



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

EDNA FERNANDES DO NASCIMENTO

**VARIABILIDADE ESPACIAL DAS RESPOSTAS METABÓLICAS DE PLANTAS DE
ARROZ SOB SALINIDADE**

FORTALEZA

2023

EDNA FERNANDES DO NASCIMENTO

VARIABILIDADE ESPACIAL DAS RESPOSTAS METABÓLICAS DE PLANTAS DE
ARROZ SOB SALINIDADE

Monografia apresentada ao Curso de
Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso

FORTALEZA

2023

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)

N194v Nascimento, Edna Fernandes do.

Variabilidade espacial das respostas metabólicas de plantas de arroz sob salinidade / Edna Fernandes do Nascimento. – 2023.

53 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso.

1. Oryza sativa. 2. Estresse salino. 3. Metabolismo primário. 4. Metabólitos. I. Título.

CDD 661

EDNA FERNANDES DO NASCIMENTO

VARIABILIDADE ESPACIAL DAS RESPOSTAS METABÓLICAS DE PLANTAS DE
ARROZ SOB SALINIDADE

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 07/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Rosilene Oliveira Mesquita
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais e minha irmã.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua infinita bondade, por me reerguer e me acompanhar em todos os incontáveis momentos difíceis durante todos esses anos.

Aos meus pais Adriano e Erilane, por não medirem esforços no investimento da minha educação desde a minha infância, pelo apoio, ajuda e pelos preciosos momentos aos finais de semana, funcionando como minha válvula de escape em meio a um cotidiano caótico e turbulento.

À minha irmã Adriane Fernandes, pelas risadas, novelas e filmes de terror compartilhados.

À Instituição CNPq, pelo apoio financeiro essencial para o desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará, pelos quatro anos e meio que me proporcionaram desenvolvimento pessoal e profissional, além de me possibilitar vivenciar experiências singulares.

Ao Prof. Dr. Danilo Daloso, pela oportunidade de trabalhar com pessoas incríveis, solícitas e competentes, pela bondade, paciência, generosidade e por nunca desacreditar de mim apesar do drama. Agradeço pela excelente orientação, mas principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. Humberto Henrique pelos ensinamentos no decorrer da graduação, essencialmente nesse período final e por aceitar meu convite.

À Profa. Dra. Rosilene Mesquita por ser uma excelente profissional, ceder seu tempo e aceitar participar do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Albenísio Silveira pela oportunidade de trabalhar no laboratório e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Hélio Costa, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório sendo a minha primeira experiência como iniciação científica. Agradeço por acreditar em mim, pela amizade e ensinamentos.

À Lyndefania Lemos, Thais Andrade e Shahid Aziz pela amizade, conversas e bons momentos apesar do curto período que passei no Laboratório de Bioinformática.

À Kellyane Mendes por ser minha “mãe” no laboratório, por acreditar e me acalmar por inúmeras vezes, por me ajudar nesse trabalho. Mas agradeço principalmente pela bondade, gentileza e mesmo em pouco tempo, por me presentear com uma amizade tão sincera e única que vou levar sempre comigo. Sem dúvidas um dos meus maiores presentes do LabPlant.

À Rikaelly Sousa minha grande amiga do LabPlant, pelas risadas contagiantes, momentos engraçados, piadas, conversas sérias e descontraídas, surtos coletivos, aprendizados,

dias de coletas, almoços e até mesmo as raras jantas no RU (embora ela nunca me espere terminar). Obrigada pela sua amizade e por muitas vezes me animar quando eu mais precisava, sem nem ao menos saber que eu precisava.

À Lívia Cardoso pela amizade, pelo auxílio, dias de carona e encorajamento, mas principalmente por ser uma das pessoas mais incríveis que já conheci.

Aos meus amigos do LabPlant, Caroline Martins, Allana Sotero, Magna Santos, Eva Gomes, Jônatas Oliveira, Bruno Freire, Matheus Vasconcelos e Dany pela amizade, ajuda, ensinamentos e bons momentos juntos.

Aos meus colegas de graduação, Daniel Ribeiro, Adenilson Arcanjo, Ádria Helen, Edu Cunha, Feliphe Jacinto e Mariana de Freitas pelos surtos, risadas e bons momentos compartilhados.

À Bianca Holanda por ser uma amizade tão especial, pura e singular que eu nunca vou esquecer.

À Larissa Xavier pela amizade e por ser uma excelente tutora em todos os meus anos de graduação.

À Isabele Cavalcante pelos anos de amizade, pelos bons momentos e até mesmo pelos momentos ruins que fortaleceram a nossa amizade, pelas risadas calorosas, cumplicidade, confidências, por ter me escutado, me acalmado e me reerguido por diversas vezes.

Aos meus amigos, Sara Gomes, Levy Kevin, Yvina Santos, Lucas Benício, Ana Paula, Vitor Uchôa e Rômulo Freitas pelos anos de amizade e por serem amigos para além dos muros da universidade, por todas as risadas, almoços e jantas no RU, jogos do Brasil, calouradas, SANA, idas ao cinema e até mesmo momentos vergonhosos e por vezes estressantes que passamos juntos. Sem vocês eu dificilmente teria conseguido concluir a graduação já que tornaram tudo mais leve.

À Débora Evelyn e Leidiana Alves por serem meu ponto de equilíbrio, leveza e descontração, pelas risadas e por nunca, nenhuma vez sequer, desacreditarem de mim e da minha capacidade. Até mesmo nos meus piores dias, sabia que ao chegar em casa tudo ia melhorar pela presença de vocês. Obrigada por me desenvolverem como pessoa e me proporcionarem uma amizade e experiência de vida que eu jamais vou esquecer. Obrigada até mesmo pelas brigas sem fundamento o que só comprova a família e irmandade louca que desenvolvemos.

À Dalyla Sampaio, minha psicóloga e mais nova amiga, pelo carinho, cuidado e pela amabilidade. Agradeço muito por ter a conhecido.

Ao Raul Silva, uma das melhores pessoas e amizades que tive a sorte de conhecer.
Agradeço por sempre confiar em mim.

Ao meu avô Raimundo, onde quer que esteja sempre ficará guardado no meu coração.

Agradeço também aos profissionais da UFC, englobando todos os setores desde os funcionários da limpeza aos do RU, por toda a gentileza e sorrisos que sempre melhoraram os meus dias. Por fim, agradeço a todos que de certa forma participaram da minha trajetória durante esses anos e me moldaram como pessoa.

“Acredite sempre em si mesmo. Faça isso e não importa onde você esteja, você não terá nada a temer.”

(*Studios Ghibli*, 1999).

RESUMO

O arroz é uma das principais fontes de alimento no mundo. No entanto, a produtividade de plantas de arroz é substancialmente afetada pelo estresse salino. Assim, torna-se importante entender as respostas de plantas de arroz à salinidade, como forma de mitigar as perdas causadas por este fator de estresse e fornece novos alvos para a engenharia metabólica de plantas. Dentro desta perspectiva, embora diversos estudos venham desvendando mecanismos de aclimatação de plantas de arroz ao excesso de sal, pouco se sabe sobre como essas respostas variam espacialmente na planta. Neste trabalho, objetivamos elucidar como o estresse salino altera o metabolismo primário de diferentes órgãos de plantas de arroz. Plantas de arroz foram crescidas em solução hidropônica e submetidas ao excesso de NaCl (50 mM) no estádio R3. Após 40 dias sob excesso de sal, folhas bandeiras, folhas intermediárias, folhas senescentes, raiz e colmo foram coletados separadamente, sendo uma parte utilizada para a determinação da biomassa seca acumulada e outra congelada imediatamente em nitrogênio líquido para análise de perfil metabólico via cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Os resultados demonstraram que a biomassa seca total de plantas de arroz diminuiu após a imposição do excesso de NaCl, acelerando consideravelmente a senescência das folhas. De fato, a biomassa de folhas senescentes foi maior sob NaCl, quando comparado às plantas controle. As respostas metabólicas à salinidade variaram fortemente entre os órgãos de plantas de arroz, sendo mais drásticas nos órgãos fonte, sobretudo folhas bandeira e intermediárias, como revelado pela análise de componentes principais (PCA). Neste sentido, diversos metabólitos pertencentes ao grupo de aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos foram alterados após a salinidade. O nível de diversos aminoácidos aumentou nas folhas, principalmente nas folhas bandeiras e senescentes. Por exemplo, lisina, isoleucina, prolina, treonina e valina foram identificadas como biomarcadores da condição de estresse salino nas diferentes folhas. No entanto, nenhum metabólito foi identificado como biomarcador em comum entre todos os órgãos da planta de arroz, ressaltando que as respostas metabólicas ao estresse salino são órgão-específicas.

Palavras-chave: *Oryza sativa*; estresse salino; variação; metabolismo primário; metabólitos.

ABSTRACT

Rice is one of the main food sources in the world. However, the productivity of rice plants is substantially affected by salt stress. Thus, it becomes important to understand the responses of rice plants to salinity, to mitigate the losses caused by this stress factor and provides new targets for plant metabolic engineering. Within this perspective, although several studies have uncovered mechanisms of acclimatization of rice plants to excess salt, little is known about how these responses vary spatially in the plant. In this work, we aimed to elucidate how saline stress alters the primary metabolism of different organs of rice plants. Rice plants were grown in hydroponic solution and subjected to excess NaCl (50 mM) at the R3 stage. After 40 days under excess salt, flag leaves, intermediate leaves, senescent leaves, roots and stems were collected separately, with a part used to determine the accumulated dry biomass and another immediately frozen in liquid nitrogen for metabolic profile analysis via gas chromatography coupled to a mass spectrometer. The results demonstrated that the total dry biomass of rice plants decreased after the imposition of excess NaCl, considerably accelerating leaf senescence. In fact, senescent leaf biomass was higher under NaCl when compared to control plants. Metabolic responses to salinity varied strongly among rice plant organs, being more drastic in source organs, especially flag and intermediate leaves, as revealed by principal component analysis (PCA). In this sense, several metabolites belonging to the group of amino acids, sugars and organic acids were altered after salinity. The level of several amino acids increased in the leaves, mainly in flag and senescent leaves. For example, lysine, isoleucine, proline, threonine and valine were identified as biomarkers of salt stress condition in different leaves. However, no metabolite was identified as a common biomarker among all rice plant organs, emphasizing that metabolic responses to saline stress are organ-specific.

Keywords: *Oryza sativa*; salt stress; varia primary metabolism; metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Esquematização efeito salino	15
Figura 2	– Esquematização metodologia	24
Figura 3	– Plantas no início do estádio R3 em condições controle e tratamento salino 50 mM	25
Figura 4	– Análise de componente principal (PCA) dos órgãos de plantas de arroz do grupo controle e tratamento salino	27
Figura 5	– Mapas de calor de folhas de arroz em condição controle e salinidade	29
Figura 6	– Mapas de calor do colmo e raiz de plantas de arroz em condição controle e salinidade	30
Figura 7	– Biomarcadores de estresse da folha bandeira com base nas curvas ROC	31
Figura 8	– Biomarcadores de estresse da folha intermediária com base nas curvas ROC	32
Figura 10	– Biomarcadores de estresse da folha senescente com base nas curvas ROC ...	33
Figura 11	– Biomarcadores de estresse do colmo com base nas curvas ROC	34
Figura 12	– Biomarcadores de estresse da raiz com base nas curvas ROC	34
Figura 13	– Análise de componente principal (PCA) do grupo controle (A), tratamento salino (NaCl) e grupo controle relativo ao sal (C) dos órgãos de plantas de arroz	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Biomassa seca (MS) de os órgãos de planta de arroz do grupo controle e

NaCl

26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de macro e micronutrientes para preparo da solução nutritiva para plantas de arroz	21
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Colmo
FB	Folha Bandeira
FI	Folha Intermediária
FS	Folha Senescente
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GCMS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
MFSTA	N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoro acetamida
NaCl	Cloreto de Sódio
N	Nitrogênio
PCA	Análise de Componente Principal
R	Raiz
ROC	<i>Receive Operating Characteristic</i>
R3	Estádio Reprodutivo 3
UR	Umidade Relativa

LISTA DE SÍMBOLOS

- * Asterisco
- % Porcentagem
- ® Marca registrada

SUMÁRIO

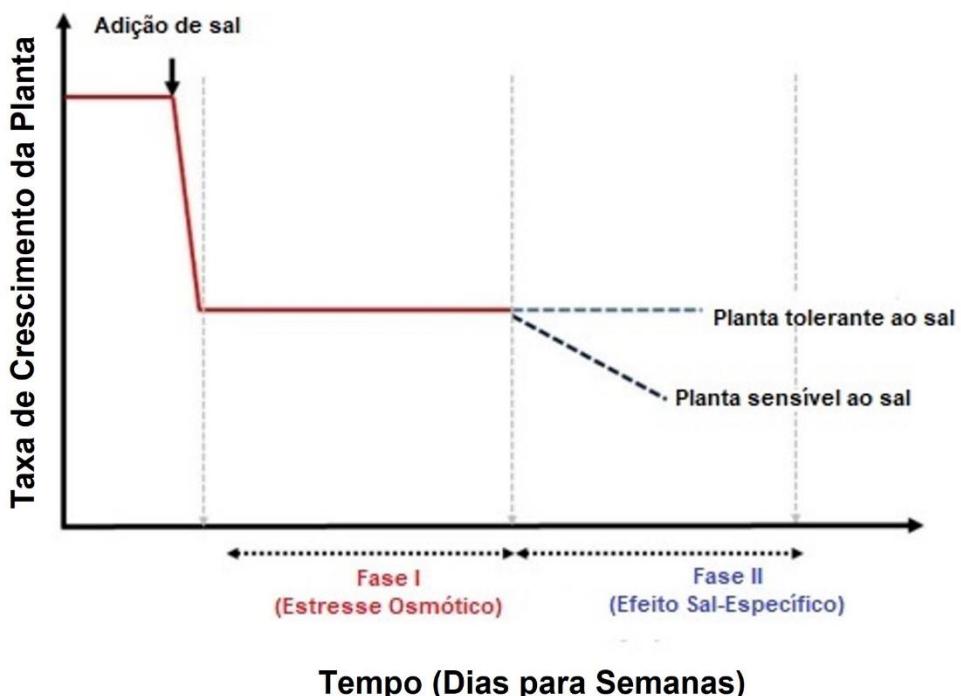
1	INTRODUÇÃO	14
2	PERGUNTAS DE PARTIDA	18
73	HIPÓTESE	18
74	OBJETIVOS	19
4.1	Objetivo geral	19
4.2	Objetivos específicos	19
5	METODOLOGIA	20
5.1	Estratégia experimental	20
5.2	Material vegetal e condições de crescimento	21
5.3	Biomassa seca	22
5.4	Extração e derivatização de metabólitos	22
5.5	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	23
5.6	Análise estatística	23
6	RESULTADOS	25
6.1	Impacto da salinidade na morfologia do arroz	25
6.2	Análise multivariada	26
6.3	Respostas metabólicas ao estresse salino	28
6.4	Biomarcadores de estresse	31
6.5	Variabilidade metabólica espacial no arroz	35
7	DISCUSSÃO	37
7.1	A salinidade reduz o acúmulo de biomassa seca de plantas de arroz	37
7.2	As alterações metabólicas em resposta ao estresse salino variam espacialmente	38
7.3	Rotas Metabólicas associadas ao estresse salino nas diferentes partes da planta	40
7.3.1	<i>Estresse salino induz a acumulação de açúcar em órgãos fonte</i>	40
7.3.2	<i>Aumento do nível de aminoácidos ocasionado pelo estresse</i>	41
7.3.3	<i>Variabilidade do nível de ácidos orgânicos em resposta ao estresse salino</i>	42
8	CONCLUSÃO	43

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o principal alimento básico de mais da metade da população mundial (SETHY *et al.*, 2020). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), a produção mundial de arroz foi 782,0 milhões de toneladas em 2018, sendo cultivado em todos os continentes, especialmente na Ásia, que representa cerca de 89% de produção. O arroz é uma glicófita, ou seja, uma espécie de planta que não é tolerante ao sal e que é danificada facilmente por altas concentrações salinas, sendo amplamente utilizado como modelo vegetal no melhoramento de tolerância à salinidade, já que a cultura é sensível a este estresse (RAZZAQUE *et al.*, 2017; GANIE *et al.*, 2019). Ademais, o arroz é o único cereal que pode ser cultivado na maioria dos solos afetados pelo sal, uma vez que se desenvolve bem em água parada, a qual atua na lixiviação dos sais da zona da raiz para camadas inferiores (JAGADISH *et al.*, 2012). A tolerância ao sal é um mecanismo complexo devido as respostas variáveis em níveis moleculares, por isso, o desenvolvimento de culturas tolerantes ao sal possui uma importância fundamental (KHAN *et al.*, 2019).

O estresse salino resulta em impactos negativos nas funções morfológicas, fisiológicas e bioquímicas das plantas. Os efeitos da salinidade em arroz ocorrem em dois estádios. O primeiro acontece na fase inicial do desenvolvimento da planta nos primeiros dias, no qual os efeitos osmóticos reduzem o desenvolvimento da planta. Enquanto o segundo envolve resposta à salinidade, quando surgem sintomas de toxicidade ocasionados pelo acúmulo e a sua translocação do excesso de sal dentro da planta em um período de semanas (Figura 1) (MUUNS, 2005). O excesso de sais no meio de crescimento impede a germinação de sementes, além de reduzir e alterar a absorção de nutrientes, o acúmulo e a translocação de biomassa, como também o rendimento de grãos (ZHANG e DAI, 2019; ZHU *et al.*, 2020). Essas transformações ocorrem em dimensões espaciais, ou seja, em diferentes órgãos da planta, já que as plantas são sistemas complexos, não estacionários e em constantes mudanças (KAISER *et al.*, 2015; LIMA-NETO *et al.*, 2021; GALVIZ *et al.*, 2022).

Figura 1 – Representação gráfica de taxa de crescimento da planta afetada pelo sal em escala de tempo.



Fonte: Adaptado de MUNNS, 2005.

Visto que as plantas são organismos modulares, em que os diferentes órgãos apresentam modos de funcionamento independentes, embora dentro do contexto sistêmico, complexo e dinâmico que é o indivíduo vegetal, o entendimento dos mecanismos de aclimatação das plantas à salinidade deve ter um embasamento fisiológico aprofundado com base nas particularidades de cada órgão das plantas (YANG *et al.*, 2020). Neste sentido, a relação fonte-dreno é um aspecto amplamente investigado para otimizar a produtividade e a resiliência de culturas agrícolas (PAUL *et al.*, 2017). A dinâmica de processos metabólicos e de transporte de seiva governam o fluxo de fotoassimilados entre órgãos fonte e dreno (DUARTE e PETIL 2010). Em geral, os órgãos fonte são responsáveis pela produção e exportação de assimilados produzidos pela fotossíntese e/ou remobilização de reservas, como degradação do amido à noite, representados principalmente pelas folhas completamente desenvolvidas (JIANG *et al.*, 2021). Os fotoassimilados podem ser utilizados como fonte energética necessária ao funcionamento da planta bem como podem ser direcionados, armazenados e consumidos pelos órgãos dreno como folhas jovens, raízes e caule (Figura 2) (JIANG *et al.*, 2021). A depender do nível e intensidade do estresse, a disponibilidade de transporte de fotoassimilados é reduzida, o que se caracteriza como um fator limitante para o crescimento e a produtividade.

Além disso, o estresse salino pode induzir a senescência prematura de folhas, reduzindo o tempo de vida de folhas fotossinteticamente ativas (SADE *et al.*, 2018). Assim, estudos que visam compreender as respostas dos diferentes órgãos da planta ao estresse são importantes para auxiliar na busca de novas estratégias de melhoria de produtividade e resiliência ao estresse (SONNEWALD *et al.*, 2018).

As respostas das plantas ao estresse podem envolver diferentes escalas de observação, desde mudanças (epi)genéticas, bioquímicas e as morfo-anatômicas, a depender da intensidade e duração do estresse (GALVIZ *et al.*, 2022). Neste sentido, o metabolismo é um fator importante a ser analisado ao considerar estratégias de aclimatação de espécies vegetais, uma vez que exibe alta plasticidade e é importante para a regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (FABREGAS *et al.*, 2021). O metabolismo vegetal pode ser dividido em metabolismo primário, também denominado como central, já que se refere a reações e vias vitais para a sobrevivência da planta, e metabolismo secundário, também identificado como especializado, visto que tem a funções específicas relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e, sobretudo, defesa vegetal (DELFIN *et al.*, 2019). Metabólitos primários, em geral, são os mais abundantes nos tecidos vegetais, possuem funções de sinalização em plantas e podem ser subdivididos em açúcares, aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos e ácidos orgânicos (POTT *et al.*, 2019). Além disso, vias específicas e especializadas que evoluíram a partir do metabolismo primário possuem um papel fundamental na formação de metabólitos secundários e na interação da planta com o ambiente em que está inserida (SAITO *et al.*, 2013).

Em condições de estresse, o aumento na concentração de metabólitos primários e/ou secundários podem aumentar a tolerância das plantas (GODOY *et al.*, 2021). Por exemplo, evidências demonstram que variações nos níveis de diferentes aminoácidos contribuíram para a tolerância de plantas de arroz à salinidade (GANIE *et al.*, 2019). A aclimatação ao estresse salino pode envolver a biossíntese de osmólitos, como um mecanismo de resposta inicial, que diminui o potencial osmótico da célula e permite a entrada de mais água na célula, diluindo, assim, a concentração de sal nas células (BANERJEE *et al.*, 2019; CHOUDHARY *et al.*, 2023). Dentro desses compostos, podem ser citados prolina, glicina e açúcares, sendo metabólitos comumente relatados como importantes marcadores de estresse em plantas (CHOUDHARY *et al.*, 2023). No entanto, analisando o comportamento de vias metabólicas primárias, é possível observar aumento ou diminuição de metabólitos de uma mesma rota em resposta ao estresse (ZHANG *et al.*, 2019). O acúmulo diferencial de metabólitos específicos sob salinidade pode

oferecer biomarcadores metabólicos que contornam impasses na busca contínua de alterações genômicas para aumentar a tolerância das plantas ao sal. Esses marcadores de estresse podem auxiliar na determinação de genótipos tolerantes em programas de melhoramento que visam melhorar a tolerância de plantas de arroz à salinidade (GANIE *et al.*, 2019).

A complexidade das respostas das plantas ao estresse salino pode ser melhor compreendida utilizando técnicas ômicas de alto rendimento, tal como a metabolômica (CHANG *et al.*, 2019; LLANES *et al.*, 2019). A metabolômica é uma técnica analítica de análise metabólica em larga escala, que vem sendo usada para aumentar a compreensão de como metabólitos específicos desempenham papéis cruciais nas respostas das plantas à salinidade (LLANES *et al.*, 2019). Estudos que envolvem metabolômica são cada vez mais comuns como estratégia biotecnológica na fisiologia vegetal e bioquímica de plantas. Neste sentido, a análise metabolômica baseada em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa é uma técnica robusta, reproduzível e sensível para a detecção de metabólitos polares (GHATAK *et al.*, 2018). O uso dessas ferramentas tem facilitado na compreensão da regulação de vias metabólicas ativadas por fatores promotores de estresse (LLANES *et al.*, 2019). No entanto, ainda que com o progresso tecnológico seja possível obter um aprofundamento teórico nos estudos do metaboloma de células ou tecidos estressados, estudos usando análises metabolômicas em plantas de arroz sob estresse salino são limitados, quando comparados a transcriptômica e proteômica (GANIE *et al.*, 2019). Neste sentido, o presente estudo visou caracterizar aspectos morfológicos e as respostas metabólicas de plantas de arroz quando submetidas a condições de salinidade. Dessa forma, este trabalho tem como enfoque principal avaliar mudanças no metabolismo primário de plantas de arroz sob excesso de sal (NaCl) em meio hidropônico por intermédio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Além disso, o estudo visou identificar as alterações metabólicas em diferentes órgãos da planta, prospectando possíveis marcadores de estresse que auxiliem como estratégias de aclimatação ao estresse em plantas de arroz.

2 PERGUNTAS DE PARTIDA

- Como a salinidade altera o metabolismo primário nos diferentes órgãos de plantas arroz?
- Quais são as semelhanças e diferenças nas respostas metabólicas de diferentes órgãos de plantas de arroz a salinidade?
- Quais os metabolitos são marcadores de estresse salino nos diferentes órgãos de plantas de arroz?

3 HIPÓTESE

A salinidade afeta diferencialmente os diferentes órgãos de plantas de arroz, o que indica que a aclimatação ao estresse salino envolve marcadores e mudanças metabólicas são órgão-específicas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar como a salinidade afeta espacialmente a resposta metabólica de plantas de arroz durante o estádio reprodutivo.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar como a salinidade altera o metabolismo primário de plantas de arroz;
- Determinar a acumulação de metabólitos em diferentes partes da planta, tais como folhas bandeiras, folhas intermediária, folhas senescentes, colmo e raiz;
- Identificar metabólitos marcadores de estresse salino nos diferentes órgãos da planta.

5 METODOLOGIA

5.1 Estratégia experimental

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Laboratório de Metabolismo de Plantas (LabPlant) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) foram cultivadas em casa de vegetação em um sistema hidropônico (Tabela 1). A casa de vegetação possui o ambiente parcialmente controlado. As plantas foram submetidas a dois tratamentos: controle (plantas crescidas em solução de Hoagland e Arnon 1950) e NaCl (plantas submetidas a 7 dias de estresse salino pelo excesso de NaCl). A salinidade foi imposta de maneira gradativa para aclimatação da planta ao sal. No estádio V4, foi adicionado a concentração de 25 mM de NaCl e após oito dias, no estádio V7, a concentração foi aumentada para 50mM, sendo mantida por mais vinte e cinco dias, quando então foi realizada a coleta no estádio R3.

A coleta foi realizada no início do desenvolvimento da panícula, equivalente ao estádio R3. Nesta etapa, as plantas foram subdivididas para congelar separadamente os diferentes órgãos. Foram coletadas as folhas do terço inferior (denominadas aqui como folhas senescentes), folhas do terço médio-intermediárias (denominadas aqui como folhas intermediárias) e folha do terço superior (identificadas aqui como folha bandeira), colmo e raiz. A divisão dos órgãos da planta foi realizada com intuito de analisar espacialmente as alterações metabólicas em resposta ao estresse salino.

Tabela 1 – Relação de macro e micronutrientes para preparo da solução nutritiva para plantas de arroz.

Sal	Nomenclatura	Massa Molar (g/mol)	Concentração (M)	Diluição (mL/L)
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Nitrato de cálcio	236,15	1	3
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio	53,49	1	2
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio	174,18	1	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio	246,48	1	1
KNO ₃	Nitrato de potássio	101,1	1	4
C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₈ Fe Na.H ₂ O	Fe-EDTA	421,1	0,1	2
H ₃ BO ₄	Ácido bórico	61,83	0,04	1
MnCl ₂ .4H ₂ O	Cloreto de manganês	197,9	0,009	1
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre	249,68	0,003	1
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinco	287,54	0,007	1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sódio	241,95	0,0001	1

Fonte: Adaptação de Hoagland e Arnon (1950).

5.2 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes não transgênicas do cultivar Nipponbare de arroz foram submetidas a um pré-tratamento de desinfestação em álcool (70%) por cinco minutos, e em seguida em solução de hipoclorito sódio (1%) por 15 minutos. Ao final do processo, as sementes passaram por sucessivos ciclos de lavagem com H₂O destilada estéril (5 vezes). Para acelerar a etapa de germinação, as sementes passaram 24h emergidas em H₂O destilada estéril no escuro para quebra de dormência. Por fim, as sementes foram semeadas em rolos de papel para germinação (Germitest®) umedecido em água destilada (2,5: 1, m/v) protegidas por sacos plásticos. As sementes foram acondicionadas por 11 dias em uma câmara de crescimento (16h de fotoperíodo, 100 µmol fôtons m⁻² s⁻¹, 25 ± 1 °C e umidade relativa de 53 ± 5%) até o transplantio. As plântulas de arroz foram transferidas para vasos plásticos de 3,6 L (2 plântulas por vaso) mantidos sob cultivo hidropônico, utilizando solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) diluída 1:4. As diluições da solução nutritiva foram progressivamente reduzidas semanalmente. As plantas de arroz permaneceram por 7 dias com solução nutritiva para se aclimatar na casa de vegetação. Após 7 dias, é induzida a primeira dose de sal de 25 mM para a planta se aclimatar ao sal. Posteriormente, a dose de NaCl é aumentada para 50 mM e permanece pelos 25 dias

restantes até a coleta. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação totalizando 40 dias, correspondente ao estádio de surgimento da panícula (R3) (COUNCE *et al.*, 2000).

5.3 Biomassa seca

Após a coleta das partes representativas da planta, foi realizada a determinação da biomassa seca dos diferentes órgãos através de uma balança analítica com o auxílio de um báquer. Cada órgão foi devidamente embalado e direcionado ao nitrogênio líquido para conservar sua estrutura e seus metabólitos. Posteriormente, foram armazenadas no Freezer - 80°C para sua conservação.

5.4 Extração e derivatização de metabólitos

A extração e derivatização de metabólitos polares foi realizado conforme o protocolo de LISEC *et al.*, (2006). As amostras congeladas foram maceradas e mantidas em condições de congelamento em nitrogênio líquido. Aliquotas de 50 mg de massa fresca foram transferidas para tubos de 2 mL. A extração foi realizada adicionando 700 µl de Methanol 100% + 30 µl da solução estoque de Ribitol (0.2 mg mL⁻¹ H₂O MiliQ) aos tubos contendo o material vegetal. Após homogeneização em vortex, os tubos foram transferidos para ThermoShaker e mantidos por 15 minutos a 950 rpm. Em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 11000 rcf a 4°C. 500 µl do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2 mL, onde foram adicionados 375 µl de Clorofórmio (CHCl₃) e homogeneizados em vortex por 15 segundos.

Foi adicionado posteriormente 750 µl de H₂O MiliQ, homogeneizados em vortex por 15 segundos e centrifugados por 15 minutos a 10000 rcf a 4°C. Realizou-se a transferência de 150 µl do sobrenadante presente no microtubo (1.5 mL), caracterizada pela fase polar. 500 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos backup. As amostras foram direcionadas ao Speedvac por um período mínimo de 10 horas e ao final desse período, foi rapidamente retirada e vedadas, submetidas ao armazenamento no freezer -80°C. Para a derivatização, as amostras foram tratadas com cloridrato de metoxilamina (20 mg mL⁻¹) em piridina anidra, direcionadas ao Shake por 2 horas em 37°C a 400 e centrifugadas por 30 segundos. Foi adicionado 35 µL de N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoro acetamida (MFSTA) e vortex. As amostras foram direcionadas ao Shake por 30 minutos a 37°C a 400 rcf e centrifugadas por 30 segundos, realizando a transferência de 50 µl para injeção na análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

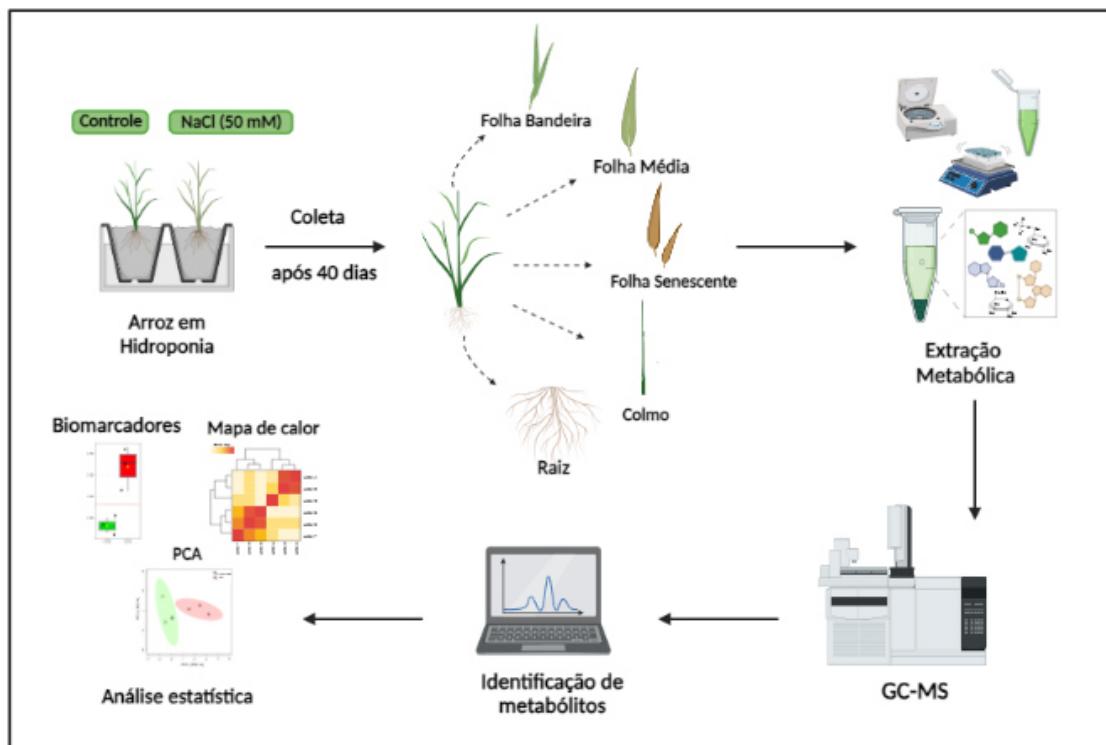
5.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A análise foi realizada utilizando o sistema GC-MS, QP-PLUS 2010, Shimadzu, Japão. Uma amostra de microlitro foi injetada no modo split (1:5) e a vazão de gás Hélio de 1,2 mL min⁻¹. A coluna capilar RTX-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) foi utilizada para a separação dos metabólitos, programada com uma temperatura inicial de 80 °C por 5 min, depois aumentada de 10 °C por minuto até 315 °C e mantido por 8 min. A injeção e a temperatura da fonte de íons foram mantidas a 250 °C e a temperatura da interface MS foi ajustada para 230 °C. Os dados foram exportados para posterior visualização de cromatogramas no Xcalibur software 2.1. Os metabólitos foram identificados utilizando a biblioteca de espectro de massas da *Golm Metabolome Database* (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>) (HUMMEL *et al.*, 2007) bem como com auxílio do software MS-DIAL (TSUAGWA *et al.*, 2015).

5.6 Análise estatística

O delineamento experimental inteiramente casualizado com 2 tratamentos, controle e NaCl com 1 coleta no início do estádio reprodutivo 3 subdividindo em 5 diferentes partes representativas da planta. Para a análise estatística, os dados foram normalizados pelo ribitol (controle endógeno) e posteriormente carregados no software *MetaboAnalyst* com transformação de raiz cúbica e escalonamento automático. Foram realizadas as análises de componentes principais (PCA) e de biomarcadores, este último com base nas curvas de característica de operação do receptor (ROC - *Receive Operating Characteristic*) usando a plataforma *MetaboAnalyst* (CHONG *et al.*, 2018). Diferenças pontuais entre os tratamentos foi identificada pelo teste T de Student ($P < 0.05$). O software MEV 4.9 foi utilizado para criar os mapas de calor, utilizando o controle como referência.

Figura 2 – Esquematização metodologia científica



Created in BioRender.com

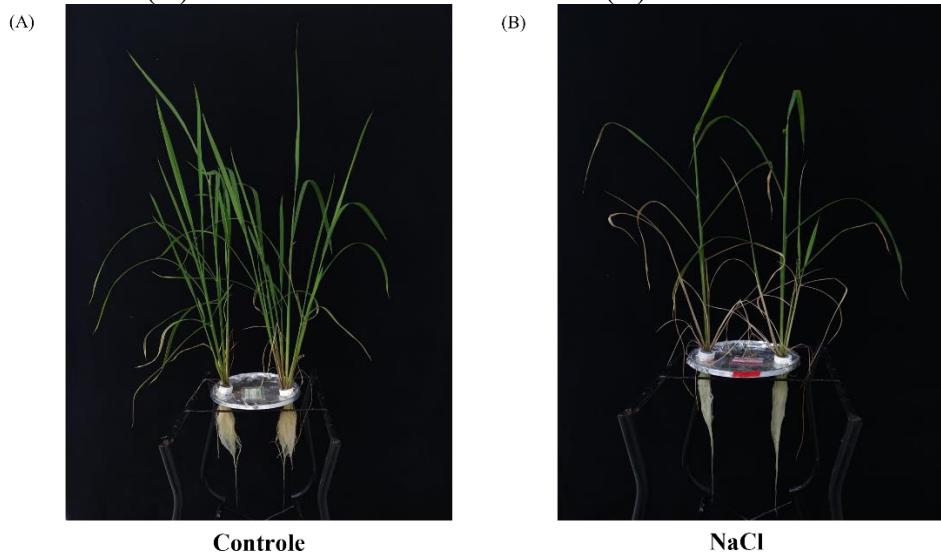
Fonte: elaborado pela autora (2023).

6 RESULTADOS

6.1 Impacto da salinidade na morfologia e crescimento de plantas de arroz

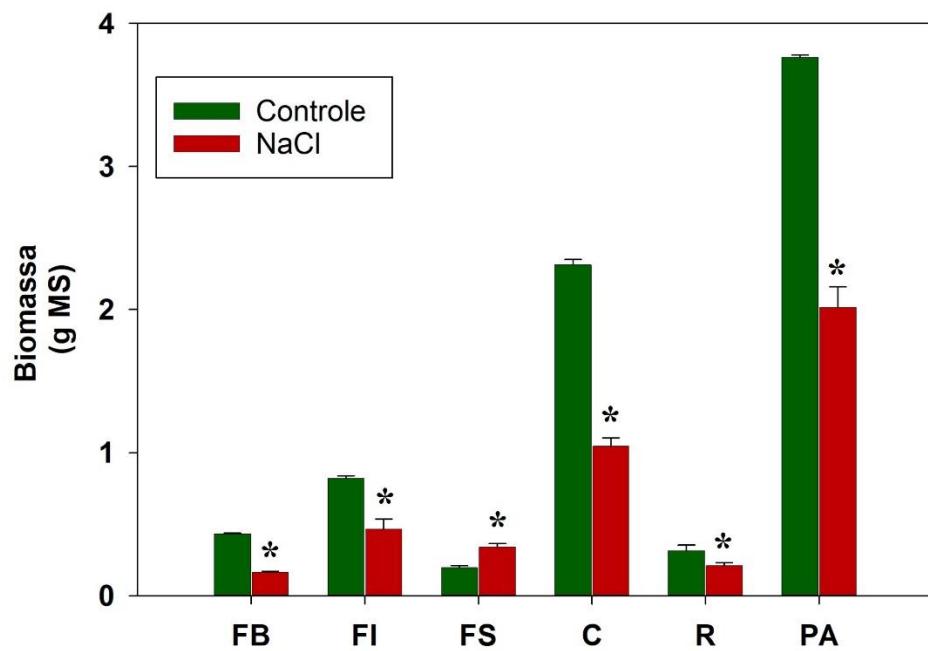
As plantas apresentaram sintomas severos de toxicidade induzida por 50 mM de NaCl. O número de folhas senescentes foi aparentemente maior em plantas com tratamento salino do que plantas em ausência de estresse (Figura 3). A biomassa seca reduziu significativamente em quase todos os órgãos, com exceção das folhas senescentes, que apresentaram aumento sob excesso de NaCl. Ao compararmos a parte aérea, é perceptível o efeito na salinidade na redução significativa da biomassa seca (Gráfico 1).

Figura 3 – Plantas no início do estádio reprodutivo R3 em condições controle (A) e com tratamento salino 50mM (B)



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Gráfico 1 – Biomassa seca (MS) de diferentes órgãos de planta de arroz do grupo controle e NaCl 50mM. Asterisco (*) indica diferença significativa entre controle e NaCl em cada órgão FB: Folha Bandeira; FI: Folha Intermediária; FS: Folha Senescente; C: Colmo; R: Raiz e PA: Parte Aérea.

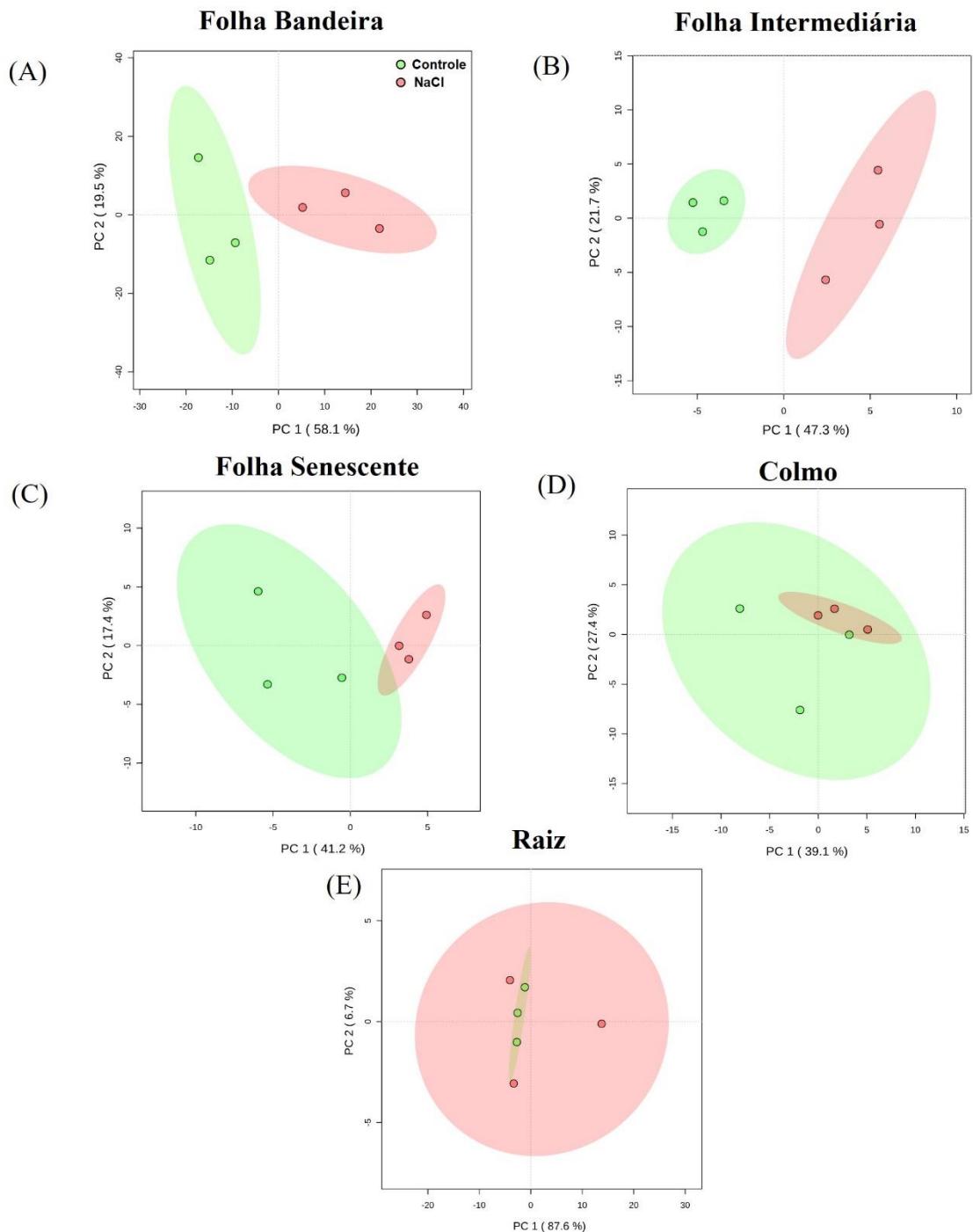


Fonte: elaborado pela autora (2023).

6.2 Análise de componentes principais revelam quais órgãos foram mais afetados pela salinidade ao nível metabólico

Para investigar como a salinidade afetou o metabolismo dos diferentes órgãos da planta, os dados de perfil metabólico foram analisados via análise de componentes principais (PCA). O objetivo foi investigar o quanto drástico foi o efeito do excesso de NaCl sobre o metabolismo de diferentes órgãos da planta, que é evidenciado pela separação das amostras/tratamentos em um PCA. Interessantemente, o tratamento NaCl foi separado do controle apenas nas folhas, sobretudo na folha bandeira e folha intermediária, em que o grau de separação pelo componente 1 (PC1) é evidente, enquanto na folha senescente o grau de separação entre NaCl e o grupo controle foi menor (Figuras 4A-C). Em contrapartida, o tratamento controle e NaCl apresentaram sobreposição tanto colmo como raiz (Figuras 4D-E). Portanto, conclui-se que as partes mais jovens da planta, o que se refere as folhas bandeiras e intermediárias, apresentaram maior diferença entre o grupo controle e o tratamento salino, quando comparado com as folhas senescentes, colmo e raiz.

Figura 4 – Análise de componente principal (PCA) dos órgãos de plantas de arroz do grupo controle e tratamento salino.

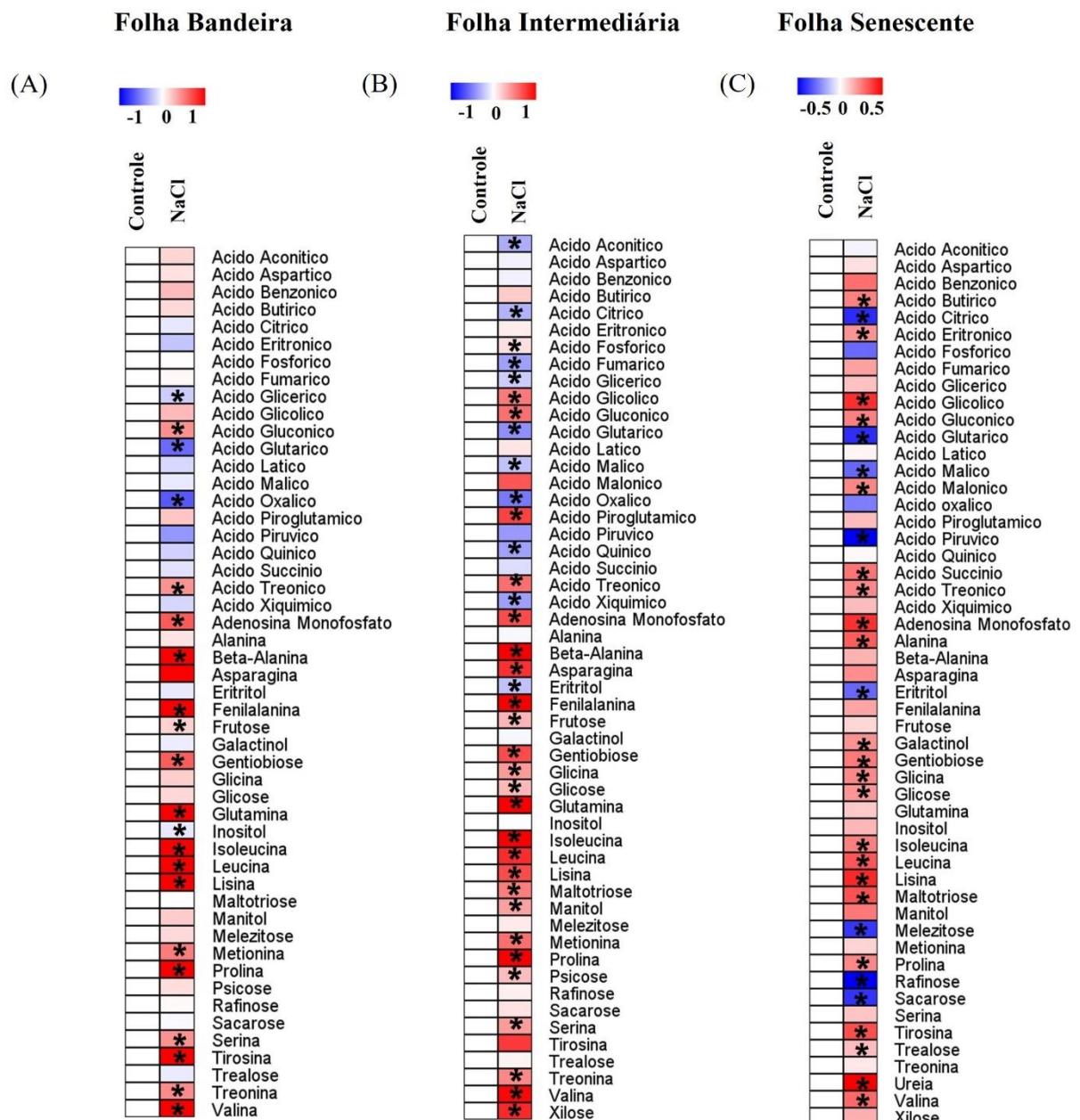


Fonte: elaborado pela autora (2023).

6.3 Respostas metabólicas de plantas de arroz ao estresse salino

Com o intuito de analisar o acúmulo dos metabólitos nos diferentes órgãos em condição de salinidade, foi realizada a caracterização metabólica de plantas de arroz através de mapas de calor. Foram identificados entre 46 e 52 metabólitos, de acordo com o órgão, pertencentes às classes de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros. Na folha bandeira, é perceptível o aumento significativo do acúmulo de metabólitos, principalmente aminoácidos, em resposta ao sal. Em contraste, alguns ácidos orgânicos, como ácidos glicérico, glutárico e oxálico, apresentaram reduções sob salinidade (Figura 5A). Em geral, os resultados das folhas intermediárias se assemelham aos das folhas bandeiras, como aumento nos níveis de aminoácidos e diminuição nos níveis de ácidos orgânicos (Figura 5B). No entanto, quando comparada com as folhas mais jovens, a folha senescente apresentou um aumento no nível de ácidos orgânicos (Figura 5C). Além disso, de forma diferenciada, a folha senescente foi o único órgão a apresentar ureia, com um aumento significativo neste metabólito. Outra distinção na folha senescente é a diminuição significativa nos níveis de açúcares (Figura 5C).

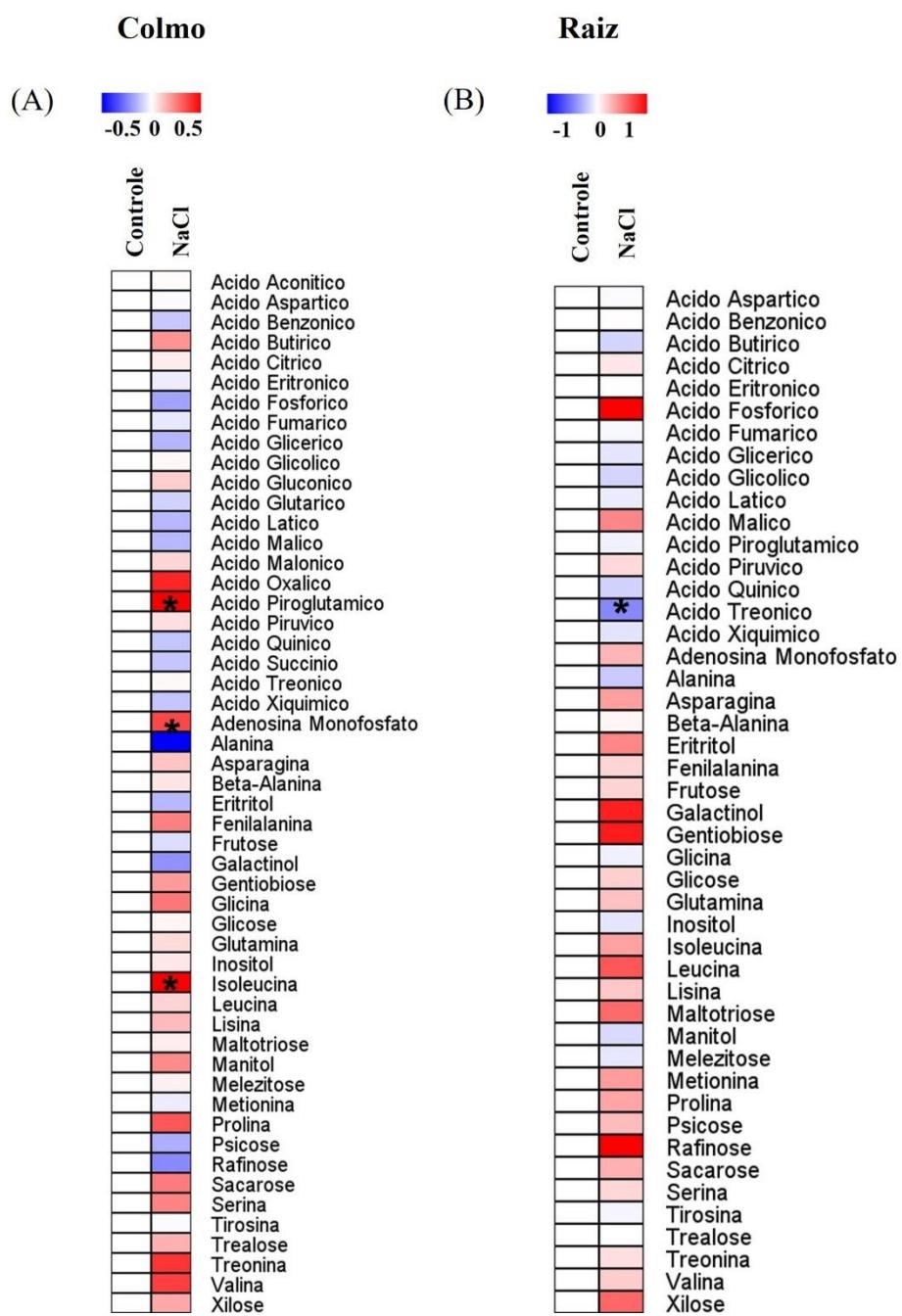
Figura 5 – Mapas de calor de folhas de arroz em condição controle e salinidade. A cor azul indica a diminuição e a vermelha indica o aumento de cada metabólito



Fonte: elaborado pela autora (2023).

De acordo com a não separação do colmo e raiz entre controle e salinidade observada no PCA, poucos metabólitos apresentaram diferenças significativas entre controle e NaCl nestes órgãos (Figuras 6A-B). No colmo, apenas três metabólitos apresentaram aumentos significativos sob sal (Figuras 6A), enquanto apenas um (ácido treônico) apresentou diferença significativa na raiz sob sal, quando comparado ao controle (Figuras 6B).

Figura 6 – Mapas de calor do colmo e raiz de plantas de arroz em condição controle e salinidade. A cor azul indica a diminuição e a vermelha indica o aumento de cada metabólito



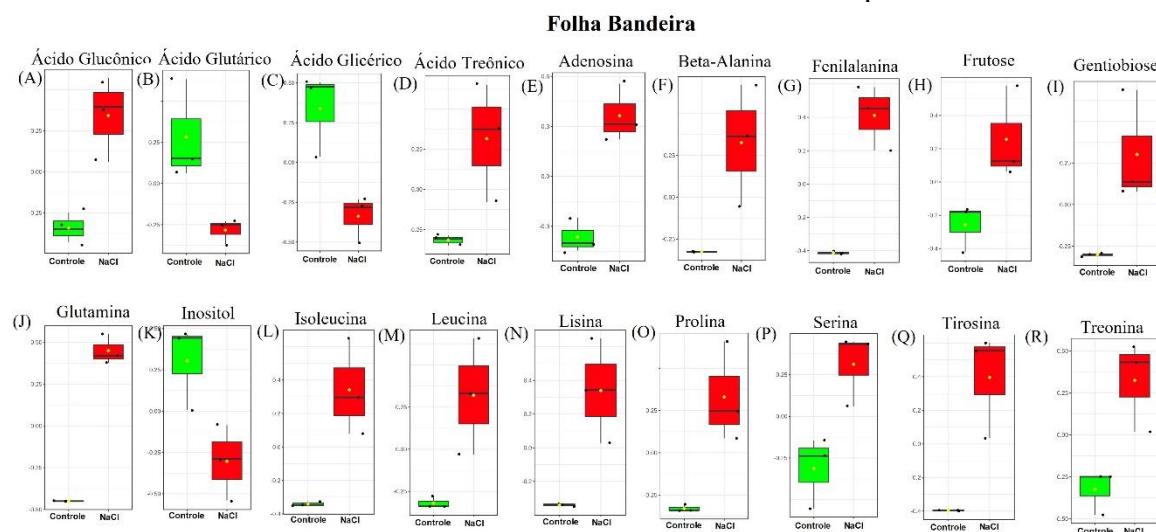
Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tomando em conjunto, esses resultados ressaltam que as respostas metabólicas à salinidade variam fortemente entre os órgãos de plantas de arroz. Neste sentido, as folhas apresentaram as maiores alterações, com claro aumento no teor de aminoácidos.

6.4 Identificação de metabólitos biomarcadores de estresse salino nos diferentes órgãos de plantas de arroz

Para identificar quais metabólitos são biomarcadores de estresse salino, foi realizada a análise de biomarcadores da plataforma *MetaboAnalyst* com base nas curvas de característica de operação do receptor (ROC - *Receive Operating Characteristic*). Foram identificados 20, 18, 10, 3 e 1 metabólito como biomarcadores de estresse na folha bandeira, folha intermediária, folha senescente, colmo e raiz respectivamente. Dentre esses, nenhum metabólito foi identificado como biomarcador em comum entre todos os órgãos da planta de arroz. As três diferentes folhas apresentaram os aminoácidos lisina, isoleucina, prolina, treonina e valina como biomarcadores e com conteúdo aumentado sob condição de estresse.

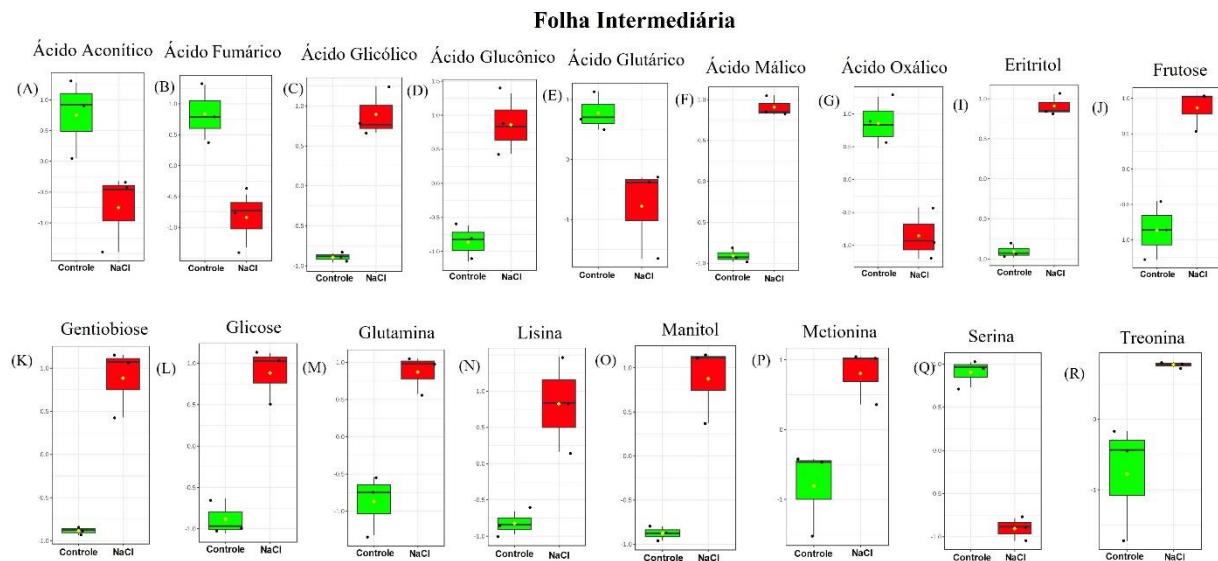
Figura 7 – Biomarcadores de estresse da folha bandeira com base nas curvas ROC. Os gráficos de caixa verde e vermelha indicam o conteúdo relativo do metabólito no controle e tratamento salino respectivamente



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Na folha intermediária foram encontrados uma maior quantidade de biomarcadores de estresse, no qual consiste majoritariamente no aumento dos aminoácidos e diminuição do conteúdo de ácidos orgânicos (Figura 8). As folhas bandeiras e intermediárias obtiveram mais metabólitos biomarcadores coincidentes do que a folha senescente.

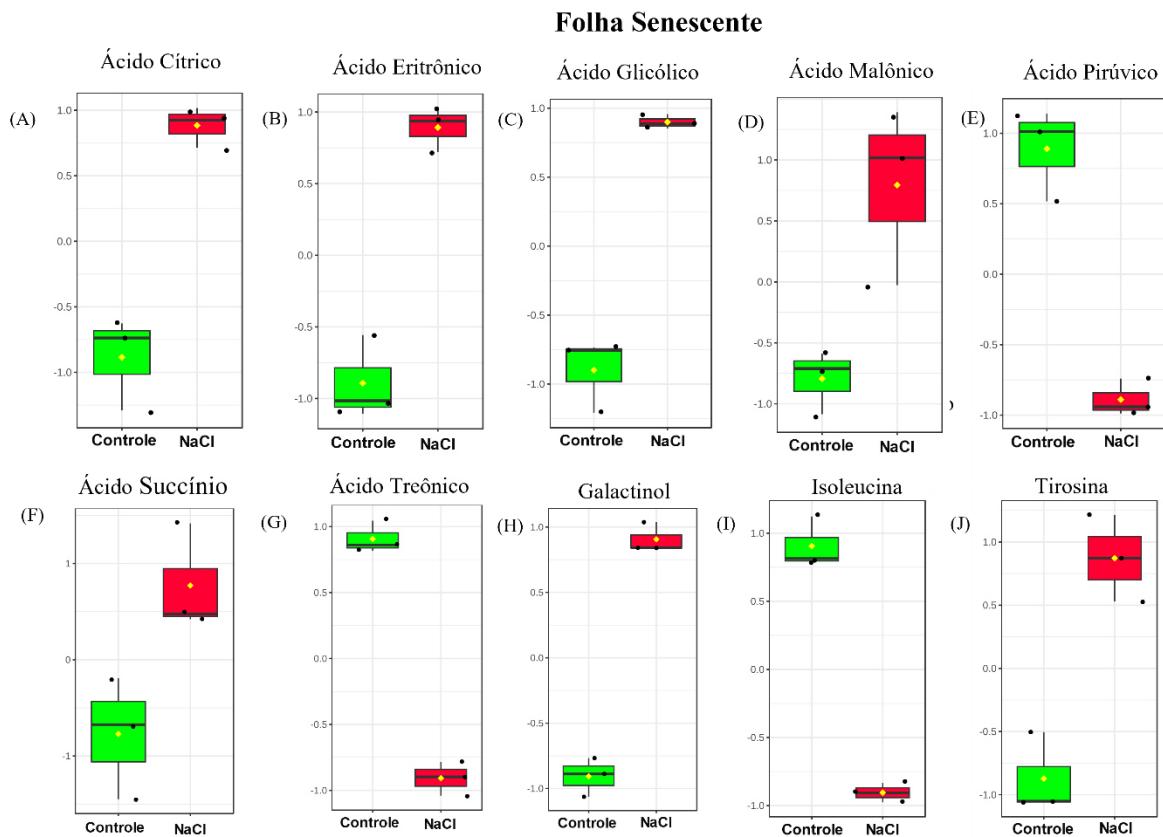
Figura 8 – Biomarcadores de estresse da folha intermediária com base nas curvas ROC. Os gráficos de caixa verde e vermelha indicam o conteúdo relativo do metabólito no controle e tratamento salino respectivamente



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Curiosamente, ao compararmos as três folhas, é perceptível que a folha senescente conteve menos biomarcadores sendo a maioria ácidos orgânicos (Figura 9).

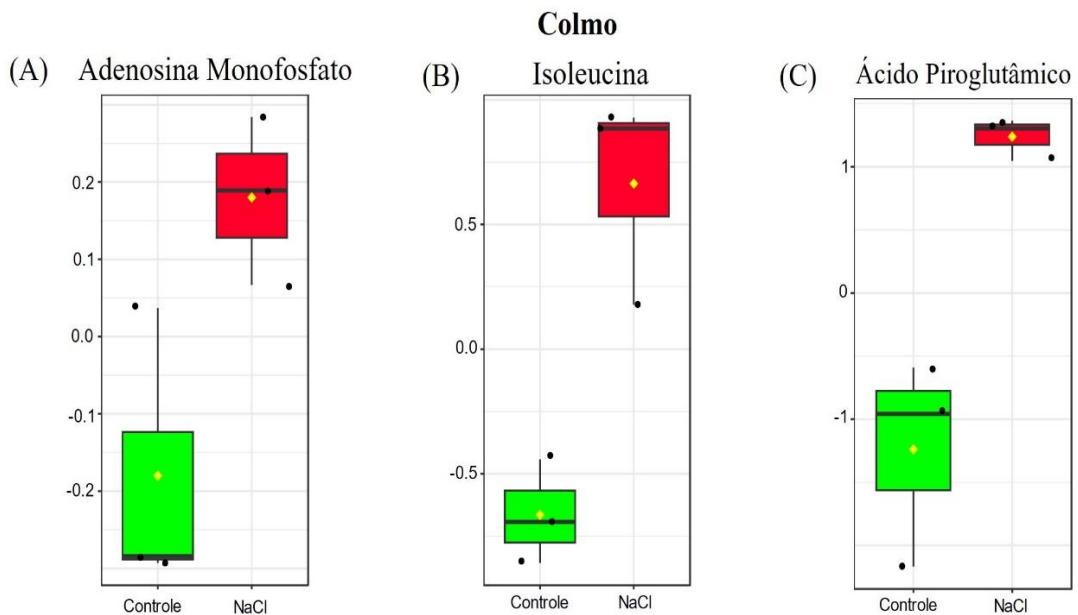
Figura 9 – Biomarcadores de estresse da folha senescente com base nas curvas ROC. Os gráficos de caixa verde e vermelha indicam o conteúdo relativo do metabólito no controle e tratamento salino respectivamente



Fonte: elaborado pela autora (2023).

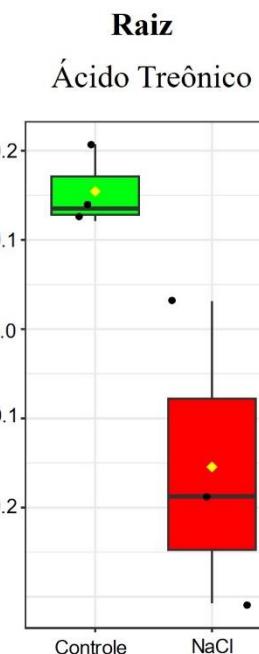
O colmo apresentou somente três biomarcadores de estresse, de classes distintas, (Figuras 10A-C). Como supracitado, a raiz apresentou o menor número de biomarcadores, o seu único biomarcador o ácido treônico contém o seu nível diminuído na raiz, embora seja um biomarcador nas três folhas com seu conteúdo aumentado (Figura 11). Dessa maneira, a variação de biomarcadores é evidente nos diferentes órgãos representativos do arroz.

Figura 10 – Biomarcadores de estresse do colmo com base nas curvas ROC. Os gráficos de caixa verde e vermelha indicam o conteúdo relativo do metabólito no controle e tratamento salino respectivamente.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 11 – Biomarcadores de estresse da raiz com base nas curvas ROC. Os gráficos de caixa verde e vermelha indicam o conteúdo relativo do metabólito no controle e tratamento salino respectivamente.



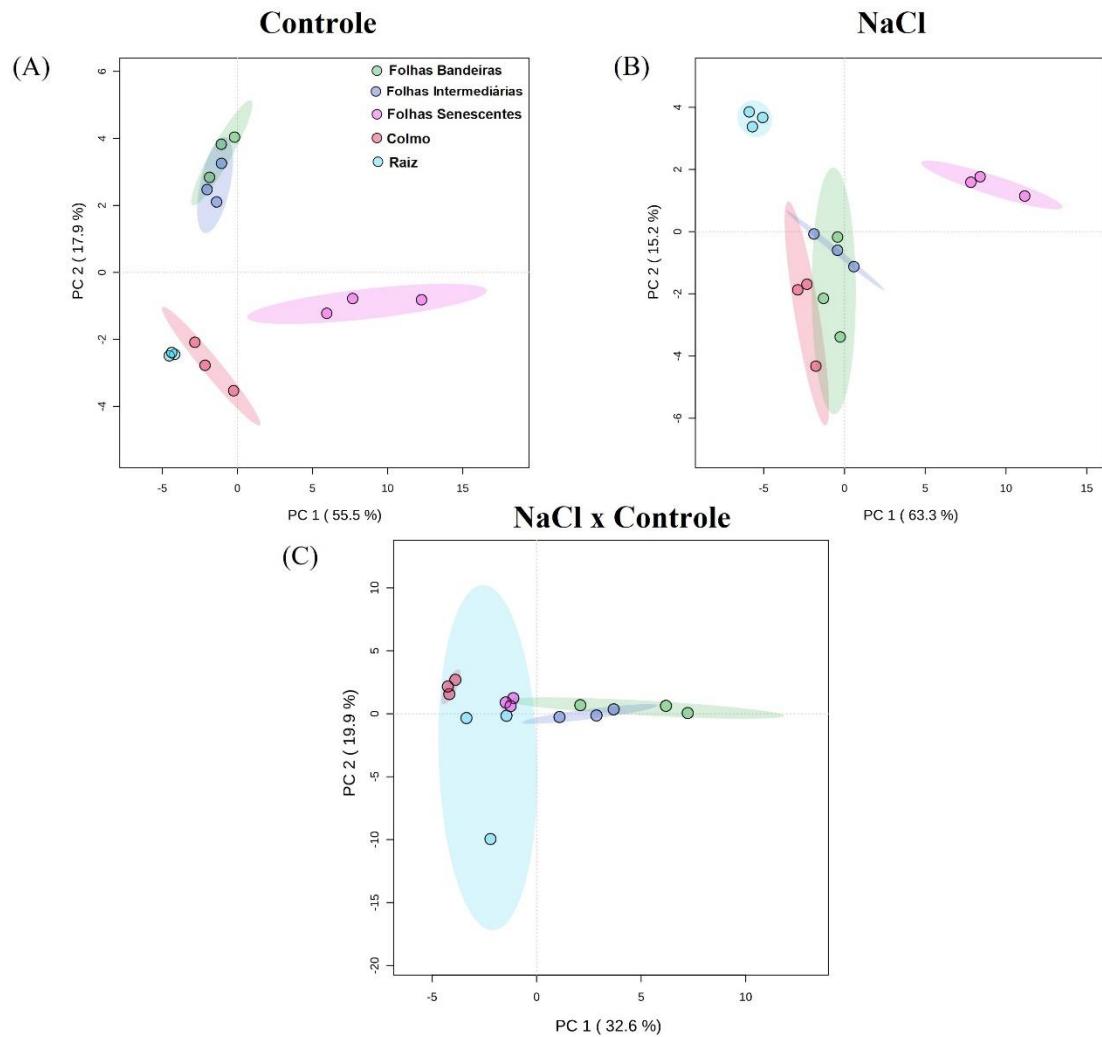
Fonte: elaborado pela autora (2023).

Em suma, não foi encontrado biomarcadores em comum a todos os órgãos analisados. Neste sentido no estádio R3, os órgãos fonte apresentaram claramente uma maior quantidade de metabólitos como biomarcadores, se comparado aos órgãos dreno, colmo e raiz. Além disso, a folha senescente apresentou uma maior diversidade de metabólitos biomarcadores. A variação espacial de biomarcadores de estresse sugere possíveis estratégias e mecanismos metabólicos para aclimatação da planta ao estresse salino que seja particular de cada órgão.

6.5 Variação metabólica espacial no arroz

As análises descritas acima foram realizadas para comparar espacialmente a variação do acúmulo de metabólitos nos cinco órgãos em resposta à salinidade. No entanto, essas análises não ressaltam as diferenças entre os órgãos. Dentro desta perspectiva, nós comparamos o perfil metabólico de cada órgão via PCA. No grupo controle, é nítido a formação de 3 grupos, formados pelas folhas mais jovens (folha bandeira e folha intermediária), órgãos dreno (raiz e o colmo) e a folha senescente (Figura 12A). No grupo tratado com NaCl, também ocorreu uma subdivisão entre 3 grupos. Porém, curiosamente, o colmo foi agrupado junto com as folhas mais jovens, enquanto da raiz e folha senescente mantiveram separadas isoladamente (Figura 12B). Visto que os órgãos apresentam diferenças metabólicas substâncias mesmo na ausência de estresse (Figura 12A), nós então decidimos analisar as mudanças metabólicas relativas em cada órgão. Para isso, os dados do tratamento de NaCl foram normalizados de acordo com os dados do controle dentro de cada órgão. O PCA usando esses dados normalizados ressaltam que as mudanças metabólicas relativas das folhas bandeiras e intermediária diferem das outras partes da planta, como evidenciado pela separação desses tratamentos dos demais pelo PC1 (Figura 12C). Esses resultados ressaltam que existe uma variação metabólica entre os diferentes órgãos das plantas, mesmo na ausência de estresse, e que a imposição do estresse salino altera especialmente o metabolismo das folhas bandeira e intermediária.

Figura 12 – Análise de componente principal (PCA) do grupo controle (A), tratamento salino (NaCl) e grupo controle relativo ao sal (C) dos órgãos de plantas de arroz.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

7 DISCUSSÃO

A aclimatação de plantas a fatores abióticos promotores de estresse pode envolver a ativação de diferentes vias metabólicas, incluindo o acúmulo de metabólitos primários como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos (ZHANG *et al.*, 2022). Assim, identificar rotas metabólicas e metabólitos responsivos ao estresse pode fornecer novas perspectivas sobre o processo de aclimatação das plantas ao estresse, que, por consequência, otimiza a obtenção de plantas mais tolerantes via engenharia metabólica de plantas (LLANES *et al.*, 2018). No entanto, embora o número de trabalhos investigando as respostas metabólicas de plantas sob estresse vem crescendo ao longo dos anos, a dinâmica da variação metabólica em diferentes órgãos da planta permanece pouco explorada. Isso se deve ao fato de que a maioria dos estudos se limitam a investigar as respostas dos principais órgãos fotossintéticos, como as folhas completamente expandidas e, no caso de plantas de arroz, das folhas bandeiras. Considerando que as plantas apresentam alta conectividade entre seus órgãos, analisar as respostas dos diferentes órgãos torna-se crucial para entender como o estresse afeta o indivíduo vegetal. Dentro desta perspectiva, nós desenvolvemos um estudo usando como modelo plantas de arroz submetidas ao estresse salino. Ao mesmo tempo que nosso estudo fornece informações sobre a aclimatação de plantas de arroz sob NaCl, também contribui para o entendimento de como este estresse afeta o metabolismo de diferentes órgãos da planta.

7.1 A salinidade reduz o acúmulo de biomassa seca de plantas de arroz

O arroz é uma glicófita sensível a salinidade, sofrendo efeitos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos sob este estresse (RIAZ *et al.*, 2019). No nosso estudo, o excesso de NaCl reduziu o crescimento das plantas e induziu o processo de senescência das folhas, que pode ser evidenciado pela diminuição da biomassa dos diferentes órgãos, exceto das folhas senescentes, que foi maior no estresse em relação ao controle (Figura 1). O colmo e a raiz apresentaram a maior redução de biomassa. De fato, estudos prévios demonstraram que o sal diminui o crescimento da planta e acelera a senescência das folhas ((ASHRAF, 2004; CHANG *et al.*, 2019; JAN *et al.*, 2019; RIAZ *et al.*, 2019; FRUKH *et al.*, 2020). Evidências ressaltam que a senescência é agravada na presença de estresse e a planta começa a exportar e remobilizar nutrientes por processos catabólicos (KIM, 2019). Os efeitos desfavoráveis para o crescimento

e desenvolvimento da planta pode ser devido aos efeitos osmóticos e iônicos causados pelo excesso de sal, levando a uma limitação da área foliar e consequente redução no crescimento (ZORB *et al.*, 2019). Cabe ressaltar ainda que o estádio de crescimento e os determinados tipos de órgãos são fatores importantes para analisar a sensibilidade do arroz ao sal, sendo o estádio reprodutivo um dos mais sensíveis a salinidade (CHANG *et al.*, 2018). Neste sentido, a parte aérea da planta apresentou a maior redução de biomassa, quando comparado com a raiz.

7.2 As alterações metabólicas em resposta ao estresse salino variam espacialmente

Como forma de comparar as respostas metabólicas de diferentes órgãos de plantas de arroz submetidas ao excesso de NaCl, nós realizamos análise de componentes principais (PCA) usando dados de perfil metabólico de diferentes folhas, colmo e raiz. Comparando o controle com o tratamento salino nos órgãos individualmente, observamos que as respostas metabólicas foram mais severas nas folhas, sobretudo folhas intermediárias (FI) e bandeira (FB), como evidenciado pela completa separação do controle e NaCl pelo PC1 (Figuras 4A-E). Isso também foi observado por estudos prévios que identificaram uma clara separação de plantas com e sem sal via PCA usando dados de perfil metabólico de folhas *Egletes viscosa* (BATISTA *et al.*, 2019). De fato, as folhas, principalmente FI e FB, foram os órgãos mais responsivos ao sal, como evidenciado pela separação nos PCAs (Figuras 4A-B, Figura 12C) e pelo maior número de biomarcadores de estresse e de metabólitos estatisticamente diferente no tratamento NaCl, quando comparado com o controle do mesmo órgão (Figuras 4A-B).

Quando os órgãos foram comparados entre si, identificamos diferenças substanciais no metabolismo deles mesmo na ausência de estresse. Interessantemente, enquanto os órgãos fonte (FB e FI) e dreno (colmo e raiz) formaram dois clusteres, folhas senescentes (FS) foram separadas desses dois clusteres pelo PC1 ou PC2 do PCA (Figura 12A). Esses resultados sugerem que as FS apresentam um metabolismo particular, sendo intermediário aos órgãos fonte e dreno. Surpreendentemente, essas diferenças entre órgãos fonte e dreno são levemente alteradas sob excesso de NaCl, uma vez que o colmo, antes clusterizado junto da raiz, passou a clusterizar junto das FB e FI (Figura 12B), sugerindo uma possível transição do colmo de dreno para fonte sob estresse salino (ZHAO *et al.*, 2022). Diversos metabólitos podem circular entre os órgãos fonte e dreno e desempenharem funções específicas de acordo com o órgão (SADDHE *et al.*, 2020). Dessa forma, a variação metabólica espacial observada entre os órgãos fonte e dreno de plantas de arroz na ausência de estresse pode ser explicada pelas diferentes demandas e particularidades metabólicas dos diferentes órgãos. Além disso, cada metabólito

possui funcionalidades diferentes, que podem beneficiar os distintos órgãos. De fato, constatamos que as FB e FI, por serem órgãos fonte, são mais similares a nível metabólico, bem como a raiz e o colmo, órgãos dreno, são mais semelhantes entre si (Figura 12A). Já a FS, que apresentou diferença a nível metabólico aos demais órgãos, não pode ser definida como fonte ou dreno. De acordo com WOO e colaboradores (2019), as FS sofrem mudanças metabólicas já que estão mais relacionadas com a sobrevivência da planta e a produção ideal das folhas mais jovens.

Nas FB e FI, os biomarcadores de estresse foram majoritariamente aminoácidos que acumularam em resposta ao estresse. Similarmente, o colmo também apresentou diferentes aminoácidos como biomarcadores de estresse salino. Os aminoácidos são a principal forma de transporte de nitrogênio na planta, sendo transportados entre os órgãos fonte e dreno (TEGEDER e HAMMES, 2018). Além disso, os aminoácidos são importantes para a aclimatação de plantas ao estresse, auxiliando no ajustamento osmótico das células via, por exemplo, o acúmulo de prolina, e/ou atuando como substratos alternativos para respiração mitocondrial, em que se observa a degradação de aminoácidos e estímulo da respiração via ciclo de Krebs ou rotas alternativas (HIDELBRANDT, 2018; HEINEMAN e HIDELBRANDT, 2018; ZADALINAS *et al.*, 2022). Portanto, as respostas das plantas ao estresse envolvem rotas metabólicas relacionadas à interface entre o metabolismo de aminoácidos e ácidos orgânicos do ciclo de Krebs. De fato, diversos ácidos orgânicos foram encontrados como biomarcadores de estresse salino em FB, FI e FS. Os ácidos orgânicos do ciclo de Krebs são sintetizados usando carbonos da glicólise, que por sua vez podem ser oriundos da fixação de carbono fotossintético ou degradação de moléculas de reserva, como amido e lipídeos (MOLLER *et al.*, 2020). Estes ácidos estão presentes nas diferentes partes da planta, atuando desde substratos para respiração como na mobilização de minerais, secretados principalmente nas raízes auxiliando na absorção de nutrientes (PANCHAL *et al.*, 2021). Interessantemente, o único biomarcador de estresse encontrado na raiz foi apenas um ácido orgânico (ácido treônico). Conforme documentado anteriormente, o estresse estimula a liberação de ácidos orgânicos das raízes e a sua exsudação ocorre para regular o potencial osmótico (PANCHAL *et al.*, 2021; YANG *et al.*, 2022).

7.3 Rotas Metabólicas associadas ao estresse salino nas diferentes partes da planta

7.3.1 Estresse salino induz a acumulação de açúcares em órgãos fonte

O nível de diversos açúcares aumentou em resposta ao estresse salino, principalmente nas FB e FI (Figuras 5A-B). Ademais, frutose e gentiobiose foram identificados como biomarcadores deste estresse nessas folhas (Figuras 7H-I, Figuras 8J-K), além de glicose que se mostrou biomarcadora de estresse salino nas FI (Figura 8L). Açúcares solúveis são dinâmicos e complexos, atuando na defesa das células como osmoprotetores e moléculas sinalizadoras de curta e longa distância (HENNION *et al.*, 2019; SALMON *et al.*, 2020). A alteração nos níveis de açúcares é amplamente documentada em resposta a diferentes tipos de estresse (OBATA *et al.*, 2018), sendo uma resposta para aclimatação e sobrevivência da planta, que pode variar a depender da espécie vegetal ou mesmo do estresse abiótico que resulta em acúmulos distintos e muitas vezes opostos desses açúcares (ZADALINAS *et al.*, 2022). Açúcares álcoois como eritritol, inositol, manitol e galactinol também estão sendo relatados como importantes para a defesa de plantas sob estresse (AZANO *et al.*, 2022). No nosso trabalho, foi observado alterações em açúcares álcoois em resposta a salinidade, principalmente nas folhas.

Interessantemente, os níveis de sacarose e rafinose diminuíram de maneira significativa nas FS, enquanto não houve alterações nestes metabólitos no colmo, raiz, FB e FI (Figuras 5-6). Resultados contrastantes foram observados em plantas de trigo, em que o estresse osmótico estimulou um maior acúmulo de açúcares solúveis na raiz do que nas folhas. Além disso, a raiz teve como resposta metabólica específica a síntese de sacarose em resposta a salinidade (DARKO *et al.*, 2019). Ademais, ZHAO e colaboradores (2021) demonstraram que a rafinose apresentou um grande acúmulo nas raízes em resposta ao estresse hídrico. Os açúcares são sensíveis durante o estresse e tem o papel de garantir suprimentos dos órgãos fonte aos órgãos dreno como aclimatação, além de ser uma molécula de sinalização (FÁBREGAS *et al.*, 2018), sobretudo em situações de estresse (SADDHE *et al.*, 2020; MANTHON *et al.*, 2021). Dessa maneira, esses resultados sugerem que o acúmulo de açúcares nas folhas de arroz sob salinidade pode ser uma estratégia osmoprotetora e ter um papel de sinalização nesses órgãos.

7.3.2 O aumento no nível de aminoácidos induzidos pelo estresse salino é observado prioritariamente em folhas

O acúmulo de aminoácidos é um fator chave para a tolerância a diferentes estresses (KHAN *et al.*, 2020), e vem sendo reportado como um mecanismo de aclimatação de plantas a diferentes tipos de estresse (CARDOSO *et al.*, 2023). Aminoácidos ramificados (BCAAs), tais como lisina, valina, leucina, isoleucina, treonina, β -alanina e metionina, apresentaram aumento nos níveis e foram identificados como biomarcadores de estresse salino em diferentes órgãos, sobretudo folhas de plantas de arroz. O acúmulo de BCAAs é uma resposta comum e previamente demonstrada em folhas de *Arabidopsis* em resposta a seca (PIRES *et al.*, 2016; BATISTA-SILVA *et al.*, 2019) e outros fatores de estresse (JOSHI *et al.*, 2010; AZANO *et al.*, 2022). Além desses, observamos aumento nos níveis de outros aminoácidos como serina, arginina, glutamina e alanina nas folhas sob excesso de NaCl. O aumento destes aminoácidos pode estar associado ao armazenamento de precursores proteicos para auxiliar a planta na rápida recuperação após o estresse (BATISTA-SILVA *et al.*, 2019).

Em geral, o conteúdo de aminoácidos livres aumenta em plantas sob estresse. O acúmulo de aminoácidos pode ser oriundo da degradação de proteínas (ARAUJO *et al.*, 2021), como forma de minimizar os efeitos ocasionados pelo estresse (HILDEBRANDT *et al.*, 2018). No nosso estudo, as FB e FI apresentaram um maior teor de aminoácidos que os outros órgãos, sugerindo que o acúmulo desses compostos é um mecanismo que ocorre prioritariamente nas folhas fotossinteticamente ativas, como forma de minimizar os danos nesses órgãos em situação de estresse. Além dos BCAAs, o estresse salino também induziu o acúmulo de fenilalanina nas FB e FI, um aminoácido de cadeia aromática, similar ao observado em resposta ao frio e estresse por metais pesados (AZANO *et al.*, 2022). Fenilalanina é um dos precursores para a síntese de metabólitos secundários (LEES e GALILI 2008), que incluem diversos antioxidantes importantes para a defesa vegetal contra estresses bióticos e abióticos (LI *et al.*, 2021).

Além desses, o estresse salino induziu o acúmulo de prolina nas FB e FI, um aminoácido osmoprotetor para o metabolismo das plantas. O acúmulo de prolina foi similarmente observado em folhas de planta de pepino em resposta ao estresse salino (NALIWAJSKI *et al.*, 2021). Estudos prévios ressaltam que a prolina é acumulada não só na salinidade, como também na aclimatação à seca, frio, mas não por calor (LV *et al.*, 2011; PER *et al.*, 2017). O acúmulo de prolina tem sido reportado como importante para manter a homeostase celular, o ajuste osmótico e a absorção de água (GOSH *et al.*, 2021). Tomados em

conjunto, nossos resultados sugerem que os mecanismos de acumulação de aminoácidos em resposta ao estresse, amplamente relatados na literatura, são específicos de órgãos fonte, ao menos nas condições de intensidade e duração do estresse salino testadas aqui.

7.3.3 Variabilidade do nível de ácidos orgânicos em resposta ao estresse salino

Ácidos orgânicos são importantes em condições de estresse, já que exercem uma função osmoprotetora, além de serem fonte de carbono pra diversas rotas metabólicas e substratos para a respiração vegetal (AZANO *et al.*, 2020). De maneira geral, os ácidos orgânicos diminuíram nos diferentes órgãos, embora alguns ácidos orgânicos aumentaram em FS (Figura 5). Curiosamente, a mesma tendência de diminuição é observada em resposta ao estresse hídrico (AZANO *et al.*, 2020), embora menos ácidos orgânicos diminuíram de forma consistente, se comparado ao estresse salino. No nosso estudo, o ácido pirúvico diminuiu de maneira significativa nas folhas o que se contrapõe ao estudo de ARIF *et al.*, (2018) e OLIVEIRA (2020), em que o ácido pirúvico aumenta consideravelmente em resposta a salinidade em plantas de musgo e sorgo, respectivamente. O ácido pirúvico é um componente do ciclo do ácido cítrico que possui um papel fundamental na resistência de condições ambientes adversas (KWON *et al.*, 2019). Outros metabólitos que participam da respiração celular, tais como ácido málico e ácido cítrico, assim como no nosso estudo, diminuíram em folhas de milho em resposta à seca, salinidade e estresse térmico (ARIF *et al.*, 2018; JOSHI *et al.*, 2021). Assim, diferentemente de açúcares e aminoácidos, os ácidos orgânicos possuem uma maior variabilidade nos níveis em cada órgão em resposta ao estresse salino, o que evidencia a sua versátil marca de resposta ao estresse.

8 CONCLUSÃO

O estresse salino reduziu o acúmulo de biomassa nos diferentes órgãos de plantas de arroz, com exceção a FS. O efeito do estresse salino no metabolismo varia substancialmente entre os órgãos da planta de arroz, sendo as FB e FI as que apresentaram maiores mudanças em resposta à salinidade. Essas folhas apresentaram respostas comuns ao estresse, como aumento nos níveis de aminoácidos e açúcares. Assim, nosso estudo ressalta que os mecanismos de aclimatação e os metabólitos biomarcadores de estresse salino são órgão-específicos. Visto que a prospecção de metabólitos e rotas metabólicas associadas ao estresse são fundamentais para a escolha de genes a serem manipulados geneticamente com intuito de obter genótipos mais tolerantes a salinidade, o presente estudo ressalta a importância de se entender a variabilidade espacial das respostas das plantas ao estresse. Todavia, para uma maior compreensão da variabilidade metabólica em resposta ao estresse, são necessários estudos investigando as respostas espaciais juntamente com as variáveis tempo e doses de sal, que contribuirão para aperfeiçoar nosso entendimento sobre a dinâmica espaço-temporal das respostas metabólicas aos diferentes níveis de estresse salino.

REFERÊNCIAS

- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, et al (2011) Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. **Trends Plant Sci** 16:489–498. doi: 10.1016/j.tplants.2011.05.008
- ARIF, M. A. et al. Abscisic acid, cold and salt stimulate conserved metabolic regulation in the moss *Physcomitrella patens*. **Plant Biology**, v. 20, n. 6, p. 1014-1022, 2018.
- ASHRAF, Muhammad. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 199, n. 5, p. 361-376, 2004. <https://doi.org/10.1078/0367-2530-00165>
- CARDOSO LL, Freire FBS, Daloso DM. 2023. Plant Metabolic Networks Under Stress: a Multi-species/Stress Condition Meta-analysis. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 23, 4–21.
- CHANG, Jing et al. Morphological and metabolic responses to salt stress of rice (*Oryza sativa L.*) cultivars which differ in salinity tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 144, p. 427-435, 2019 <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.017>
- Chong, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Res.** 46, W486–W494 (2018). doi: 10.1093/nar/gky310.
- CHOUDHARY, Sadaf et al. Cellular responses, osmotic adjustments, and role of osmolytes in providing salt stress resilience in higher plants: polyamines and nitric oxide crosstalk. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 2, p. 539-553, 2023. doi:10.1007/s00344-022-10584-7
- COUNCE, Paul A.; KEISLING, Terry C.; MITCHELL, Andrew J. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, v. 40, n. 2, p. 436-443, 2000. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.402436x>
- CUI, Feng et al. Identification of metabolites and transcripts involved in salt stress and recovery in peanut. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 217, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00217>
- DARKO, Eva et al. Metabolic responses of wheat seedlings to osmotic stress induced by various osmolytes under iso-osmotic conditions. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. e0226151, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226151>
- DE OLIVEIRA, Daniel Farias; LOPES, Lineker de Sousa; GOMES-FILHO, Enéas. Metabolic changes associated with differential salt tolerance in sorghum genotypes. **Planta**, v. 252, p. 1-18, 2020. doi: 10.1007/s00425-020-03437-8
- Dong, S. & Beckles, D.M. (2019) Dynamic changes in the starch-sugar interconversion within plant source and sink tissues promote a better abiotic stress response. *Journal of Plant Physiology*, **234**, 80– 93. doi: 10.1016/j.jplph.2019.01.007.

DU, Yanli et al. Efeito do estresse hídrico no metabolismo de açúcares em folhas e raízes de mudas de soja. **Fisiologia e Bioquímica Vegetal**, v. 146, p. 1-12, 2020. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/237224>>.

FÀBREGAS, Norma et al. Overexpression of the vascular brassinosteroid receptor BRL3 confers drought resistance without penalizing plant growth. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 4680, 2018. doi: 10.1038/s41467-018-06861-3.

FÀBREGAS, Norma; FERNIE, Alisdair R. The interface of central metabolism with hormone signaling in plants. **Current Biology**, v. 31, n. 23, p. R1535-R1548, 2021. doi: 10.1016/j.cub.2021.09.070.

FANG, Chuanying; FERNIE, Alisdair R.; LUO, Jie. Exploring the diversity of plant metabolism. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 1, p. 83-98, 2019. doi: 10.1016/j.tplants.2018.09.006.

FAO. Disponível em: <<https://www.fao.org/brasil/pt/>>

FRUKH, Arajmand et al. Modulation in growth, biochemical attributes and proteome profile of rice cultivars under salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 146, p. 55-70, 2020. doi: 10.1016/j.plaphy.2019.11.011

GALVIZ, Y., Souza, G. M., Lüttge, U. (2022). The biological concept of stress revisited: relations of stress and memory of plants as a matter of space–time. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, 34(2), 239-264. DOI:10.1007/s40626-022-00245-1

GANIE, Showkat Ahmad et al. Advances in understanding salt tolerance in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, p. 851-870, 2019. doi: 10.1007/s00122-019-03301-8

GHATAK, Arindam; CHATURVEDI, Palak; WECKWERTH, Wolfram. Metabolomics in plant stress physiology. **Plant genetics and molecular biology**, p. 187-236, 2018. https://doi.org/10.1007/10_2017_55

GHOSH, U. K. et al. Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. **Plant Biology**, v. 24, n. 2, p. 227-239, 2022. doi: 10.1007/10_2017_55.

HEINEMANN, Björn; HILDEBRANDT, Tatjana M. The role of amino acid metabolism in signaling and metabolic adaptation to stress-induced energy deficiency in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 13, p. 4634-4645, 2021. doi: 10.1093/jxb/erab182.

Hennion, N., Durand, M., Vriet, C., Doidy, J., Mauroisset, L., Lemoine, R., et al. (2019) Sugars en route to the roots. Transport, metabolism and storage within plant roots and towards microorganisms of the rhizosphere. **Physiologia Plantarum**, **165**, 44– 57. doi: 10.1111/ppl.12751

HILDEBRANDT, Tatjana M. Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during Arabidopsis abiotic stress response. **Plant molecular biology**, v. 98, p. 121-135, 2018. doi: 10.1007/s11103-018-0767-0.

HUMMEL, Jan et al. The Golm Metabolome Database: a database for GC-MS based metabolite profiling. In: **Metabolomics: a powerful tool in systems biology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 75-95. doi: 10.1093/bioinformatics/bti236

- ISKANDAR, Hayati M. et al. Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2011. doi: 10.1186/1471-2229-11-12.
- JAN, Muhammad et al. Modulation in growth, gas exchange, and antioxidant activities of salt-stressed rice (*Oryza sativa* L.) genotypes by zinc fertilization. **Arabian Journal of Geosciences**, v. 12, p. 1-7, 2019. <https://doi.org/10.3390/su15031804>
- JOSHI, Jaya et al. A core metabolome response of maize leaves subjected to long-duration abiotic stresses. **Metabolites**, v. 11, n. 11, p. 797, 2021. doi: 10.3390/metabo11110797
- JOSHI, Vijay et al. Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. **Amino acids**, v. 39, p. 933-947, 2010. doi: 10.1007/s00726-010-0505-7.
- KAISER E., Morales A., Harbinson J., Kromdijk J., Heuvelink E., Marcelis L. F. M (2015) Dynamic photosynthesis in different environmental conditions. **Journal of Experimental Botany** 66(9): 2415–2426. doi: 10.1093/jxb/eru406
- KHAN, Mohd Shahrbaj et al. An investigation on the role of salicylic acid alleviate the saline stress in rice crop (*Oryza sativa* (L)). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101027, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101027>
- KHAN, Naeem et al. Role of sugars, amino acids and organic acids in improving plant abiotic stress tolerance. **Pak. J. Bot**, v. 52, n. 2, p. 355-363, 2020. doi: 10.3390/ijms24076603
- KIM, Jeongsik. Sugar metabolism as input signals and fuel for leaf senescence. **Genes & genomics**, v. 41, n. 7, p. 737-746, 2019. doi: 10.1007/s13258-019-00804-y.
- KUSUDA, Hiroki et al. Ectopic expression of myo-inositol 3-phosphate synthase induces a wide range of metabolic changes and confers salt tolerance in rice. **Plant Science**, v. 232, p. 49-56, 2015. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.12.009
- KWON, Min Cheol et al. Comparative metabolomics unravel the effect of magnesium oversupply on tomato fruit quality and associated plant metabolism. **Metabolites**, v. 9, n. 10, p. 231, 2019. doi: 10.3390/metabo9100231.
- LESS, Hadar; GALILI, Gad. Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses. **Plant physiology**, v. 147, n. 1, p. 316-330, 2008. doi: 10.1104/pp.108.115733
- Li B, Fan R, Sun G, et al (2021) Flavonoids improve drought tolerance of maize seedlings by regulating the homeostasis of reactive oxygen species. *Plant Soil* 461:389–405. doi: 10.1007/s11104-020-04814-8
- LI, Mingxia et al. Comparison of salt tolerance in *Soja* based on metabolomics of seedling roots. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1101, 2017. doi: 10.3389/fpls.2017.01101.
- LI, Zhou et al. Root metabolites remodeling regulated by γ -aminobutyric acid (GABA) improves adaptability to high temperature in creeping bentgrass. **Plant and Soil**, p. 1-15, 2023. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.10.025

LIMA-NETO M. C., Carvalho F. E. L., Souza G. M., Silveira J. A. G. (2021). Understanding photosynthesis in a spatial–temporal multiscale: the need for a systemic view. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, 33: 113–124. doi: 10.1007/s40626-021-00199-w.

LISEC, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. **Nature protocols**, 1(1), 387-396. doi: 10.1038/nprot.2006.59.

LIU, Ling et al. Galactinol synthase confers salt-stress tolerance by regulating the synthesis of galactinol and raffinose family oligosaccharides in poplar. **Industrial Crops and Products**, v. 165, p. 113432, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113432>

LLANES, Analía et al. Metabolomic approach to understand plant adaptations to water and salt stress. In: Plant metabolites and regulation under environmental stress. **Academic Press**, 2018. p. 133-144 doi: 10.3390/ijms22179108

LV, Wei-Tao et al. Proline accumulation is inhibitory to Arabidopsis seedlings during heat stress. **Plant Physiology**, v. 156, n. 4, p. 1921-1933, 2011. doi: 10.1104/pp.111.175810
 MATHAN, Jyotirmaya; SINGH, Anuradha; RANJAN, Aashish. Sucrose transport in response to drought and salt stress involves ABA-mediated induction of OsSWEET13 and OsSWEET15 in rice. **Physiologia plantarum**, v. 171, n. 4, p. 620-637, 2021. doi: 10.1111/ppl.13210.
 MELANDRI, Giovanni et al. Biomarkers for grain yield stability in rice under drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 2, p. 669-683, 2020.

Møller IM, Igamberdiev AU, Bykova N V., Finkemeier I, Rasmussen AG, Schwarzländer M. 2020. Matrix redox physiology governs the regulation of plant mitochondrial metabolism through posttranslational protein modifications. **Plant Cell** 32, 573–594.

MUNNS, Rana. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New phytologist**, v. 167, n. 3, p. 645-663, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01487.x> doi: 10.1093/jxb/erz221.

NALIWAJSKI, Marcin; SKŁODOWSKA, Maria. The relationship between the antioxidant system and proline metabolism in the leaves of cucumber plants acclimated to salt stress. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 609, 2021. doi: 10.3390/cells10030609.

Obata T, Fernie AR (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. **Cell Mol Life Sci** 69:3225–3243. doi: 10.1007/s00018-012-1091-5

PANCHAL, Poonam; MILLER, Anthony J.; GIRI, Jitender. Organic acids: versatile stress-response roles in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 11, p. 4038-4052, 2021. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab019>

PER, Tasir S. et al. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant physiology and biochemistry**, v. 115, p. 126-140, 2017. doi: 10.1016/j.plaphy.2017.03.018.

RABBANI, M. Ashiq et al. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. **Plant physiology**, v. 133, n. 4, p. 1755-1767, 2003. doi: 10.1104/pp.103.025742.

RAZZAQUE, Samsad et al. Reproductive stage physiological and transcriptional responses to salinity stress in reciprocal populations derived from tolerant (Horkuch) and susceptible (IR29) rice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2017 doi: 10.1038/srep46138.

RIAZ, Muhammad et al. A comprehensive review on rice responses and tolerance to salt stress. **Advances in rice research for abiotic stress tolerance**, p. 133-158, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.017>

RODRIGUES-CORRÊA, Kelly Cristine da Silva; FETT-NETO, Arthur Germano. Abiotic stresses and non-protein amino acids in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 38, n. 5-6, p. 411-430, 2019. <https://doi.org/10.1080/07352689.2019.1707944>

SADDHE, Ankush A.; MANUKA, Rakesh; PENNA, Suprasanna. Plant sugars: Homeostasis and transport under abiotic stress in plants. **Physiologia plantarum**, v. 171, n. 4, p. 739-755, 2021. <https://doi.org/10.1111/ppl.13283>

SADE, Nir et al. Stress-induced senescence and plant tolerance to abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 4, p. 845-853, 2018. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx235> doi: 10.1093/jxb/erx235.

SAKURABA, Yasuhito; KIM, Dami; PAEK, Nam-Chon. Salt treatments and senescence induction. Plant senescence: methods and protocols, p. 141-149, 2018. doi: 10.1007/978-1-4939-7672-0_13.

Salmon, Y., Lintunen, A., Dayet, A., Chan, T., Dewar, R., Vesala, T., et al. (2020) Leaf carbon and water status control stomatal and nonstomatal limitations of photosynthesis in trees. *The New Phytologist*, **226**, 690– 703. doi: 10.1111/nph.16436

SAYED, Eman G. et al. Rootstock Priming with Shikimic Acid and Streptomyces griseus for Growth, Productivity, Physio-Biochemical, and Anatomical Characterisation of Tomato Grown under Cold Stress. **Plants**, v. 11, n. 21, p. 2822, 2022. doi: 10.3390/plants11212822.

SEIFIKALHOR, M. et al. γ -Aminobutyric acid confers cadmium tolerance in maize plants by concerted regulation of polyamine metabolism and antioxidant defense systems. *Sci Rep* 10: 3356. 2020. doi: 10.1038/s41598-020-59592-1.

SEIFIKALHOR, Maryam et al. Diverse role of γ -aminobutyric acid in dynamic plant cell responses. **Plant cell reports**, v. 38, p. 847-867, 2019. doi: 10.1007/s00299-019-02396-z.

SENGUPTA, Sonali et al. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 656, 2015. doi: 10.3389/fpls.2015.00656

SHAAR-MOSHE, L. et al. Phenotypic and metabolic plasticity shapes life-history strategies under combinations of abiotic stresses. **Plant Direct** 3, e00113. 2019. doi: 10.1002/pld3.113.

Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S.K., Sidhu, G.P., Bali, A.S., et al. (2019) Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. **Biomolecules**, **9**, 285. doi: 10.3390/biom9070285.

SHAVRUKOV, Yuri. Salt stress or salt shock: which genes are we studying?. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 1, p. 119-127, 2013. doi: 10.1093/jxb/ers316.

SONNEWALD, Uwe; FERNIE, Alisdair R. Next-generation strategies for understanding and influencing source–sink relations in crop plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 43, p. doi: 10.1016/j.pbi.2018.01.004.

SULTANA, Nigarin et al. Wheat leaf senescence and its regulatory gene network. **The Crop Journal**, v. 9, n. 4, p. 703-717, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.01.004>

SZABADOS, László et al. Plants in extreme environments: importance of protective compounds in stress tolerance. In: **Advances in Botanical Research**. Academic Press, 2011. p. 105-150. DOI:10.1016/B978-0-12-387692-8.00004-7

TEGEDER, Mechthild; HAMMES, Ulrich Z. The way out and in: phloem loading and unloading of amino acids. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 43, p. 16-21, 2018. doi: 10.1016/j.pbi.2017.12.002.

TODAKA, Daisuke et al. Temporal and spatial changes in gene expression, metabolite accumulation and phytohormone content in rice seedlings grown under drought stress conditions. **The Plant Journal**, v. 90, n. 1, p. 61-78, 2017. doi: 10.1111/tpj.13468

TONG, Ran et al. Metabolic profiles of moso bamboo in response to drought stress in a field investigation. **Science of The Total Environment**, v. 720, p. 137722, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137722

TSUGAWA, Hiroshi et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. **Nature methods**, v. 12, n. 6, p. 523-526, 2015. doi: 10.1038/nmeth.3393

VALDERRAMA-MARTÍN, José Miguel et al. A revised view on the evolution of glutamine synthetase isoenzymes in plants. **The Plant Journal**, v. 110, n. 4, p. 946-960, 2022. doi: 10.1111/tpj.15712

BATISTA, Valeria Chaves Vasconcelos et al. Salicylic acid modulates primary and volatile metabolites to alleviate salt stress-induced photosynthesis impairment on medicinal plant Egletes viscosa. **Environmental and Experimental Botany**, v. 167, p. 103870, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103870>

WANG, Huan et al. Alteration of nitrogen metabolism in rice variety 'Nipponbare' induced by alkali stress. **Plant and soil**, v. 355, p. 131-147, 2012. DOI 10.1007/s11104-011-1086-2

WOO, Hye Ryun et al. Leaf senescence: systems and dynamics aspects. **Annual Review of Plant Biology**, v. 70, p. 347-376, 2019. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-095859

XU, Bo et al. GABA signalling modulates stomatal opening to enhance plant water use efficiency and drought resilience. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1952, 2021. doi: 10.1038/s41467-021-21694-3

YANG, Xiaoyi et al. Primary root response to combined drought and heat stress is regulated via salicylic acid metabolism in maize. **BMC Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 417, 2022. doi: 10.1186/s12870-022-03805-4.

YANG, Z., Gao, S., Xiao, F. *et al.* Leaf to panicle ratio (LPR): a new physiological trait indicative of source and sink relation in japonica rice based on deep learning. **Plant Methods** 16, 117 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00660-y>

YANG, Z., Gao, S., Xiao, F. *et al.* Leaf to panicle ratio (LPR): a new physiological trait indicative of source and sink relation in japonica rice based on deep learning. **Plant Methods** 16, 117 (2020). doi: 10.1186/s13007-020-00660-y

ZANDALINAS, Sara I. et al. Plant responses to climate change: metabolic changes under combined abiotic stresses. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 11, p. 3339-3354, 2022.

ZHANG, Huiming et al. Abiotic stress responses in plants. **Nature Reviews Genetics**, v. 23, n. 2, p. 104-119, 2022. doi: 10.1038/s41576-021-00413-0.

ZHAO, Zhigang et al. Auxin regulates source-sink carbohydrate partitioning and reproductive organ development in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 36, p. e2121671119, 2022. doi: 10.1073/pnas.2121671119.

ZHU, G. Y.; KINET, J.-M.; LUTTS, Stanley. Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) F3 populations selected for salt resistance. I. **Physiological behaviour during vegetative growth**. **Euphytica**, v. 121, p. 251-263, 2001. doi:10.1023/A:1012016431577

Zhu, G., Wang, Y., Shi, X., Lu, H., Ren, Z., Shi, Y., Zhou, G. (2020). Optimum nitrogen management enhances growth, antioxidant ability and yield performance of rice in saline soil of coastal area of China. **Chilean journal of agricultural research**, 80, 4, 629-639.

ZHU, J.K., 2001. Plant salt tolerance. Trends **Plant Sci.** 6, 66-71.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01838-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01838-0)

ZÖRB, Christian; GEILFUS, C.-M.; DIETZ, K.-J. Salinity and crop yield. **Plant biology**, v. doi: 10.1111/plb.12884.