.



Figura 8 – Representação visual das plantas de arroz no tratamento 25 mM de NaCl, panícula e sintomas visuais de clorose.



Figura 9 – Representação visual das plantas de arroz no tratamento 50 mM de NaCl, panícula, sintomas visuais de clorose em folhas senescentes e perfilhos em morte celular.

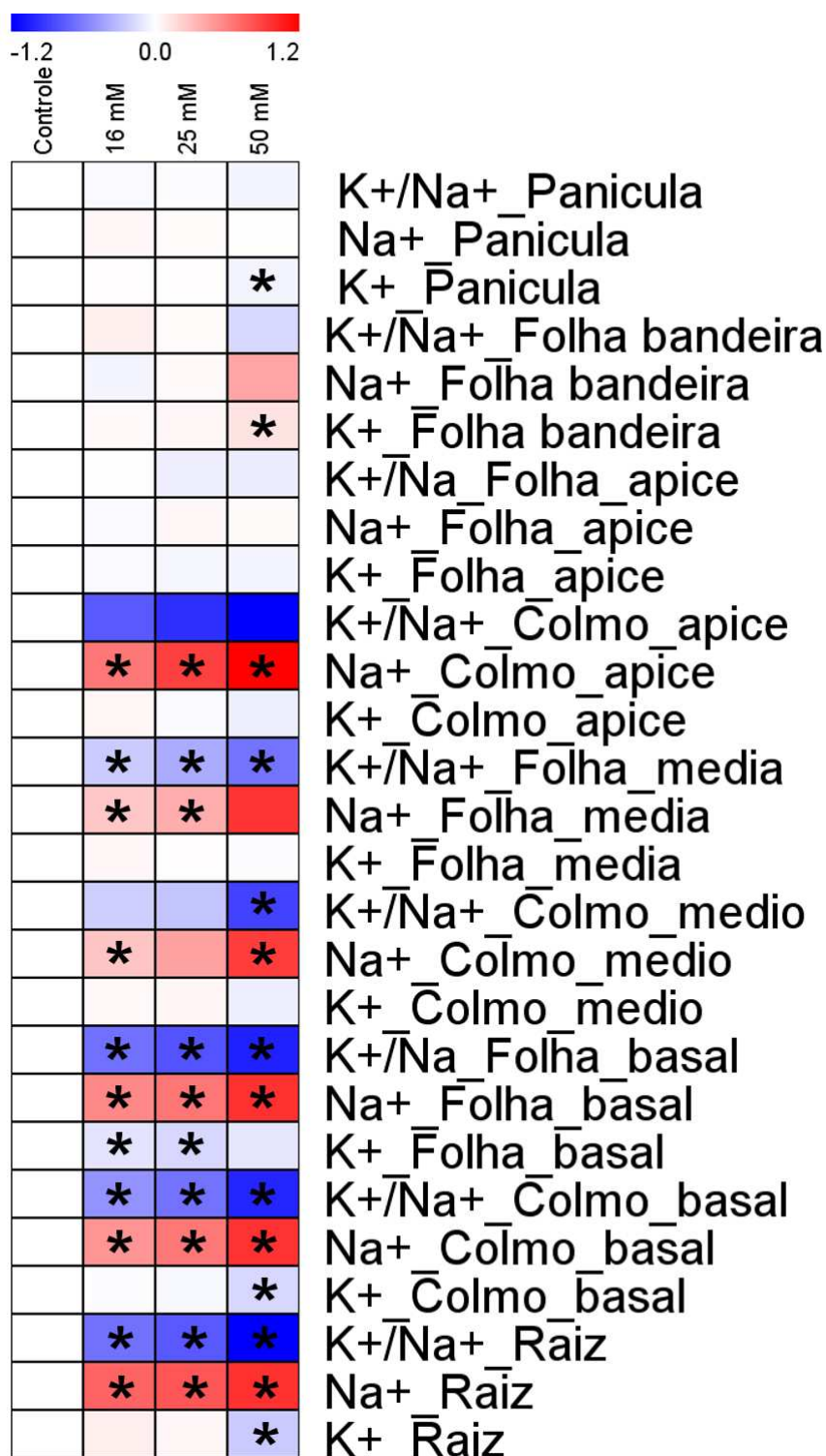


Figura 10 – Representação na forma de mapa de calor das concentrações de K⁺ e Na⁺ em diferentes órgãos de plantas de arroz. Plantas de arroz foram submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: As concentrações (mmol kg⁻¹ massa fresca) de K⁺ e Na⁺ foram normalizadas de acordo com a média do controle e log2 transformadas para a criação do mapa de calor. Valores em vermelho e azul com asteriscos indicam aumento e diminuição significativa em relação ao controle pelo teste t de Student's ($P < 0.05$), respectivamente.

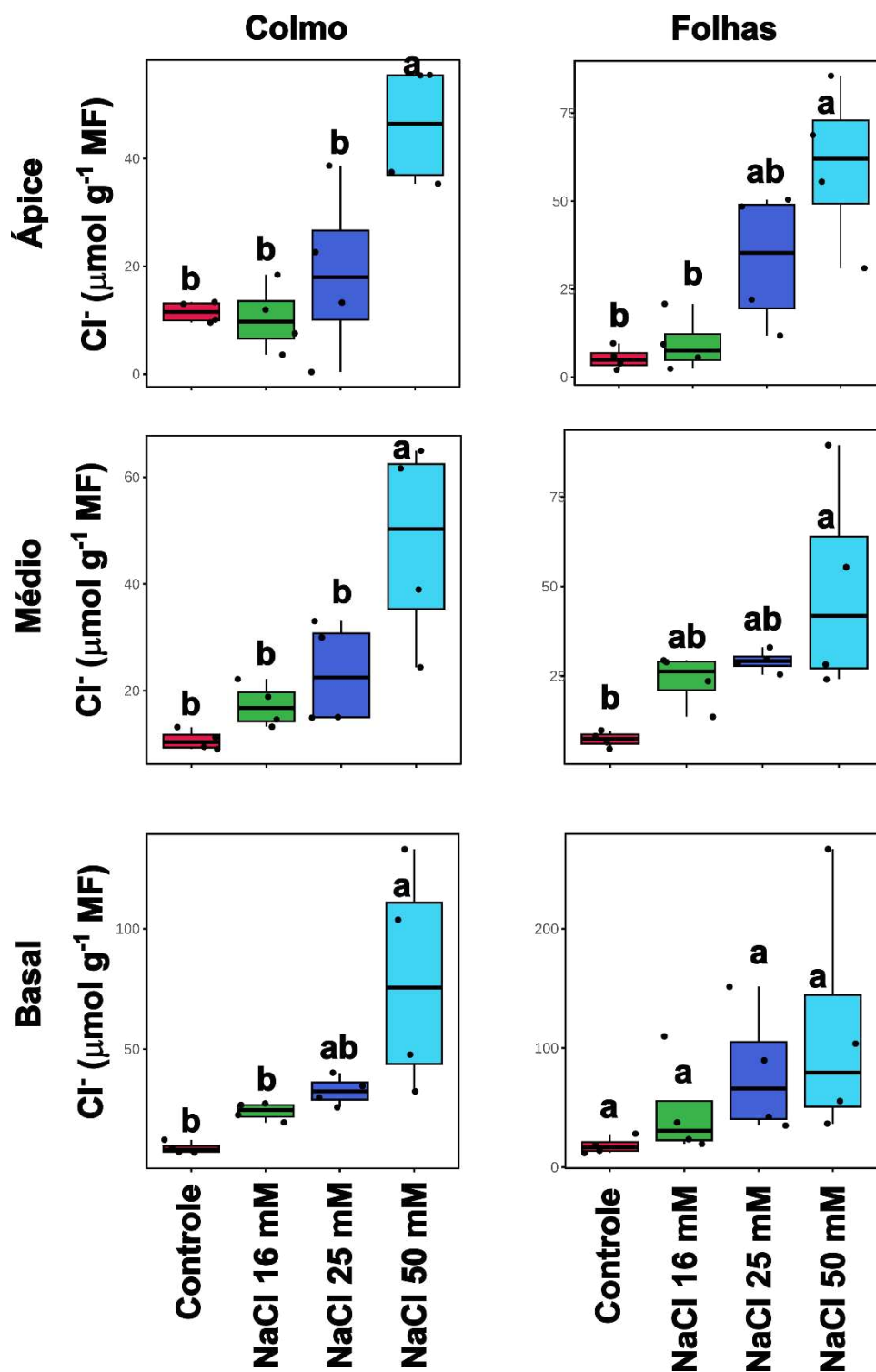


Figura 11 – Box plot das concentrações de Cl^- ($\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca) em diferentes partes (basal, mediana e apical) do colmo e folhas de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: Letras diferentes dentro de cada gráfico indicam diferenças estatísticas por análise de variância e teste de Tukey ($P < 0.05$).

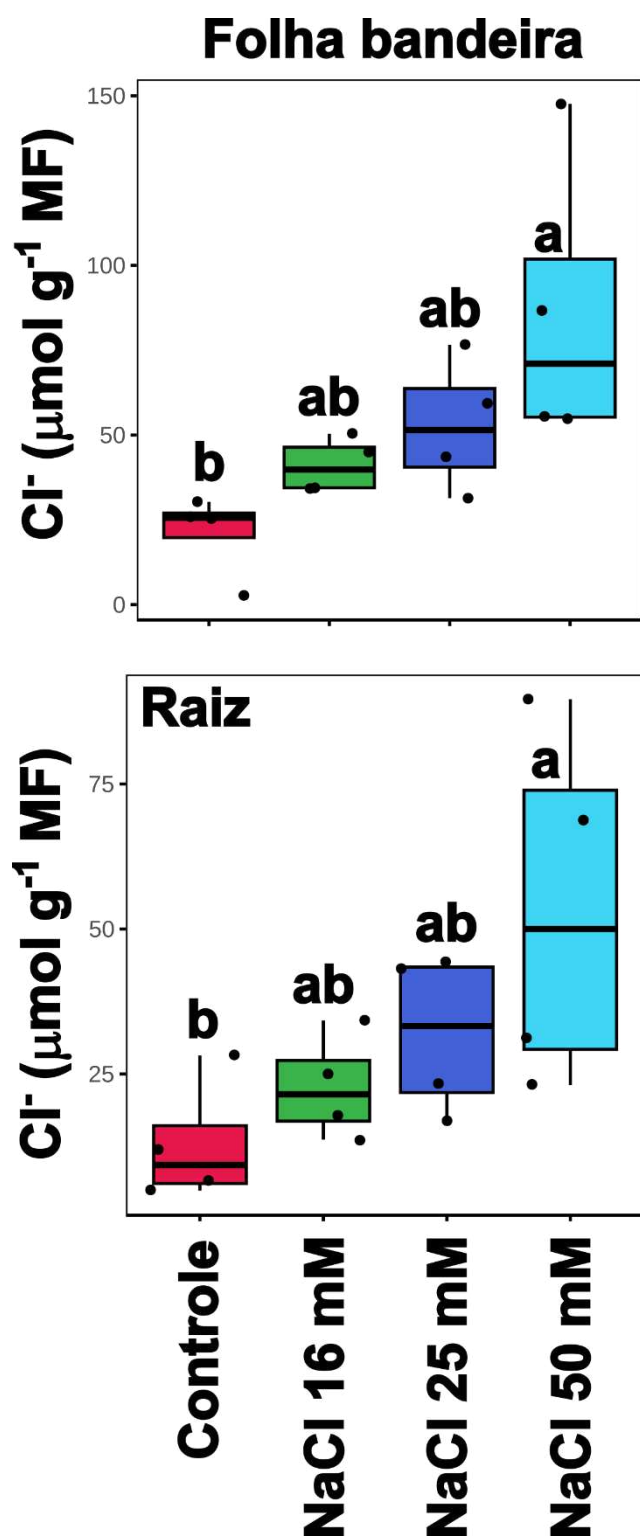


Figura 12 – Box plot das concentrações de Cl^- ($\mu\text{mol g}^{-1}$ massa fresca) na folha bandeira e raiz de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: Letras diferentes dentro de cada gráfico indicam diferenças estatísticas por análise de variância e teste de Tukey ($P < 0.05$).

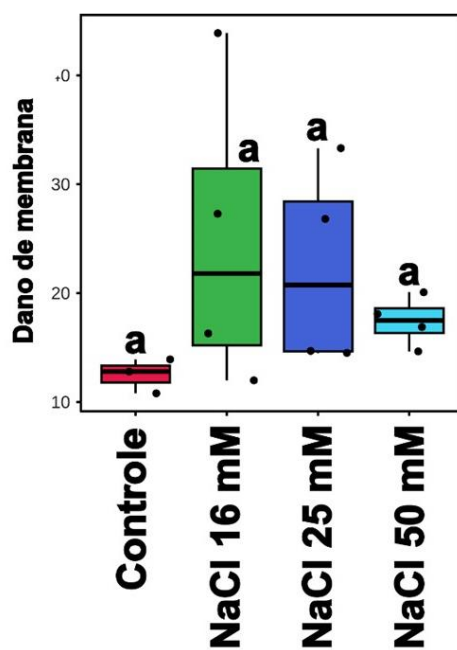


Figura 13 – Box plot das concentrações de dano de membrana em folhas de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: Letras diferentes dentro de cada gráfico indicam diferenças estatísticas por análise de variância e teste de Tukey ($P < 0.05$).

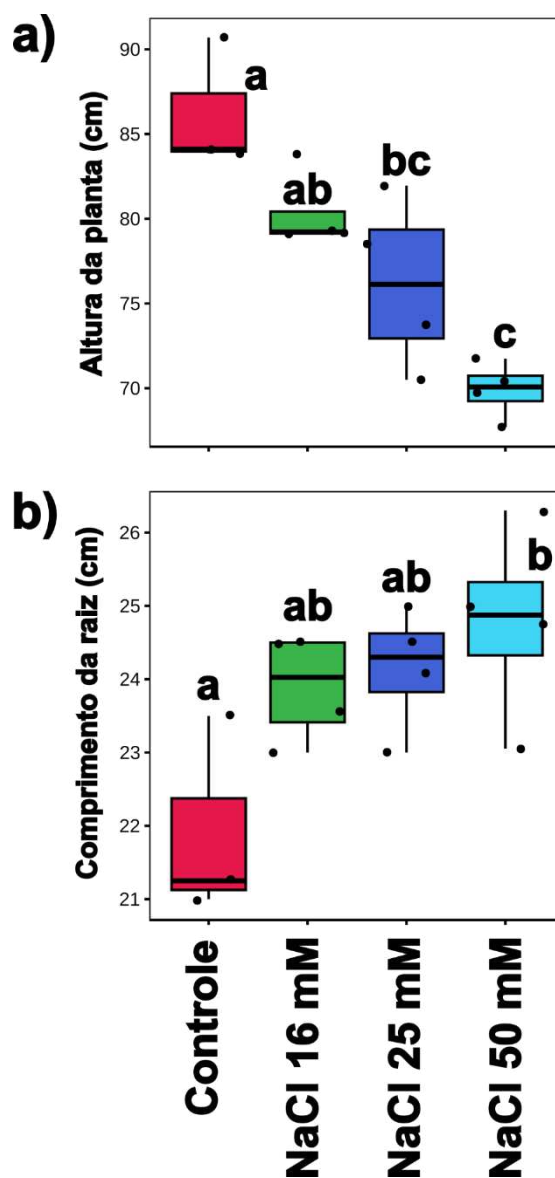


Figura 14 – Box plot da altura da planta (cm) (a) e comprimento da raiz (cm) (b) em plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: Letras diferentes dentro de cada gráfico indicam diferenças estatísticas por análise de variância e teste de Tukey ($P < 0.05$).

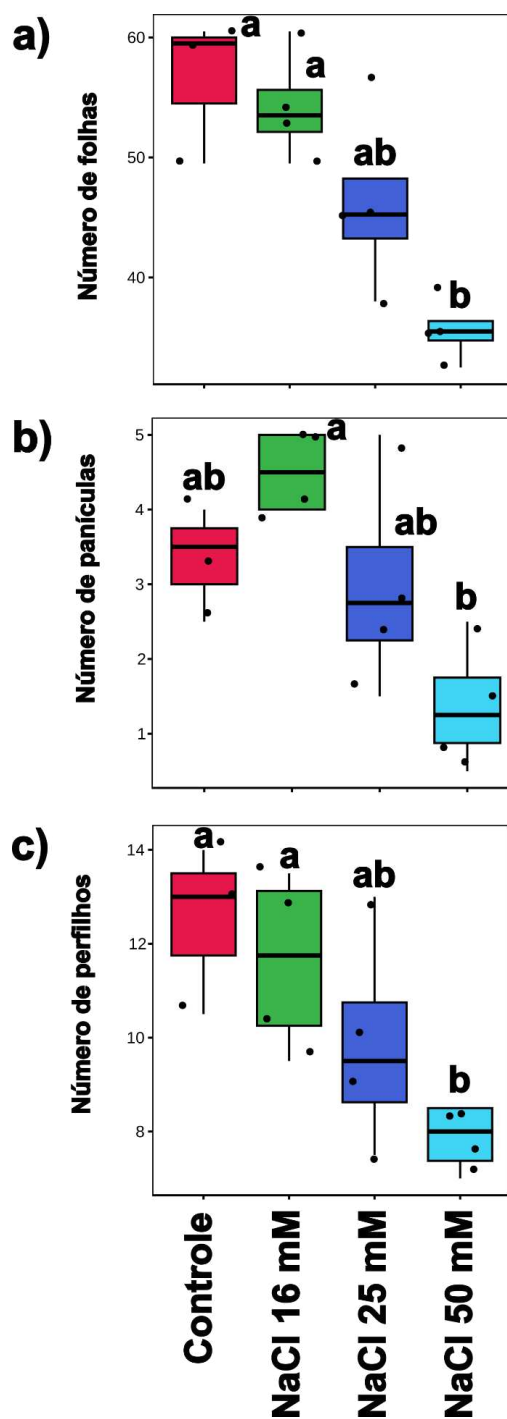


Figura 15 – Box plot do número de folhas (a), panículas (b) e perfilhos (c) de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: Letras diferentes dentro de cada gráfico indicam diferenças estatísticas por análise de variância e teste de Tukey ($P < 0.05$).

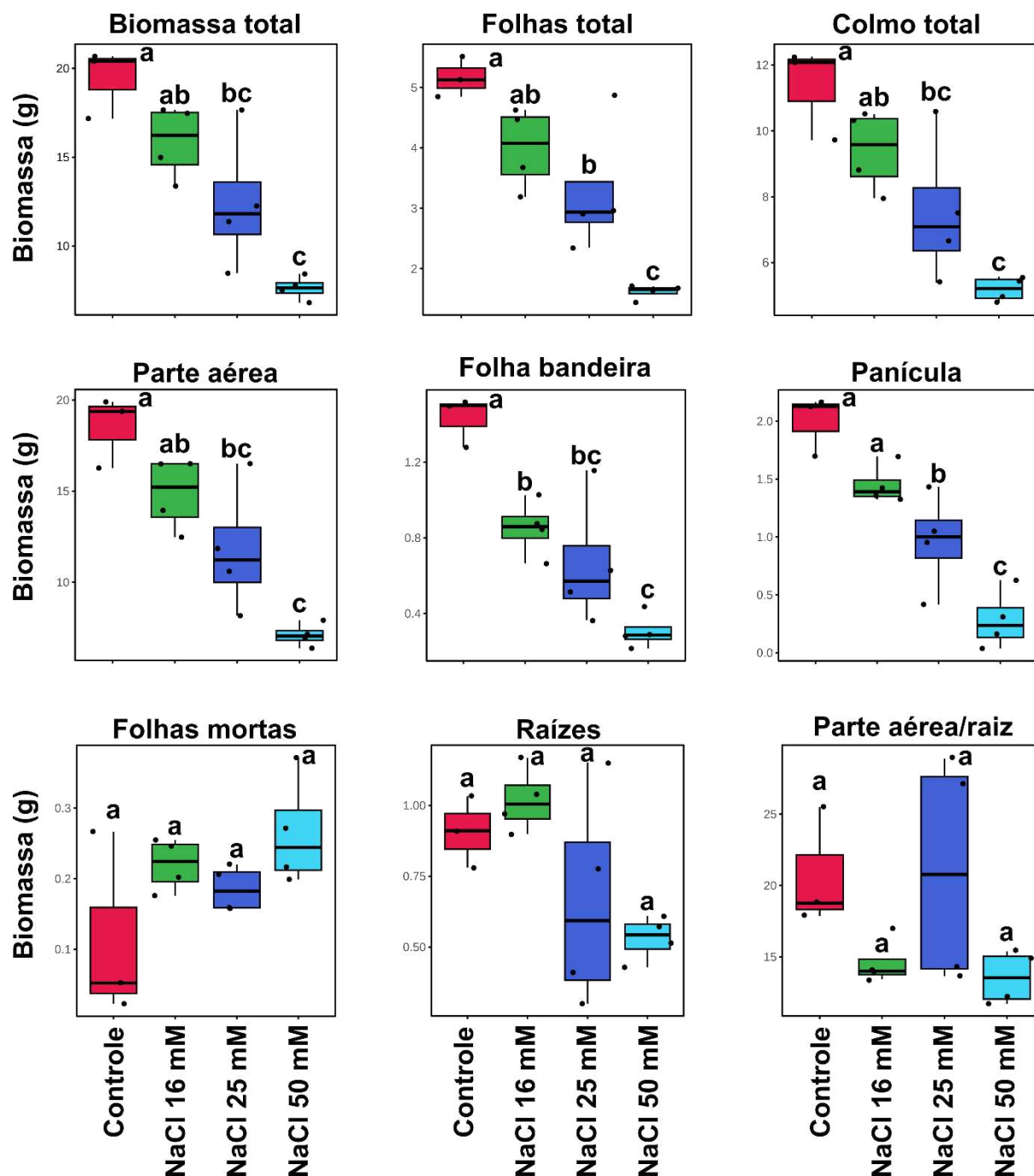


Figura 16 – Box plot da biomassa acumulada em diferentes partes de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: Letras diferentes dentro de cada gráfico indicam diferenças estatísticas por análise de variância e teste de Tukey ($P < 0.05$).

Tabela 1 – Lista de metabólitos encontrados na parte aérea e nas raízes da cultivar de arroz com seu nome, tempos de retenção e razão massa/carga utilizada para identificação.

Metabólito	RT Experimental	m/z
Pyruvic acid (1MEOX) (1TMS)	7.075	174
Isobutyric acid, 2-amino- (2TMS)	7.153	130
Lactic acid, DL- (2TMS)	7.283	117
Glycolic acid (2TMS)	7.592	177
Alanine, DL- (2TMS)	8.2	116
Oxalic acid (2TMS)	8.975	147; 133
Valine, DL- (2TMS)	10.368	144
Glycine (3TMS)	10.675	174
Urea (2TMS)	10.812	189
Serine, DL- (2TMS)	11	116
Phosphoric acid (3TMS)	11.417	299
Isoleucine, L- (2TMS)	11.7	158
Succinic acid (2TMS)	11.967	247; 172
Glyceric acid, DL- (3TMS)	12.308	189; 292; 133
Fumaric acid (2TMS)	12.44	245
Serine, DL- (3TMS)	12.742	204; 218
Threonine, DL- (3TMS)	13.133	218; 219; 117
Malic acid, DL- (3TMS)	14.5	233; 245
Aspartic acid, L- (3TMS)	14.9	232
Pyroglutamic acid, DL- (2TMS)	14.95	156
Butyric acid, 4-amino- (3TMS)	15	304
Erythronic acid (4TMS)	15.25	292
Threonic acid (4TMS)	15.467	292
Glutaric acid, 2-oxo- (1MEOX) (2TMS)	15.578	198
Glutamic acid, DL- (3TMS)	16.092	246
Asparagine, DL- (3TMS)	16.717	116; 231; 132
Ribitol, D- (5TMS)*	17.425	217; 205
Citric acid (4TMS)	18.394	273
Asparagine, DL- (4TMS)	19.79	188
Quinic acid, D(-)- (5TMS)	18.883	345
Tagatose, D- (1MEOX) (5TMS)	19.04	217
Sacarose, D- (8TMS)	19.497	319
Mannitol, D- (6TMS)	19.621	319
Sorbitol, D- (6TMS)	19.742	217
Hexadecanoic acid, n- (1TMS)	20.45	313
Hexadecanoic acid methyl ester	20.792	143
Inositol, myo- (6TMS)	21.174	305; 191; 318
Glucoheptose (1MEOX) (6TMS)	23.583	217
Galactinol (9TMS)	24.55	204; 191
Sucrose, D- (8TMS) 2 picos	25.8875	361
Trehalose, alpha, alpha'-, D- (8TMS)	26.542	361
Melezitose (11TMS)	29.618	204

*Ribitol considerado como padrão interno.

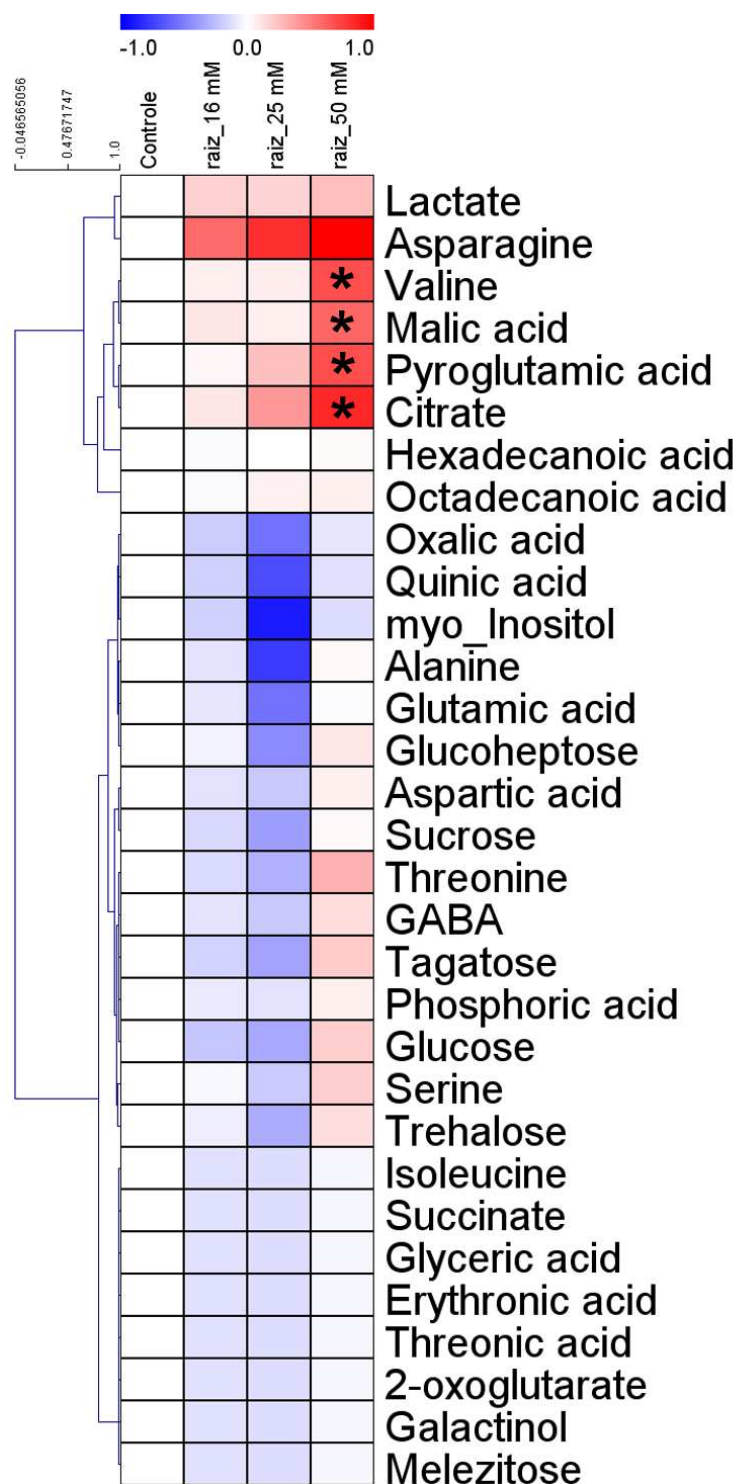


Figura 18 – Representação na forma de mapa de calor dos níveis relativos de metabólitos identificados na raiz de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: Os valores encontrados em plantas sob estresse salino foram normalizados de acordo com a média do controle e log2 transformados para a criação do mapa de calor. Valores em vermelho e azul com asteriscos indicam aumento e diminuição significativa em relação ao controle pelo teste t de Student's ($P < 0.05$), respectivamente.

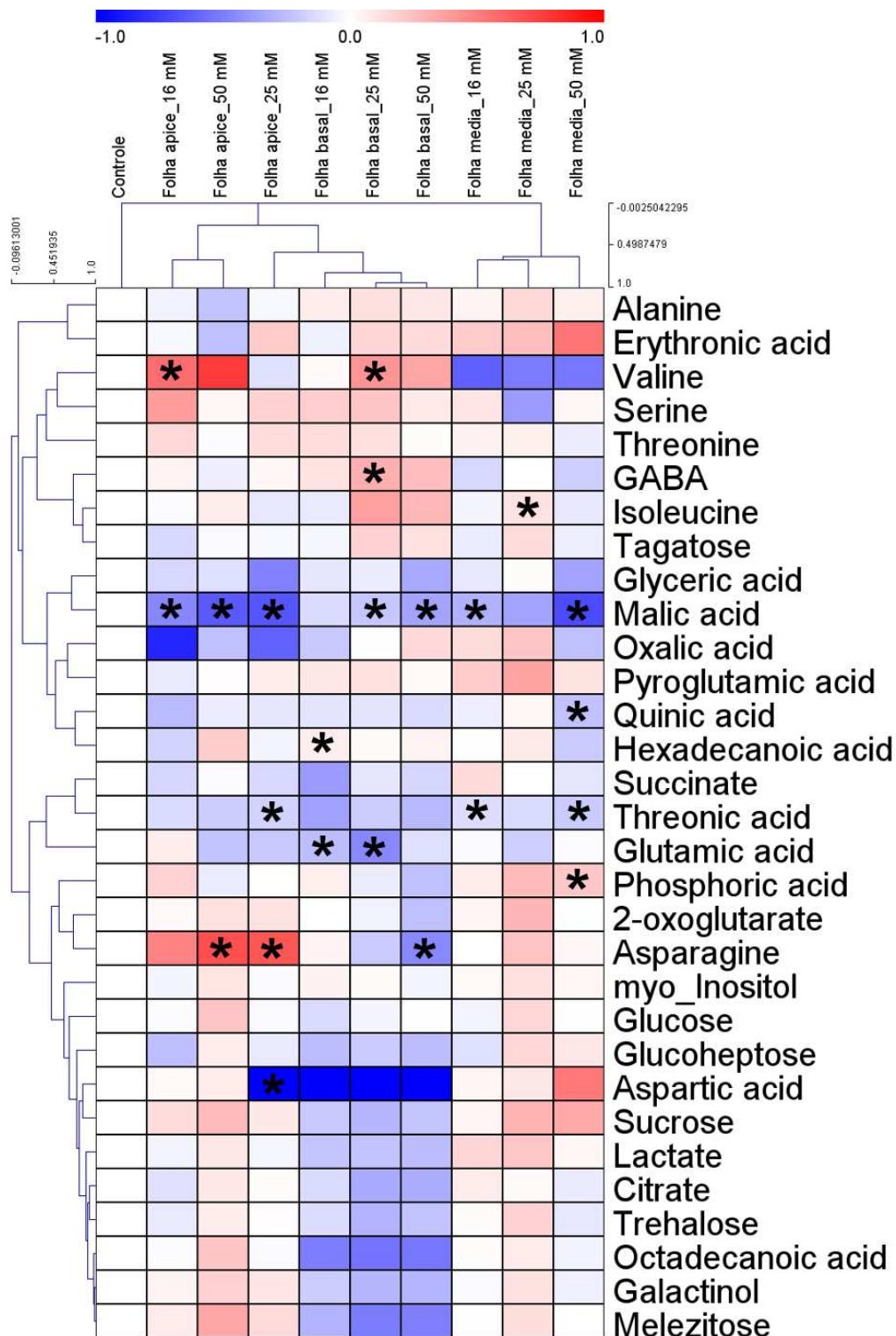


Figura 19 – Representação na forma de mapa de calor dos níveis relativos de metabólitos identificados em diferentes partes (basal, mediana e apical) de folhas de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: Os valores encontrados em plantas sob estresse salino foram normalizados de acordo com a média do controle e log2 transformados para a criação do mapa de calor. Valores em vermelho e azul com asteriscos indicam aumento e diminuição significativa em relação ao controle pelo teste t de Student's ($P < 0.05$), respectivamente.

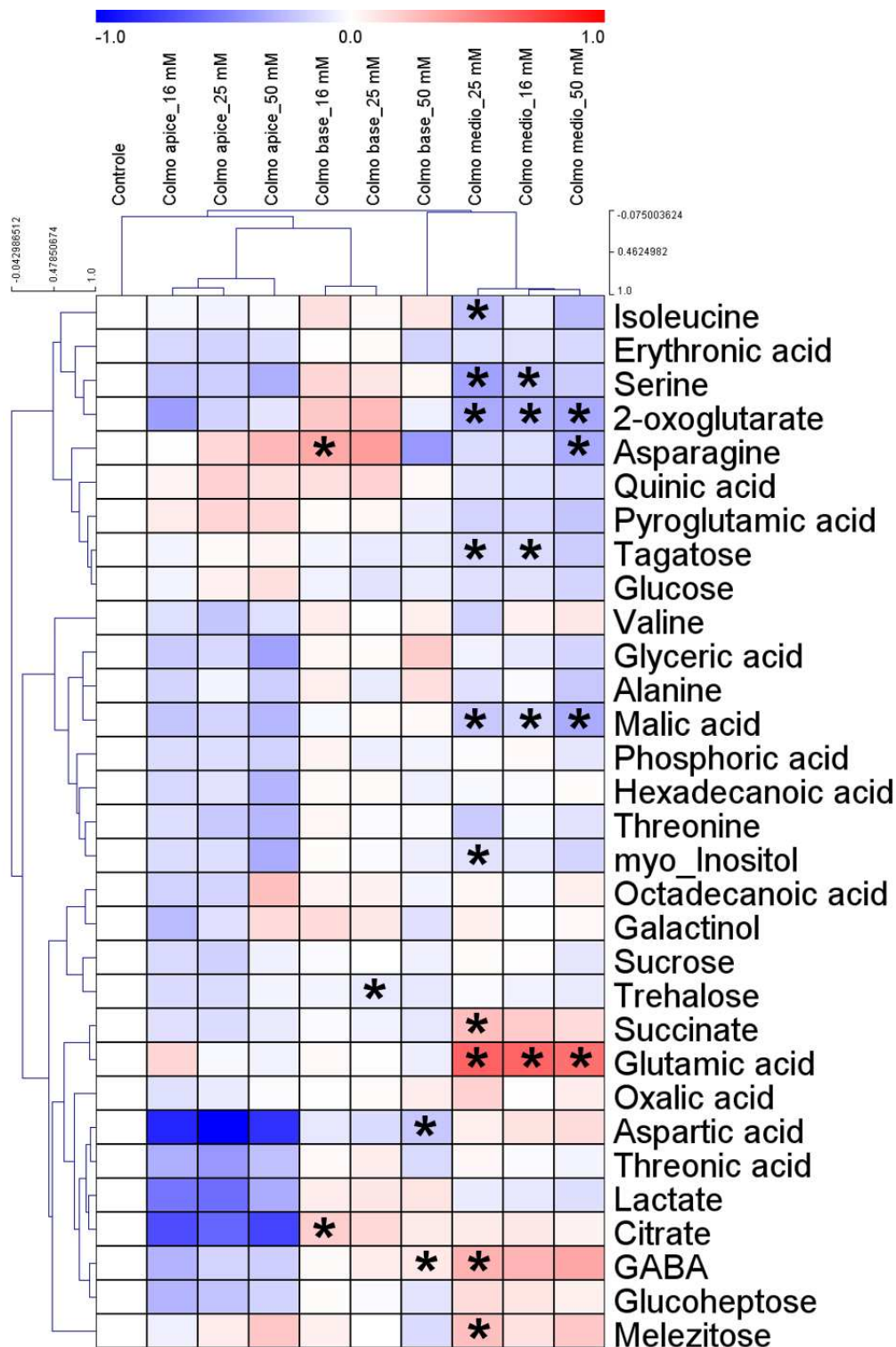


Figura 20 – Representação na forma de mapa de calor dos níveis relativos de metabólitos identificados em diferentes partes (basal, mediana e apical) do colmo de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: Os valores encontrados em plantas sob estresse salino foram normalizados de acordo com a média do controle e log2 transformados para a criação do mapa de calor. Valores em vermelho e azul com asteriscos indicam aumento e diminuição significativa em relação ao controle pelo teste t de Student's ($P < 0.05$), respectivamente.

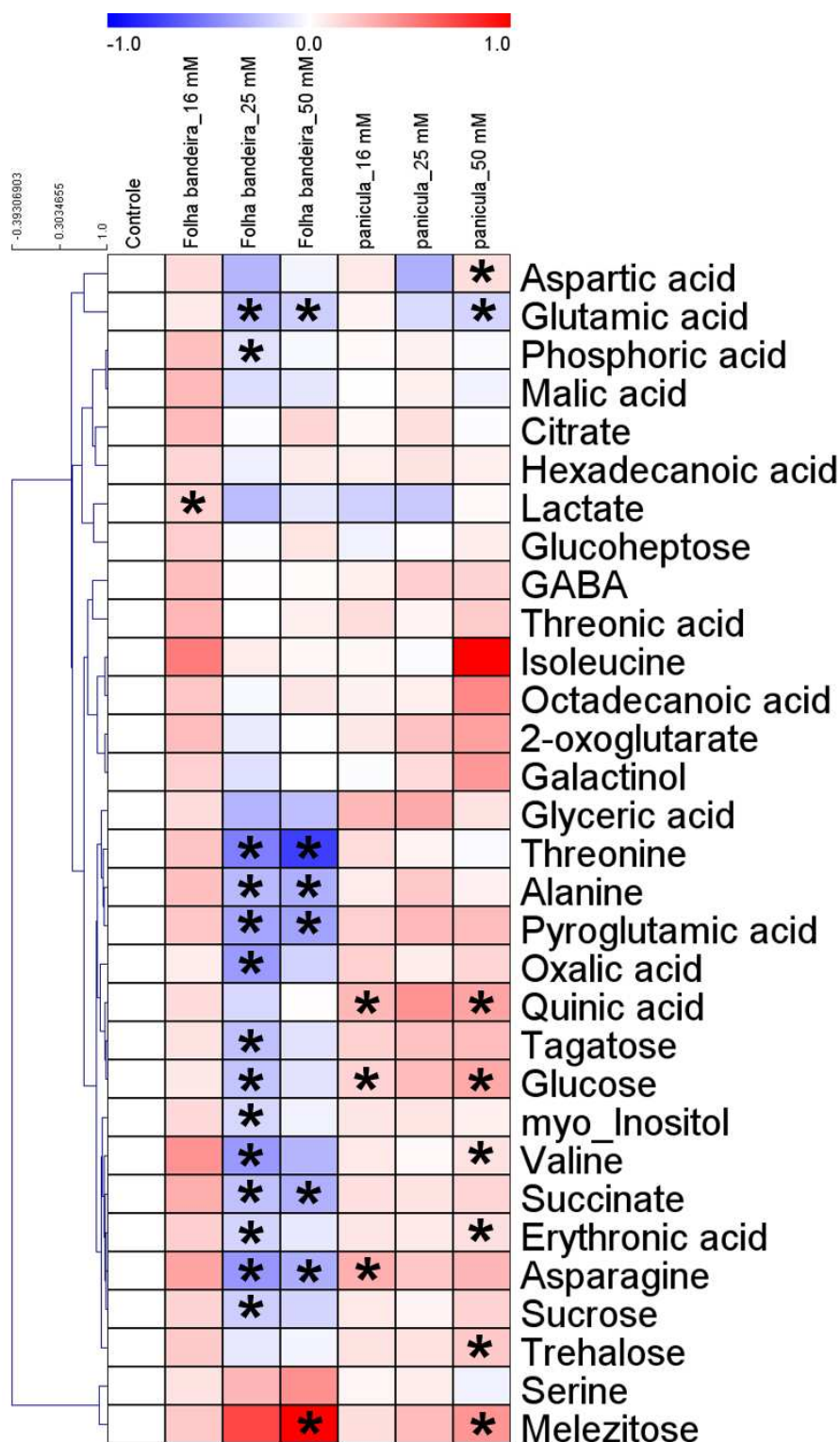


Figura 21 – Representação na forma de mapa de calor dos níveis relativos de metabólitos identificados em panículas e folhas bandeiras de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: Os valores encontrados em plantas sob estresse salino foram normalizados de acordo com a média do controle e log2 transformados para a criação do mapa de calor. Valores em vermelho e azul com asteriscos indicam aumento e diminuição significativa em relação ao controle pelo teste t de Student's ($P < 0.05$), respectivamente.

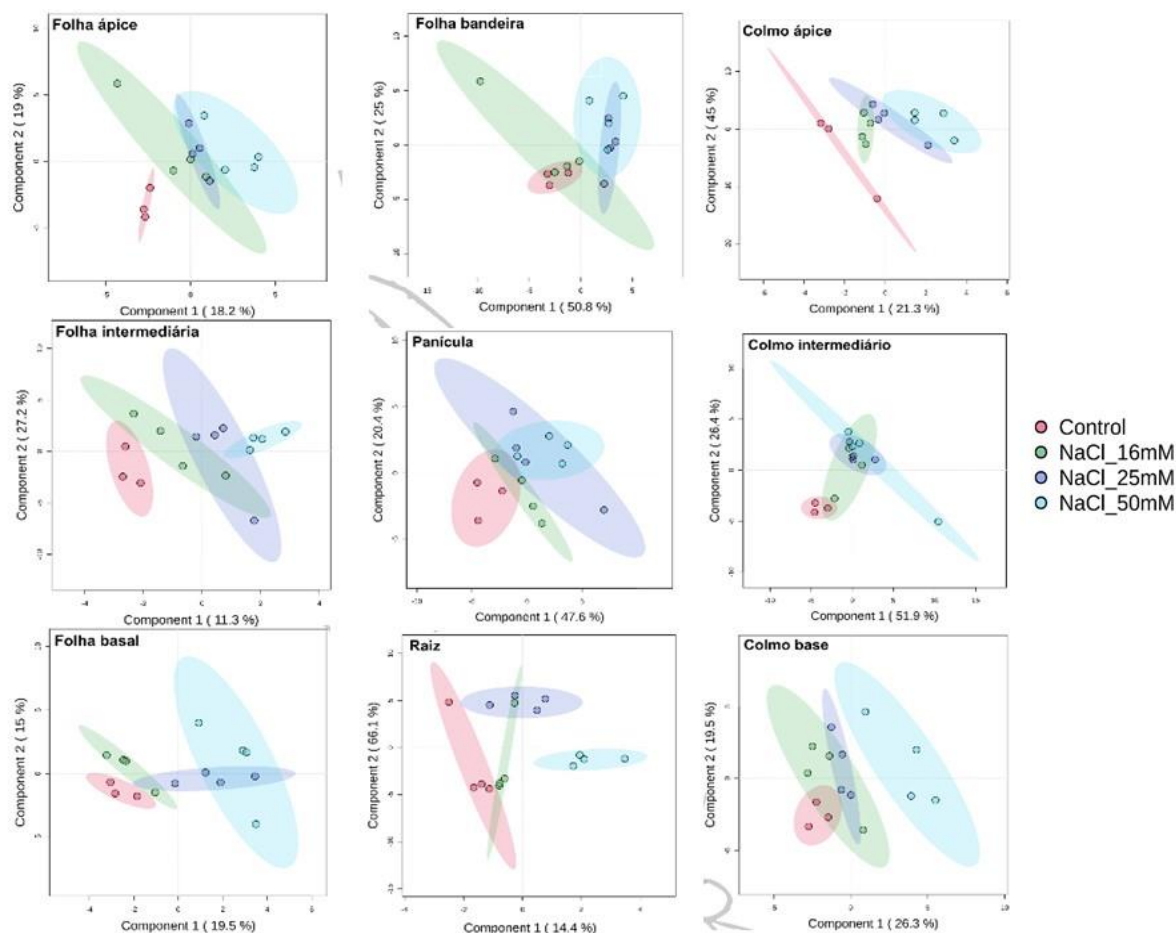


Figura 22 – Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) usando os dados de perfil metabólico de diferentes órgãos de plantas de arroz submetidas a 0, 16, 25 ou 50 mM de NaCl em solução nutritiva.

Nota: PLS-DA foi realizado usando a plataforma Metaboanalyst® 5.0 (Chong *et al.*, 2018).

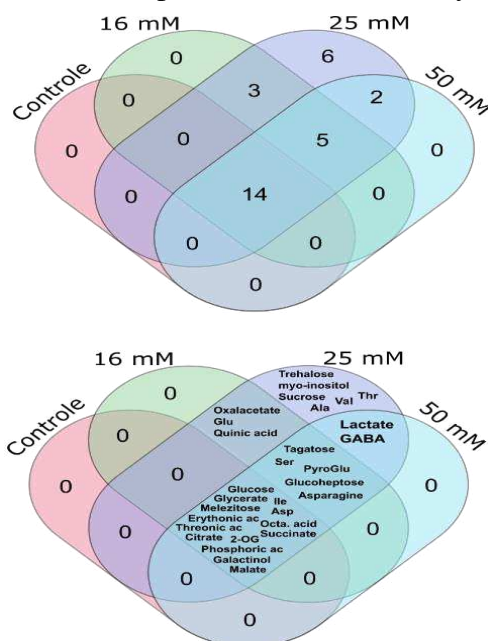


Figura 23 – Diagrama de Venn demonstrando metabólitos que apresentam diferença estatística entre os órgãos nas diferentes condições (controle e sob 16mM, 25mM ou 50 mM de NaCl).

Nota: Análise de variância e teste de Tukey ($P < 0.05$).

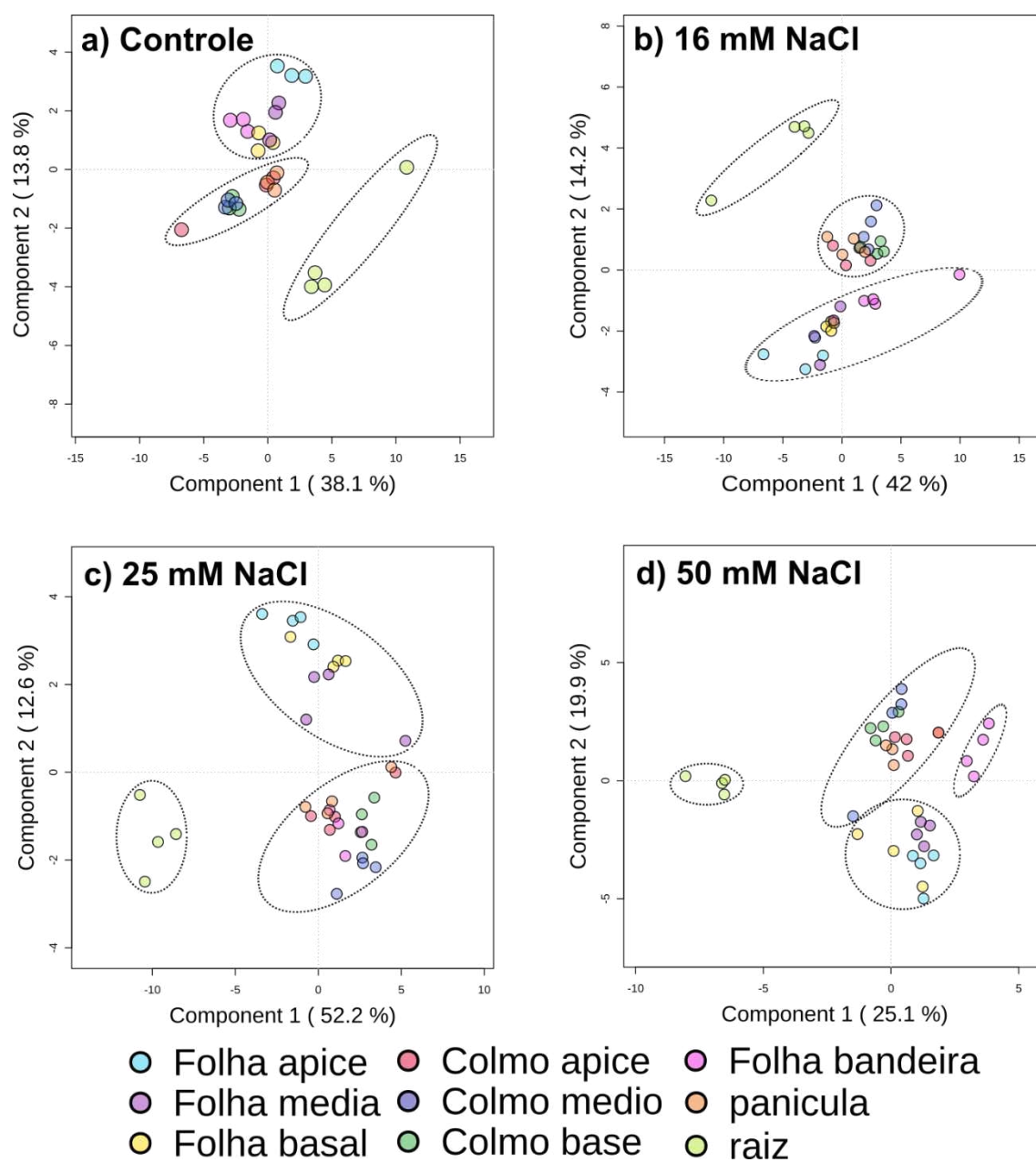


Figura 24 – Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) usando-se os dados de perfil metabólico de diferentes órgãos de plantas de arroz submetidas a 0 (a), 16 (b), 25 (c) ou 50 (d) mM de NaCl.

Nota: PLS-DA foi realizado usando a plataforma Metaboanalyst® 5.0 (Chong *et al.*, 2018).

6 DISCUSSÃO

Como organismos sésseis, plantas estão constantemente sujeitas a condições de estresse, o que requer respostas das mesmas para aclimatar às condições adversas do ambiente (Kranner *et al.*, 2010). Neste sentido, as respostas das plantas ao estresse variam fortemente de acordo com a intensidade e duração do mesmo (Fàbregas; Fernie, 2019). Por exemplo, enquanto níveis de estresse moderados e de baixa duração requerem, em geral, apenas mudanças fisiológicas e bioquímicas como mecanismos para aclimação da planta ao estresse, intensidades mais severas e duradouras do estresse podem levar a alterações substanciais na morfoanatomia das plantas (Daloso, 2014). Assim, as respostas das plantas ao estresse podem ou não serem observadas de acordo com a escala de observação adotada (Galviz *et al.*, 2022). Ademais, embora a fisiologia do estresse vem sendo amplamente estudada, a grande maioria dos estudos é focado em folhas completamente expandidas ou em órgãos de interesse comercial, como sementes, tubérculos e frutos. Portanto, a compreensão sobre como o estresse afeta simultaneamente os diferentes órgãos da planta permanece obscuro. Neste trabalho, utilizou-se plantas de arroz e estresse salino como modelos para estudar a variabilidade espacial das respostas a este estresse de acordo com diferentes intensidades, com intuito de investigar o efeito do estresse salino no crescimento e perfil metabólico de diferentes órgãos de plantas de arroz.

6.1 Respostas de plantas de arroz à salinidade

A salinidade é caracterizada pelo excesso de sal acumulado no solo, que pode levar a diversos efeitos deletérios na planta a depender da quantidade de sal no solo e da plasticidade adaptativa da planta a essa condição (Huong; Anh; Dat *et al.*, 2020). Diversas respostas são comuns em estudos de plantas sob excesso de sal, como aumento nas concentrações de Na^+ e Cl^- e diminuição de K^+ bem como na razão K^+/Na^+ nos tecidos das plantas (Batista *et al.*, 2019). Isso deve ao fato de que o excesso de NaCl não só leva ao aumento de Na^+ e Cl^- nos tecidos bem como interfere na absorção de K^+ na planta (Chaves *et al.*, 2009). De fato, plantas de arroz sob excesso de NaCl exibiram essas respostas em quase todos os órgãos, com exceção das folhas do ápice, folha bandeira e panícula. Esses resultados sugerem a existência de um gradiente de sal interno na planta, de maneira decrescente à medida que se distancia da fonte do excesso de sal. No entanto, é importante ressaltar que, na parte apical da planta, o colmo apresentou altas concentrações de Na^+ , e isso não foi observado nas folhas. Assim, os resultados

deste estudo sugerem que plantas de arroz preservam os órgãos fonte mais ativos como folhas do ápice e folha bandeira bem como a panícula, que é associada ao desenvolvimento reprodutivo da planta (Ermakova *et al.*, 2020). A preservação da folha bandeira justifica-se pela sua importância como fonte de fotoassimilados para as sementes, sendo o último órgão vegetativo a entrar em processo de senescência (Zhang *et al.*, 2010).

O excesso de sal pode também interferir na arquitetura da planta (Aragão *et al.*, 2016). Plantas de arroz demonstraram redução na altura da planta e número de folhas, panículas e perfilhos, enquanto o comprimento da raiz aumentou sob excesso de sal. Ademais, a biomassa dos órgãos da parte aérea foi reduzida com salinidade. Esses resultados foram dependentes da concentração de sal, sendo, como esperado, menos e mais severo sob 16 mM e 50 mM de NaCl, respectivamente. Embora a redução no crescimento esteja geralmente associada à geração de estresses oxidativo e/ou osmótico nos tecidos das plantas (Varela *et al.*, 2019), não foram detectadas diferenças no dano de membrana (DM) entre os tratamentos de excesso de sal e o controle. Cabe ressaltar que o DM foi avaliado via extravasamento de eletrólito, que é um parâmetro de avaliação de estresse celular, mas que não reflete toda complexidade que envolve o metabolismo redox (Almeida; Huber, 2010). Ademais, o conteúdo relativo de água pode não refletir diferenças no potencial osmótico ou hídrico dos tecidos foliares (Browne *et al.*, 2020). Portanto, não se deve excluir a possibilidade de a redução no crescimento das plantas de arroz sob sal ser causado por estresses oxidativo e/ou osmótico.

6.2 Organização espacial do metabolismo de plantas de arroz sob salinidade

O metabolismo de plantas pode ser simplificada dividida entre órgãos fonte e dreno, caracterizados como órgãos capazes de produzir fotoassimilados e exportar ou aqueles que precisam importar fotoassimilados para seu crescimento e desenvolvimento (Fettke; Fernie, 2015). Neste sentido, plantas de arroz e outras gramíneas exibem uma alta complexidade por possuírem órgãos com finalidades e regulações específicas, como a panícula e a folha bandeira. Ademais, há evidências de que as diferentes partes do colmo possuem capacidade diferencial no acúmulo e remobilização de carboidratos, sendo caracterizados prioritariamente como órgãos dreno mas que podem atuar como órgãos fonte dependendo da condição de crescimento e do estágio de desenvolvimento (Okawa *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2017; Wakabayashi *et al.*, 2022). No entanto, pouco se sabe sobre como esses diferentes órgãos de plantas de arroz respondem ao estresse.

Os resultados desse estudo ressaltam que há uma enorme variabilidade das respostas ao excesso de sal. Por exemplo, dentre os metabólitos que apresentaram alteração significativa ao excesso de sal, nenhum foi comum entre os diferentes órgãos. Sob 25 mM, apenas glutamato teve seu acúmulo alterado nas folhas, colmo e folha bandeira em resposta ao sal, embora não tenha sofrido alterações na panícula e raiz. Sob 50 mM de NaCl, 8 metabólitos apresentaram alterações em pelo menos dois órgãos, enquanto 11 foram alterados somente em raiz (1), panícula (3), folha bandeira (3), folhas (2) e colmos (2) (Figura 24). Esses resultados demonstram que as respostas metabólicas ao estresse salino são órgãos específicos. Isso explica, ao menos parcialmente, a dificuldade em obter plantas mais tolerantes à salinidade via engenharia genética, uma vez que a escolha de genes alvo em geral leva em consideração informações obtidas em um órgão específico (MOOSE; MUMM, 2008), sendo que, baseado nos resultados encontrados, pode não ter relação com a resposta ao estresse em outros órgãos. Assim, encontrou-se resultados que ressaltam que, para entender como as plantas respondem ao estresse de forma sistêmica e quais alvos podem ser manipulados para aperfeiçoar a resposta dos diferentes módulos da planta e não somente um determinado órgão ao estresse, faz-se necessário mais estudos objetivando desvendar as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares espaço-temporais ao estresse.

As diferenças metabólicas entre os diferentes órgãos foram claramente exemplificadas pela clusterização observada na análise de PLS-DA na ausência de estresse, em que três clusters foram formados (raiz, panícula+colmos e folhas) (Figura 24a). No entanto, esse padrão de clusterização foi modificado pelo estresse salino, em que as folhas bandeiras foram clusterizadas junto aos colmos e panícula sob 25 mM de NaCl e formaram um cluster a parte sob 50 mM de NaCl. Por um lado, esses resultados reforçam que os principais órgãos fonte (folhas) e dreno (raiz) diferem substancialmente do ponto de vista metabólico, seja na presença ou ausência de estresse. No entanto, os dados evidenciam que o colmo de plantas de arroz apresenta-se como um órgão intermediário entre fonte e dreno, como previamente sugerido (Perez *et al.*, 1971; Hu *et al.*, 2022). No que concerne as folhas bandeiras, esse foi o único órgão com redução de biomassa sob 16 mM de NaCl bem como demonstrou reduções nos níveis de 14 metabólitos sob 25 mM de NaCl, exibindo uma alta plasticidade metabólica em resposta ao sal. As folhas bandeiras são de extrema importância e constantemente consideradas como órgãos chave para otimizar a produtividade de plantas de arroz (Sperotto *et al.*, 2013; Acevedo-Siaca *et al.*, 2021). Resultados prévios demonstraram que o perfil metabólico destas folhas variam substancialmente dependendo do cultivar e do estágio de desenvolvimento de plantas de arroz (Hu *et al.*, 2020). Este estudo demonstrou que os níveis

de diversos aminoácidos a metabólitos associados como glutamato, treonina, alanina, valina e asparagina diminuem nas folhas bandeira após o florescimento de arroz, indicando uma remobilização para as sementes. De acordo com esse estudo, os resultados sugerem que o estresse salino pode acelerar esse processo de remobilização, uma vez que os níveis desses metabólitos foram substancialmente diminuídos nas folhas bandeira sob estresse, sobretudo sob 25mM de NaCl. Tomados em conjuntos, os resultados encontrados ressaltam que o metabolismo primário varia entre os órgãos de plantas de arroz na ausência de estresse e que as respostas metabólicas ao estresse salino são órgãos específicos e dependem da intensidade do estresse.

7 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os resultados revelaram que as respostas de plantas de arroz à salinidade variam substancialmente entre os diferentes órgãos da planta. Além das respostas esperadas, geralmente observadas em plantas sob salinidade, como diminuição na biomassa das plantas, aumento nas concentrações de Na^+ e Cl^- e redução nas concentrações de K^+ e na razão K^+/Na^+ nos tecidos das plantas, sugere-se que o acúmulo de biomassa e as alterações iônicas divergem entre os diferentes órgãos da planta. As folhas do ápice, a folha bandeira e a panícula não representaram as mesmas alterações nas concentrações de Na^+ e K^+ bem como na razão K^+/Na^+ que foi observado nos outros órgãos da planta, sugerindo a ocorrência de um gradiente do acúmulo destes íons em plantas de arroz sob excesso de NaCl .

Além disso, o estudo forneceu informações pertinentes sobre a dinâmica metabólica de diferentes órgãos das plantas de arroz sob diferentes níveis de estresse salino, em que as respostas metabólicas ao sal variam fortemente de acordo com as partes da planta e a concentração de sal. Essa variação espacial permitiu analisar como as plantas modularam seu metabolismo para responder ao estresse salino e aclimatar para condições brandas, moderadas e severas de NaCl . Portanto, os resultados deste estudo apresentam informações importantes sobre os mecanismos de aclimação das plantas às condições de salinidade nos diversos órgãos.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO-SIACA, L. G. *et al.* Variation between rice accessions in photosynthetic induction in flag leaves and underlying mechanisms. **J Exp Bot.**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 1282-1294, 2021. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa520>
- ALBACETE, A. A.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C.; PÉREZ-ALFOCEA, F. Hormonal and metabolic regulation of source–sink relations under salinity and drought: From plant survival to crop yield stability. **Biotechnol Adv.**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 12-30, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.005>
- ALMEIDA, D.; HUBER, D. Chilling-induced changes in the apoplastic solution of tomato pericarp. **J Hortic Sci Biotechnol.**, [s. l.], v. 85, n. 4, p. 312-316, 2010. <https://doi.org/10.1080/14620316.2010.11512673>
- ARAGÃO, R. M. *et al.* Salt-induced NO₃ - uptake inhibition in cowpea roots is dependent on the ionic composition of the salt and its osmotic effect. **Biol Plant.**, [s. l.], v. 60, p. 731-740, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0604-8>
- BATISTA, V. C. V. *et al.* Salicylic acid modulates primary and volatile metabolites to alleviate salt stress-induced photosynthesis impairment on medicinal plant *egletes viscosa*. **Environ Exp Bot.**, [s. l.], v. 167, p. 103870, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103870>
- BROWNE, M. *et al.* Prediction of leaf water potential and relative water content using terahertz radiation spectroscopy. **Plant Direct.** [s. l.], v. 4, n. 4, p. e00197, 2020. <https://doi.org/10.1002/pld3.197>
- CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Ann Bot.**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>
- CHILDS, N.; LEBEAU, B. **Rice outlook**: December 2023 (Report No. RCS-23K). U.S. Department of Agriculture, Economic Research Service, 2023. Disponível em: https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/dn39x152w/8g84p6807/q811n6087/12_2023_DECEMBER__RICE_OUTLOOK_REPORT.pdf Acesso em: 26 dez. 2024.
- CHONG, J.; XIA, J. MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. **Bioinformatics.**, [s. l.], v. 34, n. 24, p. 4313-4314, 2018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty528>
- CHOURASIA, K. N. *et al.* Salinity stress in potato: understanding physiological, biochemical and molecular responses. **Life.**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 545, 2021. <https://doi.org/10.3390/life11060545>
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. Brasília, DF, v. 11, safra 2023/24, n. 7, sétimo levantamento, 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 5 jan. 2024.

CUNHA, D. S. **Caracterização fisiológica, bioquímica e molecular da germinação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) sob estresses salino e osmótico**. 2023. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias, Agronomia, Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Rede Nordeste (Renorbio). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/39032>. Acesso em: 6 mar. 2024.

DALOSO, D. M. The ecological context of bilateral symmetry of organ and organisms. **Nat Sci.**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 184-190, 2014. <http://doi.org/10.4236/ns.2014.64022>

DONG, S.; BECKLES, D. M. Dynamic changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink tissues promote a better abiotic stress response. **J Plant Physiol.**, [s. l.], v. 234-235, p. 80-93, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.01.007>

DURAND, M. *et al.* Carbon source–sink relationship in *Arabidopsis thaliana*: the role of sucrose transporters. **Planta**, [s. l.], v. 247, p. 587-611, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2807-4>

ERMAKOVA, M. *et al.* On the road to C4 rice: advances and perspectives. **Plant J.**, [s. l.], v. 101, n. 4, p. 940-950, 2020. <https://doi.org/10.1111/tpj.14562>

FÀBREGAS, N.; FERNIE, A. R. The metabolic response to drought. **J Exp Bot.**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 1077-1085, 2019. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery437>

FETTKE, J.; FERNIE, A. R. Intracellular and cell-to-apoplast compartmentation of carbohydrate metabolism. **Trends Plant Sci.**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 490-497, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.04.012>

FRAGA, T. I. *et al.* Flooded rice yield as affected by levels of water salinity in different stages of its cycle. **Rev Bras Ciênc Solo.**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 175-182, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000100018>

GALVIZ, Y.; SOUZA, G. M.; LÜTTGE, U. The biological concept of stress revisited: relations of stress and memory of plants as a matter of space–time. **Theor Exp Plant Physiol.**, [s. l.], v. 34, p. 239-264, 2022. <https://doi.org/10.1007/s40626-022-00245-1>

GHEYI, H. R. *et al.* **Manejo de salinidade na agricultura: estudos básicos e aplicados**. Instituto Nacional de Tecnologia em Salinidade. 2. ed. 504p. 2016. Disponível em: <https://ppgea.ufc.br/wp-content/uploads/2018/04/manejo-da-salinidade-na-agricultura.pdf>. Acesso em: 7 fev. 2024.

GOMES, M. R. S. **Análise de redes e modulação metabólica associadas a parâmetros bioquímicos e fisiológicos em cultivares contrastantes de arroz sob salinidade**. 2022. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/70490>. Acesso em: 17 fev. 2024.

GRANJA, M. M. C. **Resposta do Sistema antioxidativo à indução do estresse gradativo e choque osmótico pelo NaCl em cana-de-açúcar**. 2010. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia - Melhoramento Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de

Plantas. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/6471>. Acesso em: 1 abr. 2024.

GUIMARÃES, C. M.; FAGERIA, N. K.; BARBOSA FILHO, M. P. Como a planta de arroz se desenvolve. **Potafos.**, [s. l.], n. 13, p. 1-12, 2002. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/749053> Acesso em: 17 fev. 2024.

GULLBERG, J. *et al.* Design of experiments: an efficient strategy to identify factors influencing extraction and derivatization of Arabidopsis thaliana samples in metabolomic studies with gas chromatography/mass spectrometry. **Anal Biochem.**, [s. l.], v. 331, n. 2, p. 283-295, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.04.037>

HAQUE, M. A. *et al.* Advanced breeding strategies and future perspectives of salinity tolerance in rice. **Agronomy**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1631, 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy11081631>.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular.**, v. 347, n. 2, p. 32. 1950. Disponível em: https://www.nutricaoeplantas.agr.br/site/downloads/hoagland_arnon.pdf. Acesso em: 9 dez. 2023.

HORN, L. M. L. *et al.* Pantoea ananatis in Oryza sativa in Brazil. **Ciênc Rural**, Santa Maria, v. 53, n. 5, p. e20210832, 2023. <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210832>

HU, C. *et al.* Dissection of flag leaf metabolic shifts and their relationship with those occurring simultaneously in developing seed by application of non-targeted metabolomics. **PLoS One**, [s. l.], v. 15, p. e0227577, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227577>

HU, Y. *et al.* Sucrose nonfermenting-1-related protein kinase 1 regulates sheath-to-panicle transport of nonstructural carbohydrates during rice grain filling. **Plant Physiol.**, [s. l.], v. 189, p. 1694-1714, 2022. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac124>

HUONG, C. T.; ANH, T. T. T.; TRAN, H. D. *et al.* Assessing salinity tolerance in rice mutants by phenotypic evaluation alongside simple sequence repeat analysis. **Agriculture**, [s. l.], v. 10, n. 6, 2020. <https://doi.org/10.3390/agriculture10060191>

HUONG, C. T.; ANH, T. T. T.; DAT, T. D *et al.* Uniparental inheritance of salinity tolerance and beneficial phytochemicals in rice. **Agronomy**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1032, 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10071032>

KLEINE, T. *et al.* Acclimation in plants – the Green Hub consortium. **Plant J.**, [s. l.], v. 106, n. 1, p. 23-40, 2021. <https://doi.org/10.1111/tpj.15144>

KRANNER I. *et al.* What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytol**, [s. l.], v. 188, n. 3, p. 655-673, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>

KUMAR, K. *et al.* Insights into genomics of salt stress response in rice. **Rice**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 27, 2013. <http://www.thericejournal.com/content/6/1/27>

- LACROIX, R. L.; KEENEY, D. R.; WALSH, L. M. Potentiometric titration of chloride in plant tissue extracts using the chloride ion electrode. **Commun Soil Sci Plant Anal.**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1-6, 1970. <http://dx.doi.org/10.1080/00103627009366233>
- LIMA NETO, M. C. *et al.* Understanding photosynthesis in a spatial–temporal multiscale: the need for a systemic view. **Theor Exp Plant Physiol**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 113-124, 2021. <https://doi.org/10.1007/s40626-021-00199-w>
- LISEC, J. *et al.* Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. **Nat Protoc**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 387-396, 2006. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>
- MA, Y.; DIAS, M. C.; FREITAS, H. Drought and salinity stress responses and microbe-induced tolerance in plants. **Front Plant Sci.**, [s. l.], v. 11, p. 591911, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.591911>
- MARCONDES, J.; GARCIA, A. B. Aspectos citomorfológicos do estresse salino em plântulas de arroz (*ORYZA SATIVA* L.). **Arq Inst Biol.**, São Paulo, v. 76, p. 187-194, 2021. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v76p1872009>
- MOOSE, S. P.; MUMM, R. H. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. **Plant Physiol.**, [s. l.], v. 147, n. 3, p. 969-977, 2008. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118232>
- MUNNS, R. *et al.* Osmotic adjustment and energy limitations to plant growth in saline soil. **New Phytol.**, [s. l.], v. 225, n. 3, p. 1091-1096, 2020. <https://doi.org/10.1111/nph.15862>
- NEGRÃO, S. *et al.* Recent updates on salinity stress in rice: from physiological to molecular responses. **Crit Rev Plant Sci.**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 329-377, 2011. <https://doi.org/10.1080/07352689.2011.587725>
- OBATA, T.; FERNIE, A. R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. **Cell Mol Life Sci.**, [s. l.], v. 69, n. 19, p. 3225-3243, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1091-5>
- OKAWA, S.; MAKINO, A.; MAE, T. Shift of the major sink from the culm to the panicle at the early stage of grain filling in rice (*Oryza sativa* L. cv. Sasanishiki). **Soil Sci Plant Nutr.**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 237-242, 2002. <https://doi.org/10.1080/00380768.2002.10409196>
- PANDEY, M. *et al.* Thiourea and hydrogen peroxide priming improved K⁺ retention and source-sink relationship for mitigating salt stress in rice. **Sci Rep.**, [s. l.], v. 11, p. 3000, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80419-6>
- PAUL, M. J.; FOYER, C. H. Sink regulation of photosynthesis. **J Exp Bot.**, [s. l.], v. 52, n. 360, p. 1383-1400, 2001. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.360.1383>
- PEREZ, C. M. *et al.* Starch Metabolism in the Leaf Sheaths and Culm of Rice. **Plant Physiol.**, v. 47, n. 3, p. 404-408, 1971. <https://doi.org/10.1104/pp.47.3.404>
- RAJKUMARI, N. *et al.* Metabolomics-mediated elucidation of rice responses to salt stress. **Planta**, [s. l.], v. 258, n. 6, p. 111, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04258-1>

RAZZAQ, A. *et al.* Metabolomics: a way forward for crop improvement. **Metabolites**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 303, 2019. <https://doi.org/10.3390/metabo9120303>

RAZZAQ, A. *et al.* Salt stress induces physiochemical alterations in rice grain composition and quality. **J Food Sci.**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 14-20, 2020. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14983>

ROSADO-SOUZA, L. *et al.* Understanding source–sink interactions: progress in model plants and translational research to crops. **Mol Plant**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 96-121, 2023. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14983>

SADDHE, A. A.; MANUKA, R.; PENNA, S. Plant sugars: homeostasis and transport under abiotic stress in plants. **Physiol Plant**, [s. l.], v. 171, n. 4, p. 739-755, 2021. <https://doi.org/10.1111/ppl.13283>

SHAHID, S. A., ZAMAN, M.; HENG, L. Soil salinity: historical perspectives and a world overview of the problem. In: **Guideline for salinity assessment, mitigation and adaptation using nuclear and related techniques**. Springer, Cham, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3_2

SHAHZAD, B. *et al.* Root K⁺ homeostasis and signalling as a determinant of salinity stress tolerance in cultivated and wild rice species. **Environ Exp Bot.**, [s. l.], v. 201, p. 104944, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2022.104944>

SILVA, E. F. da. **Características fisiológicas envolvidas na resistência diferencial ao estresse salino em porta-enxertos de videira**. 2022. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife, 2022. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/9300>. Acesso em: 6 mar. 2024.

SLAMA, I. *et al.* Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. **Ann Bot.**, [s. l.], v. 115, n. 3, p. 433–447, 2015. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu239>

SMITH, M. R.; RAO, I. M.; MERCHANT, A. Source-sink relationships in crop plants and their influence on yield development and nutritional quality. **Front Plant Sci.**, [s. l.], v. 9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01889>

SPEROTTO, R. A. *et al.* Rice grain Fe, Mn and Zn accumulation: how important are flag leaves and seed number? **Plant Soil Environ.**, v. 59, n. 6, p. 262-266, 2013. <https://doi.org/10.17221/841/2012-PSE>

VARELA, A. L. N. *et al.* A resistant cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) genotype became susceptible to cowpea severe mosaic virus (CPSMV) after exposure to salt stress. **J Proteomics.**, [s. l.], v. 194, p. 200-217, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.015>

VILLAGÓMEZ-ARANDA, A. L. *et al.* Activating stress memory: eustressors as potential tools for plant breeding. **Plant Cell Rep.**, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 1481-1498, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02858-x>

WAKABAYASHI, Y. *et al.* Varietal difference in dynamics of non-structural carbohydrates in nodal segments of stem in two varieties of rice (*Oryza sativa* L.) at pre- and post-heading stages. **Plant Prod Sci.**, [s. l.], v. 25, p. 30-42, 2022. <https://doi.org/10.1080/1343943X.2021.1914513>

WANG, H. *et al.* Ethylene and nitric oxide are involved in maintaining ion homeostasis in *Arabidopsis* callus under salt stress. **Planta**, [s. l.], v. 230, n. 2, p. 293-307, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0946-y>

ZHANG, A. *et al.* Comparative proteomic analysis provides new insights into the regulation of carbon metabolism during leaf senescence of rice grown under field conditions. **J Plant Physiol.**, [s. l.], v. 167, p. 1380-1389, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.05.011>

ZHANG, J. *et al.* Effects of culm carbohydrate partitioning on basal stem strength in a high-yielding rice population. **Crop J.**, [s. l.], v. 5, p. 478-487, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.08.008>

ZHANG, W. *et al.* Cytokinin oxidase/dehydrogenase OsCKX11 coordinates source and sink relationship in rice by simultaneous regulation of leaf senescence and grain number. **Plant Biotechnol J.**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 335-350, 2021. <https://doi.org/10.1111/pbi.13467>