UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

LUAN VICTOR MAIA

USO DE PRIMING COM TUNICAMICINA E HIDROPRIMING EM SEMENTES DE ARROZ COMO ESTRATÉGIA PARA MITIGAR EFEITOS DO ESTRESSE SALINO

FORTALEZA

2025

LUAN VICTOR MAIA

USO DE PRIMING COM TUNICAMICINA E HIDROPRIMING EM SEMENTES DE ARROZ COMO ESTRATÉGIA PARA MITIGAR EFEITOS DO ESTRESSE SALINO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho.

FORTALEZA

2025

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)

M187u Maia, Luan Victor.
Uso de priming com tunicamicina e hidropriming em sementes de arroz como estratégia para mitigar efeitos do estresse salino / Luan Victor Maia. – 2025.
39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.
Orientação: Profa. Dra. Humberto Henrique de Carvalho.

1. Arroz. 2. Priming. 3. Tunicamicina. 4. Hidropriming. 5. Salinidade. I. Título.
CDD 661

LUAN VICTOR MAIA

USO DE PRIMING COM TUNICAMICINA E HIDROPRIMING EM SEMENTES DE ARROZ COMO ESTRATÉGIA PARA MITIGAR EFEITOS DO ESTRESSE SALINO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharelado em Biotecnologia. Área de concentração: Fisiologia vegetal.

Aprovada em 12/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

_____

Ma. Isabelle Mary Costa Pereira

Universidade Federal do Ceará (UFC)

_____

Dra. Stelamaris de Oliveira Paula Marinho

Universidade Federal do Ceará (UFC)

À vó Maria e vó Ritinha, que iluminam meu caminho lá de cima.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo aporte financeiro à realização desse trabalho.

À minha família, em especial minha mãe, Rosangela, por dar todo o apoio possível para minha formação e garantir que vivesse uma boa vida mesmo estando longe, meu amor incondicional.

À minha namorada Laryssa, por cada momento compartilhado e por construir comigo um amor que jamais pude sequer imaginar.

À família Maia Rocha, por me acolherem como um de vocês e serem um lar para mim em Fortaleza.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal, por possibilitar a realização dessa pesquisa e garantir a estrutura necessária para a realização dos experimentos.

Aos membros do LabFiVe, pela parceria do dia-a-dia, em especial ao Prof. Humberto pela excelente orientação; à Isabelle, por estar sempre junto em todos os planos, enriquecendo nossos momentos com conhecimento e descontração sem iguais; Andel, Letícia, Carol e Júlia por estarem presentes em cada experimento colocando a mão na massa e tornando o ambiente ainda mais leve.

Aos amigos que fiz na universidade, em especial à Alana, Carol, Bia, Duda, Gabice, Gui, Ianah, Júlia, Arlene, Levi, Pedro, Samuel, Thiago, Vit e Yandra por tornarem a minha experiência universitária completa e por encherem minha memória de incontáveis momentos inesquecíveis.

Aos amigos que não estão mais presentes no meu círculo próximo, mas que, mesmo de longe, ainda são parte essencial da minha trajetória.

RESUMO

A insegurança alimentar é um problema que se intensifica com o crescente aumento da população. Além disso, estresses bióticos e abióticos afetam o crescimento das plantas e consequentemente a produtividade. Para contornar esse problema, estudos indicam a utilização de *priming* para desenvolver tolerância contra uma série de estresses como seca e salinidade, a técnica consiste na embebição de sementes com compostos químicos antes da semeadura para induzir respostas que melhorem a adaptação da planta. Uma das vias de resposta a estresses é a via UPR (*Unfolded protein response*), que ocorre no retículo endoplasmático (RE) e é desencadeada pelo acúmulo de proteínas mal dobradas que sinalizam para produção de chaperonas e aliviam a situação de estresse. O uso de indutores químicos como a tunicamicina (TM) tem se mostrado como uma estratégia para estimular a resposta do RE por induzir uma maior expressão de genes relacionados a essa organela e consequentemente reduzir o estresse. Com isso, o presente trabalho busca testar a hipótese de que *priming* de TM em sementes de arroz induz a tolerância nas plantas submetidas à 60 mM de NaCl, assim como o *hidropriming*. Sementes de arroz foram submetidas a *priming* com tunicamicina e água ultrapura e semeadas em vermiculita. 17 dias após a semeadura, foram transferidas para um sistema hidropônico e submetidas a 60mM NaCl por 14 dias e em seguida coletadas. A salinidade reduziu significativamente teores de massa, condutância estomática, concentração de potássio na parte aérea e raiz e promoveu maior acúmulo de sódio. No entanto, o *priming* com TM induziu aumento da MSR e MFR em condições de salinidade, além de os dois tratamentos terem reduzido o teor de sódio nas raízes para a mesma condição. Ademais, os *priming* apresentaram manutenção das taxas de pigmentos fotossintéticos e de assimilação de carbono entre 0 e 60 mM NaCl. A salinidade foi observada como principal fator de separação entre os perfis metabólicos. Foram identificados prolina, valina, ácidos piroglutâmico e glutâmico como metabólitos comuns para os tratamentos em 60mM NaCl, além de treonina, leucina e lactitol como diferenciais em controle, *hidropriming* e TM, respectivamente, moléculas que são osmoticamente ativas e que atuam nas vias antioxidantes da planta. Com isso, sugere-se que o *priming* com TM possui potencial em aliviar os efeitos deletérios da salinidade em arroz, mas são necessárias outras análises para esclarecer os meios pelos quais o *priming* afeta as respostas fisiológicas da planta.

Palavras chave: arroz; *priming*; tunicamicina; *hidropriming*; salinidade.

ABSTRACT

Food insecurity is a problem that intensifies with the growing increase in population. In addition, biotic and abiotic stresses affect plant growth and, consequently, productivity. To address this issue, studies suggest that the use of priming – a technique that involves soaking seeds in chemical compounds before sowing to induce responses that improve plant adaptation – is able to develop tolerance against a range of stresses such as drought and salinity. One of the stress response pathways is the Unfolded Protein Response (UPR), which occurs in the endoplasmic reticulum (ER) and is triggered by the accumulation of misfolded proteins, leading to the production of chaperones that alleviate the stress. The use of chemical inducers like tunicamycin (TM) has proven to be a strategy to stimulate the ER response by inducing higher expression of genes related to this organelle and consequently reducing stress. Therefore, this study aims to test the hypothesis that TM priming in rice seeds induces tolerance in plants subjected to 60 mM NaCl, similarly to hydropriming. Rice seeds were primed with tunicamycin and ultrapure water and sown in vermiculite. Seventeen days after sowing, the plants were transferred to a hydroponic system and subjected to 60 mM NaCl for 14 days, then collected. Salinity significantly reduced fresh and dry weight, stomatal conductance, potassium concentration in both shoots and roots and promoted higher sodium accumulation. However, TM priming induced an increase in root fresh and dry weight under saline conditions, and both treatments reduced sodium accumulation in roots under the same condition. Furthermore, the priming treatments maintained the levels of photosynthetic pigments and carbon assimilation rates between 0 and 60 mM NaCl. Salinity was the main factor separating metabolic profiles. Proline, valine, pyroglutamic acid, and glutamic acid were identified as common metabolites for the treatments under 60 mM NaCl, while threonine, leucine, and lactitol were specific to the control, hydropriming, and TM treatments, respectively, molecules that are osmotically active and involved in plant antioxidant pathways. Thus, it is suggested that TM priming has the potential to alleviate the detrimental effects of salinity on rice, but further analysis is needed to clarify the mechanisms through which priming affects the plant's physiological responses.

Keywords: rice; priming; tunicamycin; hydropriming; salinity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 8

2 OBJETIVOS 11

2.1 Objetivo geral 11

2.2 Objetivos específicos 11

3 MATERIAIS E MÉTODOS 12

3.1 Material vegetal e condições de crescimento 12

3.2 Avaliação de parâmetros morfológicos 12

3.3 Trocas gasosas e pigmentos fotossintéticos 13

3.4 Quantificação de K^+ e Na^+ 13

3.5 Perfis metabólicos 13

3.6 Estatística 14

4 RESULTADOS 16

4.1 Parâmetros de crescimento 16

4.2 Teores de íons K^+ e Na^+ 18

4.3 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos 20

4.4 Parâmetros de trocas gasosas 22

4.5 Analise multivariada dos perfis metabólicos 23

5 DISCUSSÃO 31

6 CONCLUSÃO 33

REFERÊNCIAS 35

1 INTRODUÇÃO

A insegurança alimentar é um problema de saúde pública que vem se agravando com o passar dos anos, intensificada por fatores de vulnerabilidade social, distribuição desigual de recursos e o crescente aumento da população mundial, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com projeções de que até 2050 cerca de 10 bilhões de pessoas precisarão ser alimentadas (Ghosh; Kumar; Biswas, 2024). Com a crise global da pandemia de COVID-19, a situação de fome e pobreza acentuou-se ainda mais, sendo traduzido pelas metas de zero fome e pobreza, antes definidas para 2030, agora sendo estendidas por pelo menos mais 3 anos em países da África subsaariana, por exemplo (Bukari *et al.*, 2022).

Além do crescimento da população, diversos fatores bióticos e abióticos interferem na produção, intensificados pelas crescentes mudanças climáticas (Chen *et al.*, 2021), dentre eles a salinidade. A problemática relacionada ao acúmulo de sais é resultado do conjunto de fenômenos naturais e ação antrópica, ocorrendo principalmente em regiões áridas e semiáridas, onde a chuva não é capaz de lixiviar os sais minerais do solo (Zamann; Shahidd; Heng, 2018), podendo afetar 50% das áreas cultiváveis até 2050 (Wang; Vinocur; Altman, 2003).

Os impactos causados pela salinidade dependem do estágio de desenvolvimento da planta, tempo de exposição e concentração de sal, desencadeando diversas mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares, dentre elas a fotossíntese, síntese proteica e o metabolismo de lipídios, podendo levar à perda de produtividade (de Azevedo Neto *et al.*, 2006; Radanielson *et al.*, 2018). A exposição prolongada ao sal causa estresse osmótico na planta, reduzindo a capacidade de absorção de água nas raízes e estresse iônico na célula, tendo como consequência o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), desencadeando na planta uma cascata de mecanismos para manutenção da homeostase celular, a exemplo da ativação de enzimas antioxidantes e regulação da ativação de genes relacionados ao transporte dos íons Na^+ e Cl^- na membrana (Liu *et al.*, 2022). Dentre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos para atenuar os efeitos do sal, destacam-se o controle da homeostase iônica (Isayenkov; Maathuis, 2019) e o ajuste osmótico, mediante o acúmulo de solutos compatíveis (Pintó-marijuan; Munné-bosch, 2013). Entretanto, o contato com sal prolongado pode induzir mecanismos de morte celular (Liu *et al.*, 2011).

Dentre os efeitos ocasionados pela salinidade está a síntese proteica comprometida, que gera o acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do retículo endoplasmático (RE), organela

central no metabolismo celular, causando o estresse do RE (Bao; Howell, 2017). Um dos mecanismos estudados na resposta contra esse estresse envolve a ativação da via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR - *Unfolded proteins response*). A via UPR ocorre quando o acúmulo de proteínas mal dobradas ativa sensores na membrana do RE que por sua vez iniciam uma cascata de ativação mediada por fatores de transcrição de genes liberados da membrana do RE até o núcleo, relacionados à produção de chaperonas moleculares, uma classe de moléculas que participa do correto dobramento das proteínas (Ko; Brandizzi, 2024). Muitos estímulos podem desencadear a via UPR, dentre eles agentes inibidores do dobramento de proteínas, como a tunicamicina (TM), que interfere na N-glicosilação das proteínas, causando um estresse similar aos estresses abióticos (Howell, 2013). De fato, o estresse salino induz o estresse do RE e, consequentemente, ocorre a ativação da UPR e fatores de transcrição de chaperonas (Çakir Aydemir *et al.*, 2020). Esses estímulos em menor intensidade são capazes de induzir mecanismos fisiológicos e bioquímicos para a atenuação dos efeitos do estresse salino (Beaugelin *et al.*, 2020; Ohta; Takaiwa, 2020), ativando as vias de defesa do retículo endoplasmático (RE) contra estresses (Bao; Howell, 2017). Em sorgo, o tratamento com indutores do estresse do RE concomitante com salinidade mostrou que, em estágio de plântula, ocorreu menor acúmulo de sódio e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) associada a uma indução na expressão de genes do RE (Queiroz *et al.*, 2020), demonstrando a influência do RE na tolerância ao sal.

Para aumentar a tolerância ao estresse, tem sido empregada a utilização de pré-tratamentos (*priming*) de sementes, que consiste na absorção de algum composto químico através da embebição do material acompanhado posterior secagem para algumas culturas, a exemplo do arroz (Rhaman *et al.*, 2020). Essa técnica varia conforme a aplicação, tempo, temperatura, aeração, espécie e compostos utilizados para induzir diferentes mecanismos na semente, mas que, de forma geral, padronizam a germinação das sementes e induzem efeitos positivos no estabelecimento da plântula (Farooq; Barsa; Wahid, 2006; Rhaman *et al.*, 2020). A maneira mais simples de realizar um *priming* é a técnica de *hidropriming*, que consiste na utilização de água potável, destilada ou ultrapura para hidratação das sementes, seguida ou não de secagem para o nível de hidratação original (Dhage; Anishettar, 2020; Rhaman *et al.*, 2020). Dentre os efeitos do *hidropriming* estão maior taxa de germinação, crescimento e produtividade, floração precoce, aumento da massa seca das plântulas e do vigor das sementes, contribuindo para um melhor estabelecimento da planta adulta no campo comparado as não

tratadas (Farooq *et al.*, 2006; Farooq; Barsa; Wahid, 2006; Harris; Tripathi; Joshi, 2002; Kaur; Gupta; Kaur, 2002; Rhaman *et al.*, 2020).

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma cultura de grande relevância econômica, base para a alimentação dos brasileiros, sendo uma fonte de carboidratos, minerais e vitaminas essenciais para a nutrição humana, sendo o Brasil o principal mercado do grão fora da Ásia (Fukagawa; Ziska, 2019) e 9º maior produtor de arroz em escala mundial (UNICEF, 2021). As duas principais técnicas de cultivo de arroz são em alagamento (ou terras baixas), que é mais cultivado em terras planas com fornecimento de água abundante, e sequeiro (ou terras altas), que é cultivado em regiões de relevo acidentado com pouco ou nenhum suprimento de água por irrigação (Saito *et al.*, 2018). A Companhia Nacional de Abastecimento estima que a safra brasileira de 2024/25 será de aproximadamente 12 milhões de toneladas, grande parte produzida na região sul do país, onde predomina o cultivo alagado (Conab, 2025). Entretanto, no Nordeste o cultivo de sequeiro é mais comum e contará com uma produção modesta de 394 mil toneladas em 2025, proveniente principalmente da agricultura familiar (Conab, 2025). Em regiões áridas e semiáridas, como o Nordeste, é comum a predominância de estresse causado por seca e salinidade em conjunto, uma vez que o processo de evapotranspiração elevado acarreta uma maior concentração de sais no solo e que devido a baixa pluviosidade, há pouca lixiviação desses solutos (Brito *et al.*, 2021). De fato, a técnica de plantio por sequeiro se torna uma alternativa para aumento da temperatura global e menor disponibilidade hídrica, uma vez que requer menor uso de água para sua aplicação (Bosco; Grimm; Streck, 2009). Ainda nesse contexto, em adição ao modo de cultivo, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) destaca a cultivar SCSBRS Tio Taka por possuir elevada produtividade e grãos de boa qualidade industrial que podem contribuir significativamente para melhorar a produção Nordestina (Rangel *et al.*, 2006).

Considerando o exposto, o presente trabalho visa testar a hipótese de que o *priming* de tunicamicina em sementes de arroz induz a tolerância nas plantas submetidas à 60 mM de NaCl, assim como o *hidropriming*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Induzir tolerância à salinidade em plantas de arroz por meio do *priming* de sementes com tunicamicina e água (*hidropriming)*.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a tolerância induzida pelos *primings* nos parâmetros de crescimento massa fresca e massa seca da parte aérea e raízes;

Avaliar o ajustamento iônico por meio dos teores de sódio e potássio na parte aérea e nas raízes;

Mensurar os parâmetros fotossintéticos (fotossíntese, condutância estomática, transpiração, teor de CO_2, taxa C*i*/C*a*, eficiência da carboxilação e do uso da água) e teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenoides);

Avaliar as diferenças nos perfis metabólicos induzidos pelos *primings* e salinidade;

Identificar e determinar a quantificação relativa de metabólitos chave diferencialmente modulados por meio de análise multivariada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) da cultivar SCSBRS Tio Taka foram disponibilizadas pela Agrogiusti Indústria e Com. de Sementes Ltda. (Turvo, SC, Brasil - 28° 56' 22.06222'' S, 49° 44'; 9.64866'' W). O material foi sanitizado com solução de hipoclorito de sódio a 0,2% e logo após enxaguado com água corrente três vezes e em seguida com água destilada (Queiroz *et al.*, 2020). Após a sanitização, as sementes passaram pelo processo de *priming*, onde foram colocadas em placas de Petri contendo 20 mL de solução a 0,25 $\mu g.mL^{-1}$ de tunicamicina (baseado em experimentos prévios não publicados) e 20 mL de água ultrapura para os tratamentos de *hidropriming,* durante 24h. Em seguida, as sementes passaram por um processo de secagem ao ar livre por mais 24h antes do processo de germinação.

As sementes foram germinadas em vermiculita umedecida com solução de Clark (1982) modificada para um quarto de força por 10 dias. Após esse período, foram transferidas para bacias contendo solução de Clark a meia força por mais 7 dias para aclimatação, com trocas de solução regulares a cada 2 dias. Em seguida as plantas foram transferidas para vasos com 3L de volume contendo solução de Clark a meia força e com oxigenação constante. As plantas foram randomicamente submetidas ao delineamento 3x2, compreendendo três condições de *priming* (controle, *hidropriming* e TM) e duas concentrações de NaCl (0 e 60 mmol/L), e avaliadas após 14 dias do início do estresse.

3.2 Avaliação de parâmetros morfológicos

Foram medidos o peso fresco da parte aérea e peso fresco das raízes. Em seguida o material foi armazenado e desidratado em estufa à 60 °C até atingir peso constante para determinação do peso seco da parte aérea e das raízes.

3.3 Trocas gasosas e pigmentos fotossintéticos

Para as medições de trocas gasosas, foram utilizadas as folhas completamente expandidas anteriores ao ápice por meio de um analisador de gás por infravermelho (IRGA) portátil, modelo LI6400XT (LI-COR). Foram mensurados os parâmetros de fotossíntese líquida (*A*), condutância estomática (g*s*), concentração interna de CO_2 (C*i*), transpiração (*E*), taxa de assimilação de carbono (C*i*/C*a*), eficiência do uso da água (*A*/g*s*) e eficiência da carboxilação da Rubisco (*A*/C*i*) entre 8:00 e 10:00 da manhã, utilizando 1200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ de fótons e 400 $\mu mol\ mol^{-1}$ de CO_2 (Roque *et al.*, 2022).

Para a quantificação de pigmentos fotossintéticos, discos de aproximadamente 0,08g de material vegetal fresco da parte aérea foram colocados em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio ($CaCO_3$), por 24 horas no escuro. Após esse período, as amostras foram aquecidas em banho maria, à 65 ºC, por 45 minutos e, em seguida, lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 665, 649 e 480 nm (Wellburn, 1994). As leituras foram convertidas em $\mu g.g^{-1}$ de massa fresca nas seguintes fórmulas.

Clorofila *a* = 12,47 (A_{665}) – 3,62 (A_{649});

Clorofila *b* = 25,06 (A_{649}) – 6,50 (A_{665});

Carotenoides = (1000 (A_{480}) – 1,29 (clorofila *a*) – 53,78 (clorofila *b*))/220

Clorofilas totais = 7.15 (A_{665}) – 18.71 (A_{649})

3.4 Quantificação de K^+ e Na^+

Para a quantificação de íons inorgânicos, o material vegetal foi seco em estufa, macerado e pesados 50 mg da parte aérea e raiz em tubos de ensaio. Os materiais foram homogeneizados em água deionizada e incubados em banho-maria por 1 h a 75 °C, com agitações a cada 15 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3.000 *g* por 15 minutos. O sobrenadante teve o teor de íons quantificado com auxílio de um fotômetro de

chama (Malavolta; Vitti; Oliveira, 1989). Os conteúdos de íons inorgânicos foram expressos em $mg.g^{-1}$ de massa seca.

3.5 Perfis metabólicos

Os procedimentos realizados para a cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas foram adaptados de Lisec *et al.* (2006). O material vegetal foi macerado com auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Em seguida, foi pesado 50 mg e adicionados 700 µL de metanol gelado e 30 µL de solução de ribitol a 0,2 $mg.mL^{-1}$ diluído em água ultrapura, utilizado como padrão interno na análise, seguidos de homogeneização em vórtex. Posteriormente as amostras foram colocadas sob agitação à 70 ºC por 15 minutos com uma rotação de 350 RPM, seguido de centrifugação a 12.000*g* por 10 minutos a 4 ºC. Após essa etapa, foram adicionados 375 µL de clorofórmio gelado e 750 µL de água ultrapura (MilliQ®) intercalados por homogeneizações no vórtex. Logo após as amostras foram centrifugadas a 4000 RPM por 15 min à 4 ºC e realizadas as alíquotas da fase superior formada após o processo, que corresponde à fase polar. Dentre elas, 150 µL foram aliquotados para realização da corrida em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) e 5 µL de cada amostra foram aliquotados para um único microtubo para o preparo de um controle de qualidade (diferenciando somente entre parte aérea e raiz), de onde foi retirada uma alíquota de 150 µL. Por fim, todas as amostras foram secas em *speed vacuum overnight*.

Para o processo de derivatização que precede a injeção no cromatógrafo gasoso, foram adicionados 20 µL de solução de cloridrato de metoxiamina dissolvida em piridina ($20mg.mL^{-1}$) às amostras, logo em seguida levadas ao vórtex e *spin down*. Os microtubos foram então agitados à 37 ºC por 2 horas a 550 RPM com posterior *spin down*. Em seguida, às amostras foram adicionados 35 µL de N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA), com uma posterior agitação à 37 ºC por 30 minutos a 550 RPM. Imediatamente, 55 µL de amostra foram transferidos para os *vials* e levados para a injeção. Os metabólitos foram separados e detectados através de CG-EM (modelo QP2010, Shimadzu, Tóquio, Japão). Em uma coluna capilar RTX-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm, ResteK, Bellefonte, EUA), foi injetado 1 µL de amostra derivatizada com um fluxo de gás hélio de 1,2 $mL.min^{-1}$ em modo *split* 1:5 com temperatura de injeção de 230 ºC e de 250 ºC na fonte de íons. Os parâmetros da corrida foram ajustados para 80 ºC por 4 minutos, seguidos de um aquecimento gradual de 10 ºC por minuto até que atingisse

o pico de 315 ºC, permanecendo nesta temperatura por 8 minutos. Os metabólitos foram ionizados e fragmentados por ionização por elétrons (EI) a 70 eV e posteriormente analisados em quadrupolo, gerando espectros em modo *full scan* entre 40 e 700 m/z. A identificação de cada metabólito foi realizada no software Xcalibur ™ 2.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) utilizando como parâmetro o controle de qualidade. Os metabólitos foram identificados utilizando uma biblioteca de metabólitos previamente detectados e banco de dados de moléculas de GOLM (http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/) utilizando os tempos de retenção da cromatografia e os padrões de fragmentação obtidos no espectrômetro de massas. A quantificação relativa foi realizada através da razão entre a área do fragmento detectado e a área do fragmento do padrão interno (Ribitol), cujo resultado é dividido pela massa utilizada para o preparo da amostra. Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística via MetaboAnalyst 6.0 (http://www.metaboanalyst.ca).

3.6 Estatística

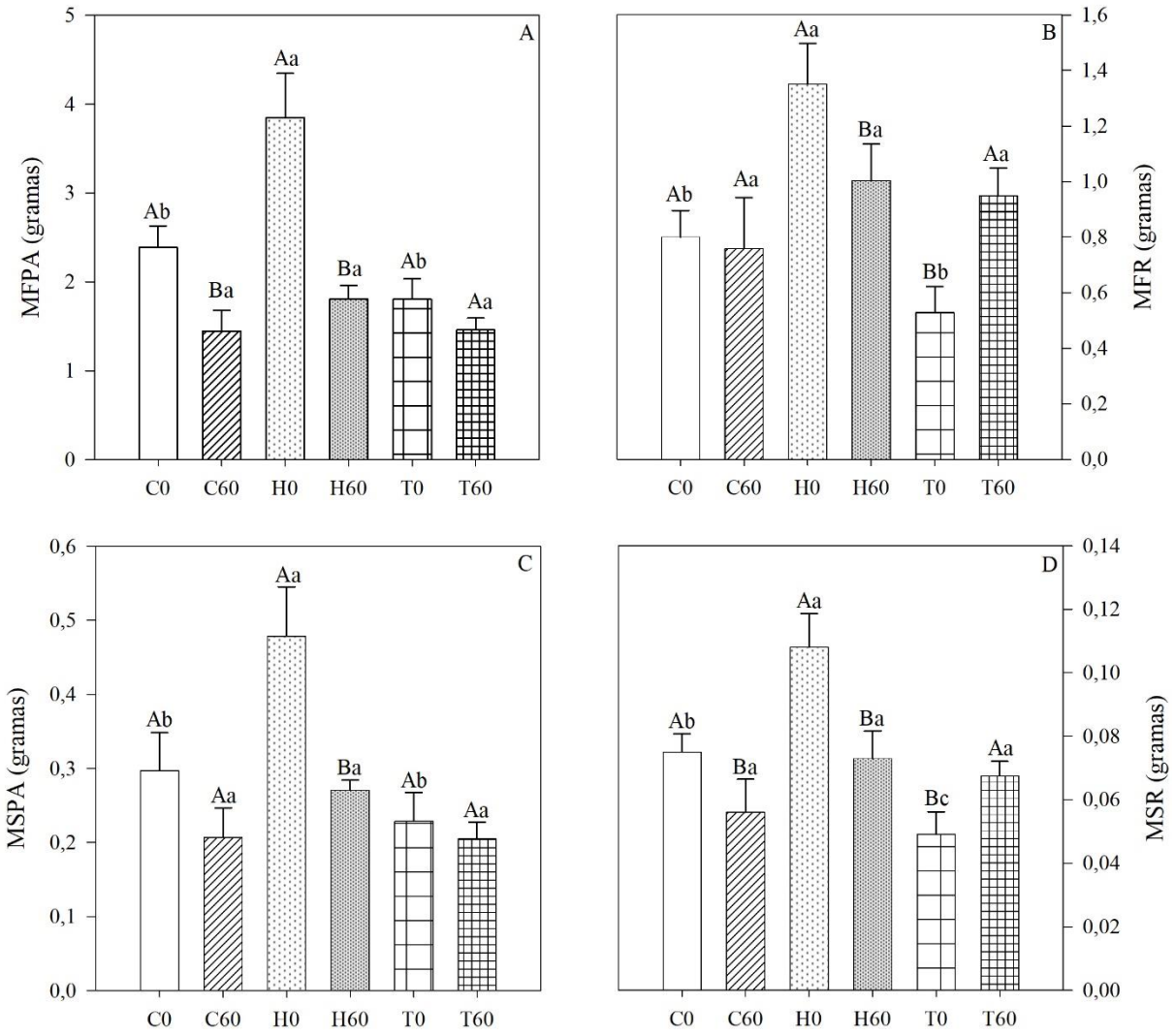
O experimento foi realizado no fatorial 3x2, onde foram testados 3 tipos de *priming*: controle (sem *priming*), *hidropriming* (com água ultrapura) e tunicamicina (0,25 $\mu g.mL^{-1}$) e duas concentrações de NaCl: 0 e 60 mM. Cada tratamento foi constituído por 5 repetições. Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas usando teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o software SISVAR. Os gráficos foram confeccionados utilizando o software SigmaPlot versão 14.5. Para a análise multivariada do perfil metabólico foram feitas: análise de componentes principais (PCA – *principal componente analysis*), baseado na análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), que é um teste de permutação multivariado não paramétrico, para avaliar a separação dos grupos; e OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) para identificar metabólitos discriminantes em cada tratamento de *priming* na presença de salinidade.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros de crescimento

O estresse salino, na ausência de *priming* (C60), ocasionou uma redução de 39,47% na massa fresca da parte aérea (MFPA) e 25,23% na massa seca da raiz (MSR) em comparação com tratamento controle (C0) (Figura 1A e 1D). Na ausência de salinidade, o *hidropriming* promoveu um aumento dos parâmetros de MFPA, massa fresca da raiz (MFR), massa seca da parte aérea (MSPA) e MSR (Figura 1A-D), enquanto que o *priming* com tunicamicina (T0) reduziu apenas a MSR em comparação com C0 (Figura 1D). No *priming* com água sob salinidade (H60), houve uma redução de 53,03% e 43,43% para MFPA e MSPA, 25,8% e 32,41% para MFR e MSR comparado com a ausência de sal (H0). Para o *priming* com tunicamicina, não foram observadas diferenças significantes nesses parâmetros relacionados à parte aérea quando comparadas as condições de salinidade (Figura 1A e 1C). Por outro lado, um efeito positivo foi observado nas raízes pelo aumento na MFR e MSR de 79,4%, e 37,51%, respectivamente em T60 quando comparado com T0 (Figura 1B).

Figura 1 - Parâmetros de biomassa de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas à ausência ou presença de 60mM NaCl por 14 dias.



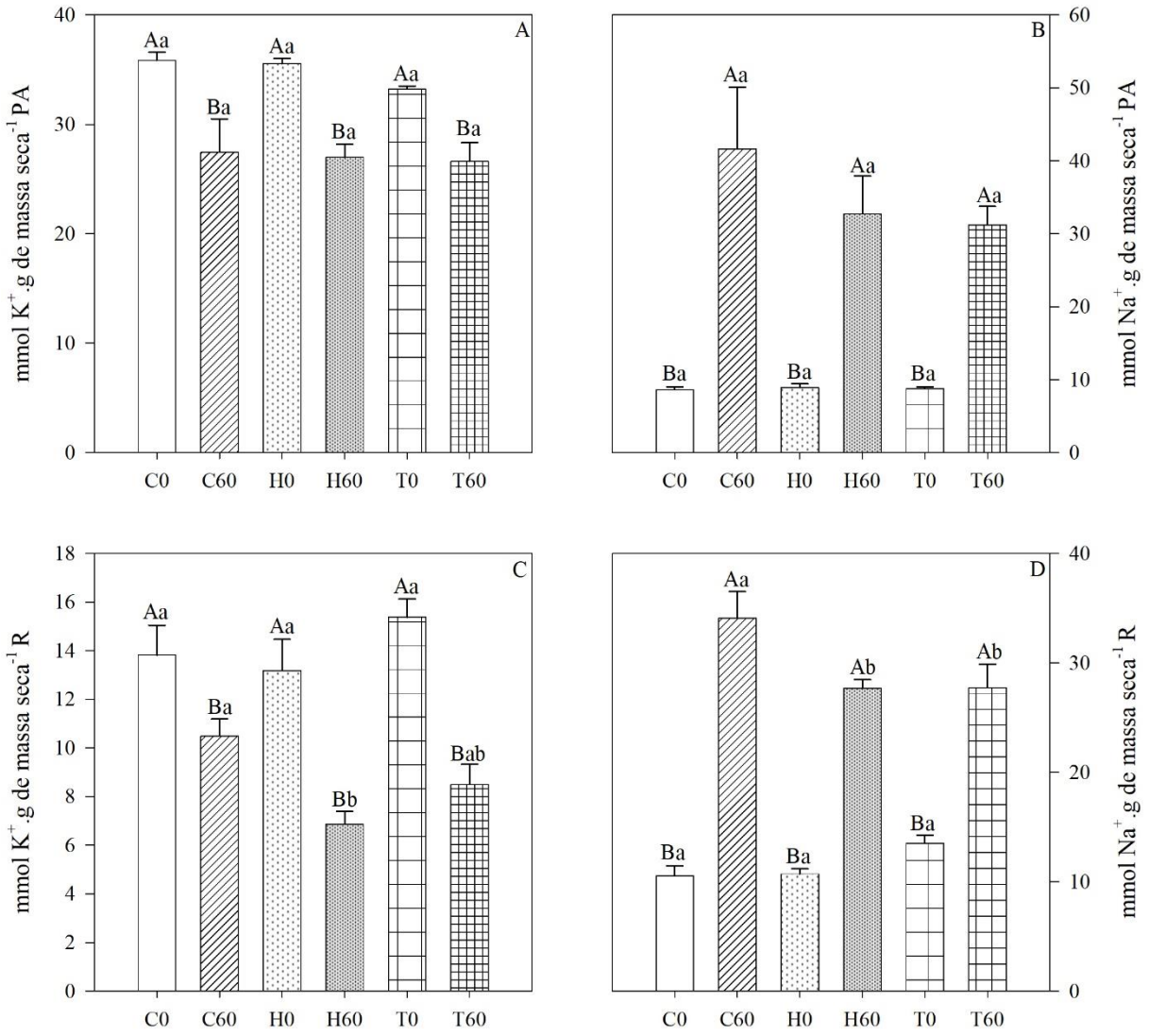
Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: A) massa fresca da parte aérea (MFPA); B) massa fresca da raiz (MFR); C) massa seca da parte aérea (MSPA); D) massa seca da raiz (MSR). Letras maiúsculas comparam um mesmo *priming* na ausência e presença de sal e as letras minúsculas comparam diferentes *primings* no desdobramento de um mesmo nível de salinidade. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey com $p \leq 0,05$. O erro padrão está indicado em cada barra. C: controle (semente sem *priming*); H: *hidropriming* (semente embebida em água por 24 h); T: tunicamicina (semente embebida em tunicamicina por 24 h). Tratamentos na ausência de 0 mM NaCl: C0, H0 e T0. Tratamentos na presença de 60 mM NaCl: C60, H60 e T60.

4.2 Teores de íons K^+ e Na^+

Na ausência de salinidade e na parte aérea sob salinidade, não houve diferença estatística nem do *priming* com água, nem do *priming* com tunicamicina na concentração dos íons quando comparado ao controle (Figura 2A-D). Na ausência do *priming* de sementes, as plantas sob salinidade exibiram uma diminuição do íon potássio e um aumento no acúmulo do íon sódio tanto na parte aérea quanto nas raízes (Figura 2). Nas raízes, H60 apresentou redução significativa do íon K^+ quando comparado com C60 (Figura 2C). Por outro lado, nas raízes o acúmulo de sódio foi estatisticamente menor para os tratamentos de *hidropriming* e tunicamicina (Figura 2D) em relação ao controle na concentração de 60 mM de NaCl, com uma redução equivalente a 18,78% e 18,68%, respectivamente e não diferiram entre si.

Figura 2- Teores de íons inorgânicos em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas à ausência ou presença de 60 mM NaCl por 14 dias.



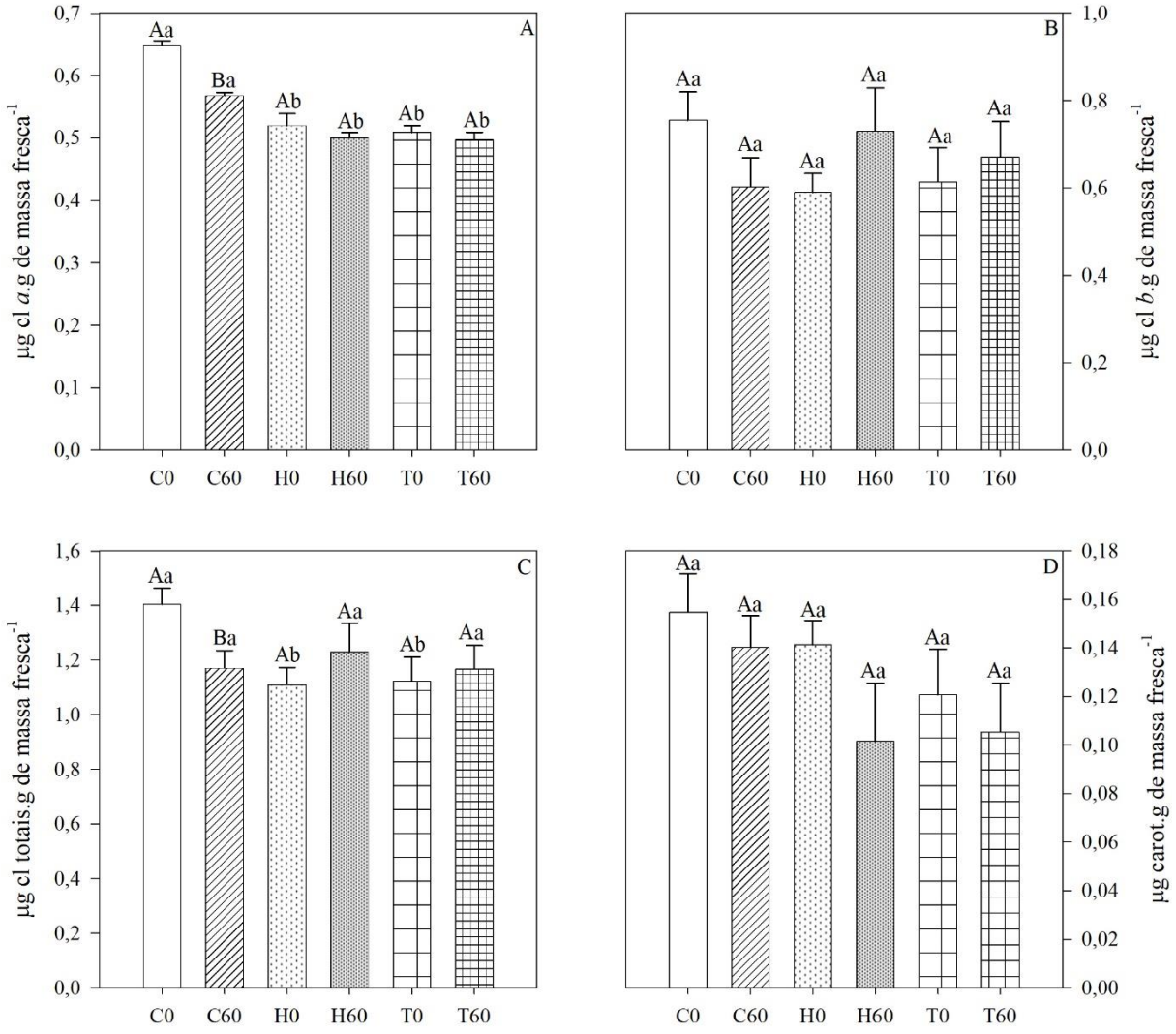
Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: A) teor de potássio (K^+) na parte aérea; B) teor de sódio (Na^+) na parte aérea; C) teor de potássio (K^+) na raiz; D) teor de sódio (Na^+) na raiz. Letras maiúsculas comparam um mesmo priming e as letras minúsculas comparam o desdobramento de um mesmo nível de salinidade. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey com $p \leq 0,05$. O erro padrão está indicado em cada barra. C: controle (semente sem *priming*); H: *hidropriming* (semente embebida em água por 24 h); T: tunicamicina (semente embebida em tunicamicina por 24 h). Tratamentos na ausência de 0 mM NaCl: C0, H0 e T0. Tratamentos na presença de 60 mM NaCl: C60, H60 e T60.

4.3 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos

Foi observado uma redução de 12,5 e 16,6 % no conteúdo de clorofila *a* e clorofila total, respectivamente, no tratamento 60 mM NaCl em relação ao controle (Figura 3A e 3 C). Na ausência de salinidade e presença de *priming*, os níveis de clorofila *a* foram menores tanto no *hidropriming* quanto no *priming* com tunicamicina em relação ao tratamento C0 (Figura 3A). Entretanto, na presença do sal, H60 e T60 não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de clorofila *a* e total em relação a ausência de sal. Nos teores de clorofila *b* e carotenoides não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de salinidade e entre os *priming* (Figuras 3B e 3D).

Figura 3 - Concentrações de pigmentos fotossintéticos em plantas de arroz (*Oryza sativa*) submetidas à ausência ou presença de 60 mM NaCl por 14 dias.



Fonte: elaborada pelo autor

Legenda: A) teor de clorofila *a*; B) teor de clorofila *b*; C) teor de clorofilas totais; D) teor de carotenoides. Letras maiúsculas comparam um mesmo priming e as letras minúsculas comparam o desdobramento de um mesmo nível de salinidade. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey com $p \leq 0,05$. O erro padrão está indicado em cada barra. C: controle (semente sem *priming*); H: *hidropriming* (semente embebida em água por 24 h); T: tunicamicina (semente embebida em tunicamicina por 24 h). Tratamentos na ausência de 0 mM NaCl: C0, H0 e T0. Tratamentos na presença de 60 mM NaCl: C60, H60 e T60

4.4 Parâmetros de trocas gasosas

A salinidade reduziu significativamente a condutância estomática (g*s*) nos tratamentos C60, H60 e T60 em comparação à ausência de sal (Tabela 1), enquanto que não houve alteração nos parâmetros de fotossíntese (*A*), transpiração (*E*) e eficiência da carboxilação da Rubisco (*A*/C*i*) entre os tratamentos, nem entre diferentes *primings*. Foi observado ainda uma redução na concentração de CO_2 (C*i*) e, consequentemente, na taxa C*i*/C*a* no tratamento C60 em relação ao controle na ausência de sal, mas o *priming* com água e com TM mantiveram a relação C*i*/C*a* estatisticamente similar aos seus respectivos controles sem sal. A eficiência do uso da água (*A*/g*s*) aumentou no tratamento C60 em relação a ausência de sal e no *priming* com TM sob salinidade em relação ao *priming* na ausência de salinidade, contudo, nenhuma alteração significante foi observada entre H0/H60.

Tabela 1 - Análises de parâmetros fotossintéticos em plantas de arroz (*Oryza sativa*) submetidas à ausência ou presença de 60 mM NaCl por por 14 dias.

Trat.	C0	C60	H0	H60	TM0	TM60
A (µmol CO_2 m^{-2} s^{-1})	18.38 Aa	19.99 Aa	20.54 Aa	18.1 Aa	19.75 Aa	18.68 Aa
g*s* (mol H_2O m^{-2} s^{-1})	0.45 Aa	0.3 Ba	0.48 Aa	0.34 Ba	0.4 Aa	0.28 Ba
C*i* (µmol CO_2 mol^{-1})	304.79 Aa	261.9 Ba	302.3 Aa	286.36 Aa	290.33 Aa	262.07 Aa
E (mmol H_2O m^{-2} s^{-1})	0.007 Aa	0.006 Aa	0.008 Aa	0.006 Aa	0.007 Aa	0.006 Aa
Ci/Ca	0.79 Aa	0.68 Ba	0.79 Aa	0.74 Aa	0.75 Aa	0.68 Aa
A*/g*s [(µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) (mol H_2O m^{-2} s^{-1})$^{-1}$]	42.46 Ba	69.01 Aa	42.84 Aa	53.73 Aa	50.79 Ba	67.95 Aa
A*/C*i [(µmol m^{-2} s^{-1}) (µmol mol^{-1})$^{-1}$]	0.06 Aa	0.08 Aa	0.07 Aa	0.06 Aa	0.07 Aa	0.07 Aa

Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: A) fotossíntese; G*s)* condutância estomática; Ci) carbono interno; E) transpiração; Ci/Ca) taxa de assimilação de carbono; A/G*s*) eficiência do uso da água; A/Ci) eficiência da carboxilação. Letras maiúsculas comparam um mesmo priming e as letras minúsculas comparam o desdobramento de um mesmo nível de salinidade. Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey com $p \leq 0,05$. C: controle (semente sem *priming*); H: *hidropriming* (semente embebida

em água por 24 h); T: tunicamicina (semente embebida em tunicamicina por 24 h). Tratamentos na ausência de 0 mM NaCl: C0, H0 e T0. Tratamentos na presença de 60 mM NaCl: C60, H60 e T60.

4.5 Analise multivariada dos perfis metabólicos

Um total de 75 metabolitos foram identificados dentre parte aérea e raiz, os quais foram organizados por tempo de retenção e a classificação via KEGG ID (Tabela 2). Desses, 32 foram classificados como carboidratos, 25 como ácidos orgânicos, 12 como aminoácidos e 6 foram classificados como outros metabólitos, que incluem polióis, aminas, amidas e ácidos inorgânicos.

Tabela 2 - Lista de metabólitos detectados em folhas e raízes de arroz. Os nomes e IDs dos compostos foram baseados na Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG ID) e classificados pelo tempo de retenção.

	Metabólito	TR	m/z	KEGG ID	Classificação
1	Hydroxylamine	5.59	133	C00192	Outro
2	Glycolic acid	7.66	177	C00160	Ac. Orgânico
3	Oxalic acid	8.82	190	C00209	Ac. Orgânico
4	3-Hydroxybutyric acid	9.66	191	C01089	Ac. Orgânico
5	Malonic acid	10.16	233	C00383	Ac. Orgânico
6	Valine	10.38	144	C16436	Aminoácido
7	Ureia#	10.77	189	C00086	Outro
8	Phosporic acid	11.39	299	C00009	Outro
9	Leucine	11.69	158	C16439	Aminoácido
10	Proline	11.73	142	C00148	Aminoácido
11	Glycine	11.88	174	C00037	Aminoácido
12	Succinic acid	11.95	147	C00042	Ac. Orgânico
13	Glyceric acid	12.28	189	C00258	Ac. Orgânico
14	Maleic acid	12.43	245	C01384	Ac. Orgânico
15	Threonine	13.11	117	C00188	Aminoácido
16	Erythrose	14.4	233	C01796	Carboidrato
17	Malic acid	14.48	233	C00711	Ac. Orgânico
18	Glutaric acid	14.67	158	C00489	Ac. Orgânico
19	Salicylic acid	14.78	267	C00805	Ac. Orgânico
20	Pyroglutamic acid	14.82	156	C01879	Aminoácido
21	Aspartic acid	14.88	232	C00049	Ac. Orgânico
22	4-hydroxy-Proline	14.93	230	C01157	Aminoácido
23	Threonic acid	15.23	292	C01620	Ac. Orgânico
24	Erythronic acid	15.37	117	C00033834	Ac. Orgânico
25	Lyxose	15.74	307	C00476	Carboidrato
26	Threitol	15.74	205	C16884	Outro
27	N-Acetyl-L-serine / O-acetyl-L-serine	15.86	116	C00979	Aminoácido
28	Glutamic acid	16.07	246	C00025	Aminoácido

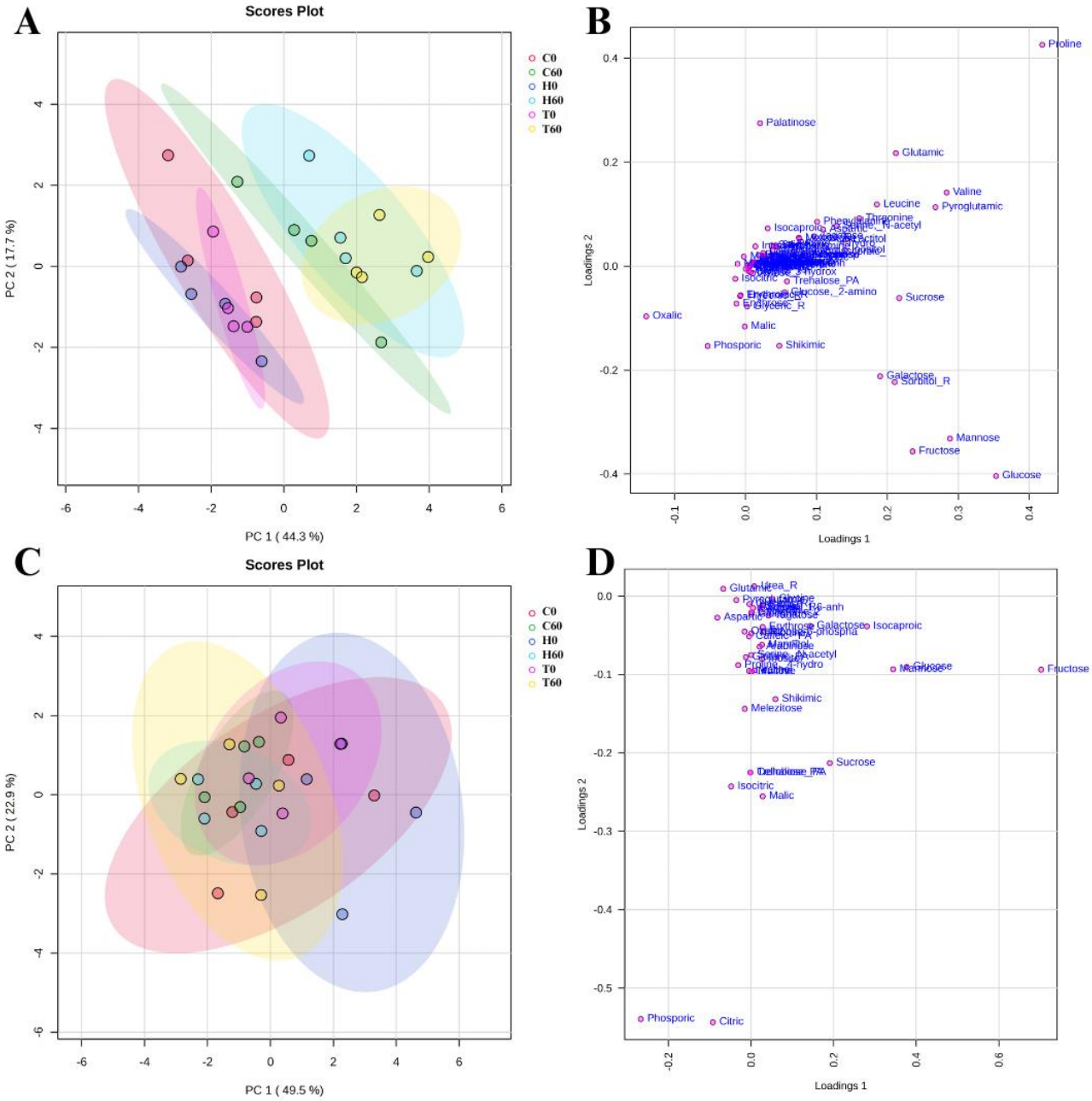
29	3-Hydroxybenzoic acid	16.15	193	C00587	Ac. Orgânico
30	Phenylalanine	16.2	192	C02057	Aminoácido
31	5-amino-valeric acid	16.29	174	C00431	Ac. Orgânico
32	Xylose	16.54	217	C00181	Carboidrato
33	Ribose	16.71	103	C00121	Carboidrato
34	Tagatose	17.08	217	C00795	Carboidrato
35	Anhydro-D-glucose	17.17	204	C06478	Carboidrato
36	Arabinose	17.73	217	C00216	Carboidrato
37	Glutamine	17.83	203	C00303	Aminoácido
38	Shikimic acid	18.21	204	C00493	Ac. Orgânico
39	Isocitric acid	18.38	375	C00311	Ac. Orgânico
40	Citric acid	18.5	273	C00158	Ac. Orgânico
41	Dehydroascorbate	18.73	173	C05422	Ac. Orgânico
42	Isocaproic acid / 2-Oxoisocaproate	18.77	189	C00233	Ac. Orgânico
43	Fructose	19.02	217	C00095	Carboidrato
44	Mannose	19.28	319	C00159	Carboidrato
45	Glucose	19.38	319	C00031	Carboidrato
46	Galactose	19.48	319	C00124	Carboidrato
47	Mannitol	19.6	319	C00392	Carboidrato
48	Sorbitol	19.68	217	C00794	Carboidrato
49	Allo-Innositol	19.83	191	-	Carboidrato
50	Lactitol	20.04	204	DG00074	Carboidrato
51	Lactic acid	20.11	117	C00256	Ac. Orgânico
52	Galactonic acid	20.23	333	C00880	Ac. Orgânico
53	Gluconic acid	20.32	333	C00124	Carboidrato
54	2-Deoxy-D-glucose	20.54	205	C00586	Carboidrato
55	Saccharic acid	20.77	217	C00818	Ac. Orgânico
56	Tyramine	20.99	338	C00483	Aminoácido
57	Mio-Inositol	21.15	217	C00137	Carboidrato
58	Glycerol-2-phosphate	21.27	299	C02979	Outro
59	Mucic acid	21.27	373	C00879	Ac. Orgânico
60	Caffeic acid	21.4	191	C01481	Ac. Orgânico
61	Gluconic lactone	21.51	319	C00198	Carboidrato
62	Palatinose	21.94	204	C01742	Carboidrato
63	Spermidine	22.01	160	C00315	Outro
64	Lactulose	22.61	204	C07064	Carboidrato
65	Maltitol	23.08	204	G00275	Carboidrato
66	Glucoheptose / sedoheptulose-7P	23.23	160	M00064	Carboidrato
67	Ribose-5-phosphate	23.57	217	C00117	Carboidrato
68	Fructose 1,6-bisphosphate	24.69	217	C00354	Carboidrato
69	Sucrose	25.8	361	C00042	Carboidrato
70	Cellobiose	26.24	361	C00185	Carboidrato
71	Maltose	26.52	204	C00208	Carboidrato
72	Trehalose	26.68	361	C01083	Carboidrato
73	Raffinose	27.12	217	C00492	Carboidrato
74	Melezitose	28.41	204	C08243	Carboidrato
75	Maltotriose	33.35	361	C01835	Carboidrato

Fonte: elaborada pelo autor

Legenda: # Metabolito identificado apenas nas raízes.

A análise multivariada identificou diferenças e semelhanças nos perfis metabólicos dentre os tratamentos evidenciadas pela análise de componentes principais (PCA) de parte aérea e raiz (Figura 4). O gráfico de PCA da parte aérea demonstrou uma separação em dois grupos distintos influenciados principalmente pelo PC1 (Figura 4A), um grupo formado pelos tratamentos na ausência de sal (C0, H0 e T0) e outro grupo formado pelos tratamentos submetidos à 60 mM de NaCl (C60, H60 e T60). Os componentes PC1 e PC2 representaram 44,3 e 17,7% de variância, respectivamente. Dentre esses grupos, pode-se observar uma maior sobreposição entre os tratamentos na ausência de salinidade, enquanto observa-se uma tendência à separação entre C60 e os tratamentos H60 e T60. Os metabólitos que mais contribuíram para a separação do PC1 foram prolina, glicose e manose, enquanto para PC2 observou-se a contribuição positiva de prolina, palatinose e ácido glutâmico (Figura 4B). Na análise de PC dos tecidos radiculares foi observada quase completa sobreposição entre os tratamentos (Figura 4C).

Figura 4 - Análise de componentes principais (principal component analysis – PCA) dos metabolitos extraídos de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas à ausência ou presença de 60 mM NaCl por 14 dias.

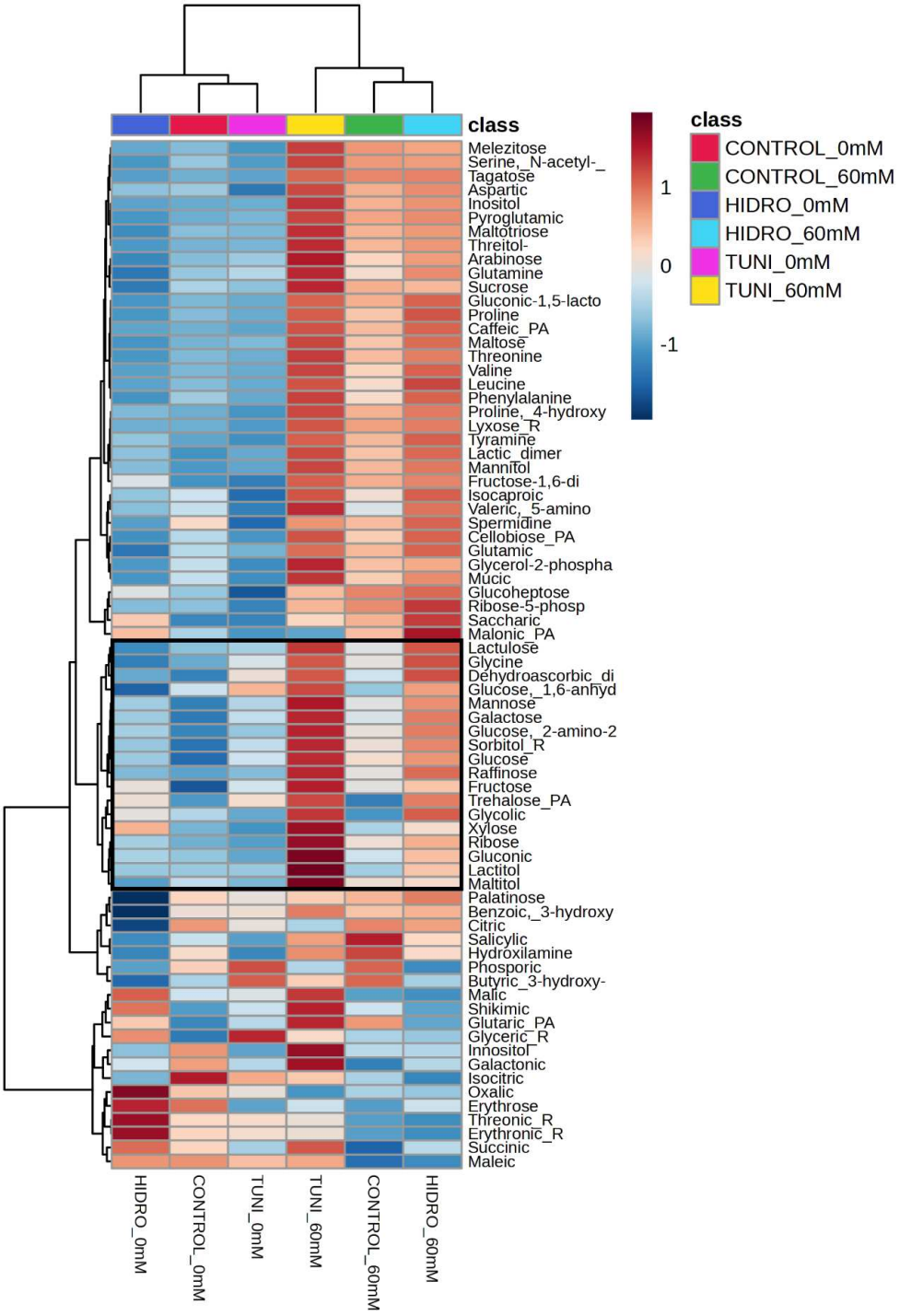


Fonte: elaborada pelo autor

Legenda: A) PCA da parte aérea. A variância de PC1 e PC2 está indicada nos eixos X e Y do gráfico, respectivamente. As regiões correspondentes as cores dos marcadores indicam o intervalo com 95% de confiança dos grupos. B) *Loading plot* relativo à parte aérea indica a contribuição individual positiva e negativa de cada metabólito para a separação dos grupos no PCA. C) PCA da raiz. D) *Loading plot* relativo à raiz. C: controle (semente sem *priming*); H: *hidropriming* (semente embebida em água por 24 h); T: tunicamicina (semente embebida em tunicamicina por 24 h). Tratamentos na ausência de 0 mM NaCl: C0, H0 e T0. Tratamentos na presença de 60 mM NaCl: C60, H60 e T60.

Adicionalmente, a análise do mapa de calor com as concentrações relativas dos metabólitos demonstra com clareza a separação em dois grupos influenciada pelos níveis de salinidade 0 e 60mM de NaCl (Figura 5), com uma maior proximidade entre os clados formados por C0 e T0, assim como C60 e H60. A região superior do mapa mostra uma divisão mais homogênea, com metabólitos que são negativamente modulados para os tratamentos na ausência de sal, representados pelas cores que se aproximam mais do azul, e metabólitos positivamente modulados na presença de sal, com cores que se aproximam mais do vermelho. Além disso, pode-se notar um grupo de metabólitos, em sua maioria carboidratos, que é modulado positivamente com maior intensidade em T60 e H60 em comparação a C60 (destacados por moldura na figura 5). Por fim, a região inferior do mapa apresenta maior variabilidade na modulação dos metabólitos por tratamento.

Figura 5 - Representação das concentrações relativas dos metabólitos em parte aérea de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas à ausência ou presença de 60 mM NaCl por 14 dias.

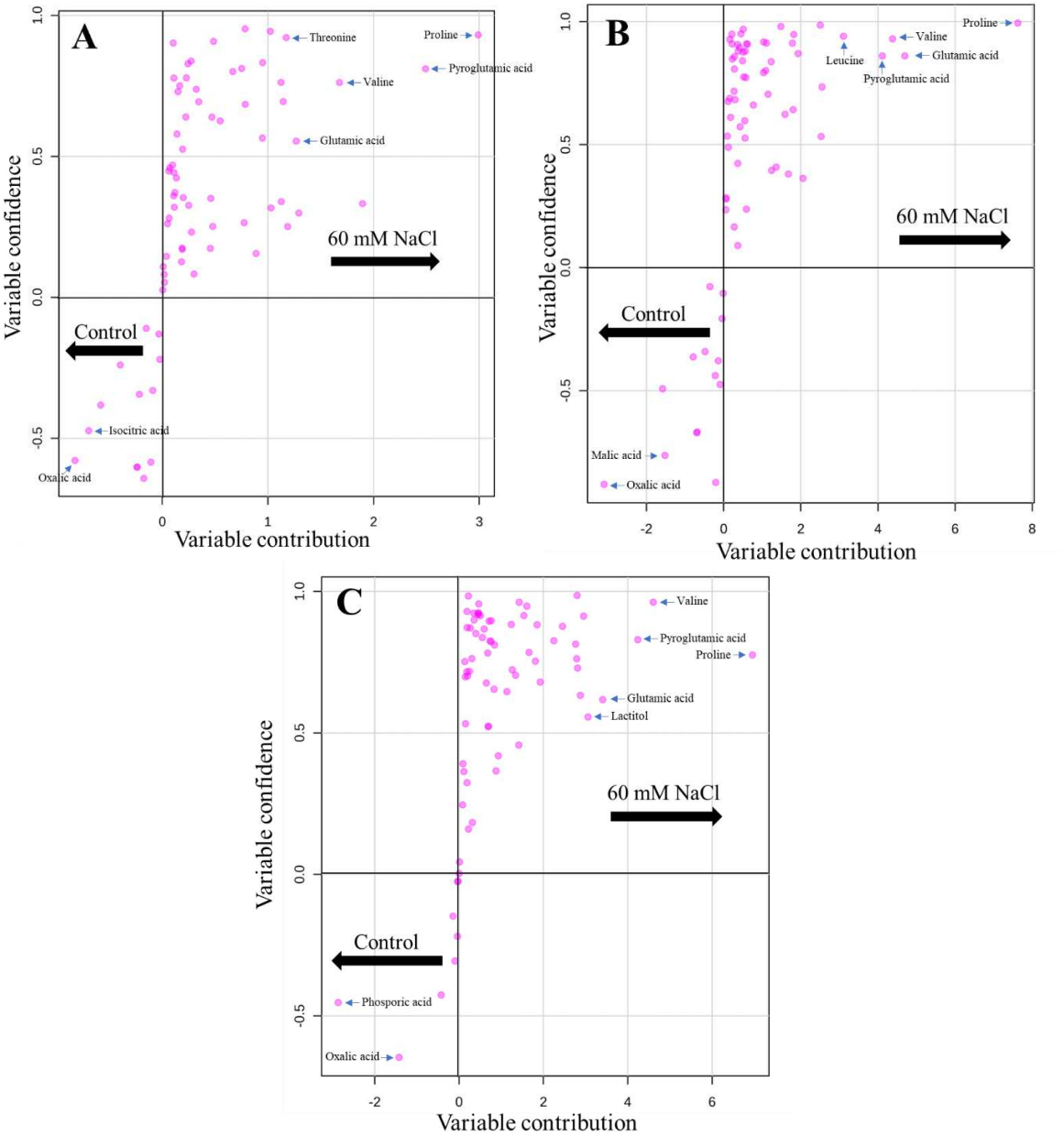


Fonte: elaborada pelo autor

Legenda: Cada coluna representa um tratamento, em ordem, da esquerda para a direita: H0, C0, T0, T60, C60 e H60. O gradiente de cores demonstra uma modulação positiva (em vermelho) ou negativa (em azul) de cada metabólito. C: controle (semente sem *priming*); H: *hidropriming* (semente embebida em água por 24 h); T: tunicamicina (semente embebida em tunicamicina por 24 h). Tratamentos na ausência de 0 mM NaCl: C0, H0 e T0. Tratamentos na presença de 60 mM NaCl: C60, H60 e T60.

A partir da análise de gráficos de dispersão (*Scatter plots – S-plots*) gerados a partir de modelos de OPLS-DA (*Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis*) da parte aérea, foram identificados metabólitos significantes nos diferentes tratamentos comparando as situações de ausência e presença de sal (Figura 6). Dessa forma, foram elencados os 5 metabólitos com maior relevância utilizando a confiança e a contribuição de cada um dentro do tratamento salino, normalizado pelo respectivo tratamento na ausência de NaCl. Para o tratamento sem *priming*, os metabólitos discriminantes na presença de NaCl foram 5 aminoácidos: prolina, valina, treonina, ácido glutâmico e ácido piroglutâmico (Figura 6A). Para as plantas tratadas com *hidropriming* e com tunicamicina observou-se um perfil similar apresentando os mesmos modelos discriminantes, sendo também relevantes a prolina, valina, ácidos glutâmico e piroglutâmico, além da leucina para o *hidropriming* e o lactitol para o *priming* com TM (Figuras 6B e 6C). Na ausência de sal, todos os tratamentos apresentaram o ácido oxálico como metabólito mais discriminante, além de ácido isocítrico, ácido málico e ácido fosfórico no controle, *hidropriming* e tunicamicina, respectivamente.

Figura 6 - Gráficos de dispersão (*Scatter plots*) baseados na análise OPLS-DA (*Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis*) de metabólitos identificados em parte aérea de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas à ausência ou presença de 60mM NaCl por 14 dias.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: três níveis de *priming*: controle (A), *hidropriming* (B) e tunicamicina (C). Metabólitos considerados discriminantes para as plantas que passaram por tratamento salino se encontram dispersos e destacados no canto superior direito do gráfico, enquanto metabólitos relevantes para as plantas na ausência de salinidade estão destacados no canto inferior esquerdo do gráfico. A: Valor de Q^2 = 0,835, p = 0,0235; Valor R^2Y = 0,997; p = 0,084; B: Valor de Q^2 = 0.924 e p = 0,0345; Valor de R^2Y = 0,992 e p = 0,0345; C: Valor de Q^2 = 0.957 e p = 0,0215; Valor de R^2Y = 0,996 e p = 0,0215. Q^2 mede a capacidade de predição do modelo, com o valor 1 indicando predição perfeita. R^2 mede a qualidade de ajuste dos dados ao modelo, com o valor 1 indicando perfeita descrição dos dados pelo modelo. Valores de *p* apresentados estimam a significância do modelo OPLS.

5 DISCUSSÃO

O efeito da salinidade em arroz é marcado por uma série de fatores já descritos na literatura, que abrangem mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas e que foram observadas neste trabalho, como a diminuição de crescimento, pigmentos fotossintéticos e acúmulo de sódio (Gadelha *et al.*, 2021; Razzaq *et al.*, 2019; Viana *et al.*, 2023). Desta forma, também foram registradas reduções significativas nos teores de massa seca e fresca de parte aérea e raiz entre os níveis de salinidade para os tratamentos controle e *hidropriming* (Figura 1). No entanto, o tratamento da semente com tunicamicina fez com que as plantas apresentassem maiores valores de MFR e MSR. Apesar de T0 apresentar um menor MSR na ausência de salinidade, esses resultados sugerem um efeito positivo da tunicamicina na aclimatação da planta ao sal, uma vez que a planta investiu energia para o desenvolvimento de raízes, provavelmente para manter a absorção de água, ao contrário do esperado em plantas de arroz que em condições de salinidade apresentam menor crescimento radicular (Huang *et al.*, 2021). De fato, foi relatado que a ativação de sensores do ER contribui para o melhor desempenho de plantas de *Arabidopsis* na resposta ao estresse salino moderado, especificamente na manutenção do meristema da raiz sob tal condição (Iwata *et al.*, 2017). Assim o RE funciona como um sensor que, sob estresse salino, ativa a expressão de chaperonas que aumentam a tolerância ao estresse, provavelmente mediado por vias de sinalização de espécies reativas de oxigênio (Liu *et al.*, 2011). Em sorgo, indutores de estresse do RE, promovem não só uma ativação do sistema antioxidante, mas também um aumento de chaperonas bem como transportadores de sódio minimizando os efeitos negativos da salinidade no crescimento em plântulas (Queiroz *et al.*, 2020). Nesse sentido, o *priming* com TM pode estar agindo como um indutor das vias de resposta ao estresse salino de modo a promover uma maior tolerância.

Além do efeito na redução de biomassa induzido pela salinidade, análogo ao que foi registrado na literatura (Hakim *et al.*, 2014a), ocorreu uma redução nos teores de clorofila *a* e totais. Apesar de terem seus níveis reduzidos em comparação ao tratamento controle, essa redução não foi significativa nos *primings* com tunicamicina e água dentro do nível de salinidade (Figuras 3A e 3C). Por outro lado, foi registrado nesse estudo uma redução no acúmulo de Na^+ em tecidos radiculares para os tratamentos com *priming* (Figura 2D). Esse aspecto contribui para uma menor suscetibilidade ao estresse iônico, uma vez que o acúmulo de íons nos tecidos da planta causa a saída de água do interior das células próximas ao estômato,

ocasionando seu fechamento, representado pela redução nos valores de condutância estomática (g*s*) (Gadelha *et al.*, 2021; Hakim *et al.*, 2014b). Esse fenômeno aliado à manutenção dos níveis de clorofila *a* e totais entre 0 e 60 mM de NaCl nos tratamentos de *hidropriming* e tunicamicina discutidos anteriormente podem representar uma atenuação dos efeitos da salinidade, garantindo uso eficiente da água, especialmente nas plantas tratadas com TM (Tabela 1).

O perfil metabólico aponta a salinidade como fator que mais diferenciou os grupos tratados, elucidado tanto pela separação do PCA quanto pela formação de dois grupos bem definidos de metabólitos no mapa de calor, evidenciando poucas diferenças dentro de cada nível de salinidade. Adicionalmente, os gráficos de dispersão originados pelo modelo de OPLS-DA apontaram para um grupo conservado de metabólitos que podem ser considerados discriminantes ou potenciais marcadores para as respostas bioquímicas da planta em cada tratamento sob condições salinas, principalmente aminoácidos como prolina, valina, ácido piroglutâmico e ácido glutâmico comuns para 60mM de NaCl. Foram encontrados maiores valores relativos de prolina, valina e ácido glutâmico no *priming* com TM e água em comparação com o controle em condições de salinidade, indicando mecanismos de ajustes mais eficientes (Figura 5).

A prolina tem diversos efeitos já registrados na literatura, atuando como molécula osmoprotetora e induzindo aumento na atividade de enzimas antioxidantes (El Moukhtari *et al.*, 2020). Há estudos que demonstram a eficácia de sua aplicação exógena em diversas espécies, inclusive em arroz sob condições de salinidade por regular positivamente a expressão de genes relacionados à produção de enzimas antioxidantes. (Nounjan; Nghia; Theerakulpisut, 2012). A valina é um aminoácido de cadeia ramificada intimamente relacionado à leucina e isoleucina, participa das vias de metabolismo do carbono e do nitrogênio (Gipson *et al.*, 2017). Além disso, proteínas com motivos valina-glutamina já foram observadas como discriminantes para indução a resistência contra estresses osmóticos, dentre eles o causado pela exposição ao sal (León; Gayubas; Castillo, 2021), sendo um metabólito cuja expressão torna-se aumentada em resposta ao estresse por seca, sal, calor e metais pesados (Anzano *et al.*, 2021). Ácido glutâmico possui papel central na produção de outros aminoácidos na forma de glutamato, além de ser precursor da molécula de clorofila (Forde; Lea, 2007), relacionando-se também à síntese de glutationa, importante molécula do sistema antioxidante vegetal, e à resposta a estresses abióticos (Qiu *et al.*, 2020). Outro metabólito comum aos tratamentos foi o ácido piroglutâmico, aminoácido não formador de proteína que participa da via de síntese da glutationa, cujos registros na literatura indicam que a aplicação exógena desse composto pode induzir mecanismos de tolerância a

estresse hídrico em alface (Jiménez-Arias *et al.*, 2019). O *priming* com TM induziu níveis maiores de ácido piroglutâmico em condições de salinidade, evidenciando o seu potencial em auxiliar a planta em lidar com o sal. Em geral, todos esses metabólitos estão intimamente relacionados à aclimatação da planta no que diz respeito à ativação de mecanismos protetores contra as condições impostas pela aplicação dos 60mM de NaCl para todos os tratamentos, com destaque para as funções de moléculas osmoticamente ativas e de ativação do sistema antioxidante.

Em contrapartida, foram identificados metabólitos discriminantes exclusivos para C60, H60 e T60 sendo eles: treonina, leucina e lactitol, respectivamente. A treonina é aminoácido central na síntese de outros aminoácidos e de diversos fitormônios que desempenham papel crucial na regulação do crescimento. Sua relevância é acentuada pela descoberta de diversos genes produtores de metabólitos atrelados à treonina cujo perfil em cada tecido vegetal ativa respostas contra estresses bióticos e abióticos (Muthuramalingam *et al.*, 2018). Leucina é componente de uma família de fatores de transcrição (bZIP – *basic leucine zippers*) relacionados a diversos genes de resposta ao estresse, inclusive em arroz (Yu *et al.*, 2020), tendo seu aumento justificado pela atuação desses fatores na aclimatação da planta a condições salinas, a exemplo da ativação da via UPR já citada nesse trabalho. Já o lactitol se trata de um açúcar álcool, ou poliol, derivado da lactose e sua atividade é pouco conhecida em plantas. De forma geral, os polióis desempenham uma função osmoprotetora, mantendo a atividade das moléculas bioativas dentro da célula e contribuindo para a manutenção de sua homeostase em condições de estresse biótico e abiótico (Noiraud; Maurousset; Lemoine, 2001).

6 CONCLUSÃO

O tratamento com NaCl impactou significativamente o crescimento das plantas de arroz. O *hidropriming* mostra-se na literatura como uma técnica promissora para induzir o aumento da taxa de germinação de sementes de arroz, bem como o vigor das plântulas para um melhor estabelecimento das plantas adultas no campo. Os resultados encontrados nesse trabalho demonstraram que o *hidropriming* induziu o aumento em todos os parâmetros de massa e, adicionalmente, redução do íon sódio na raiz, apesar de também reduzir os níveis de potássio em condições de salinidade, demonstrando sua maior eficiência para cultivo sem exposição ao sal. Paralelamente, o *priming* com tunicamicina induziu um aumento de MSR e MFR,

evidenciando o seu potencial para indução de tolerância, uma vez que reduziu também o acúmulo de sódio nas raízes e atenuou a redução dos níveis de clorofilas *a* e totais. Tais benefícios podem ser justificados pela ligeira produção diferencial de metabólitos osmoticamente ativos e que são conhecidos na literatura por atuar diretamente nas vias de mecanismos antioxidantes da planta. Diante disso, o uso da tunicamicina não induziu a aclimatação das plantas à salinidade, entretanto mostrou-se como uma molécula promissora para os estudos que relacionam estresse salino e as respostas do retículo endoplasmático pois induziu alterações que sugerem meios pelos quais a planta pode aliviar os efeitos deletérios do estresse. Portanto, sugere-se que as condições de aplicação do *priming* com TM possam ser avaliadas, como tempo de hidratação da semente, distintas maneiras de aplicação do priming e estudos em outras cultivares associadas à realização de outras análises, dentre elas a quantificação de genes relacionados ao estresse abiótico e do RE, para esclarecer os meios pelos quais o *priming* afeta as respostas fisiológicas da planta.

REFERÊNCIAS

ANZANO, A. *et al.* Plant metabolomics in biotic and abiotic stress: a critical overview. **Phytochemistry Reviews**, 9 nov. 2021.

BAO, Y.; HOWELL, S. H. The Unfolded Protein Response Supports Plant Development and Defense as well as Responses to Abiotic Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 15 mar. 2017.

BEAUGELIN, I. *et al.* Endoplasmic reticulum-mediated unfolded protein response is an integral part of singlet oxygen signalling in plants. **Plant Journal**, v. 102, n. 6, p. 1266–1280, 1 jun. 2020.

BOSCO, L. C.; GRIMM, E. L.; STRECK, N. A. Crescimento e desenvolvimento de genótipos de arroz cultivados em solo alagado e não-alagado. **Revista Ceres**, v. 56, p. 796–804, 2009.

BRITO, Y. M. A. *et al.* The Brazilian drought monitoring in a multi-annual perspective. **Environmental Monitoring and Assessment.** v. 193, n. 1, pp. 1-14. 2021

BUKARI, C. *et al.* Effect of COVID-19 on Household Food Insecurity and Poverty: Evidence from Ghana. **Social Indicators Research**, v. 159, n. 3, p. 991–1015, 1 fev. 2022.

ÇAKIR AYDEMIR, B. *et al.* Salt stress induces endoplasmic reticulum stress-responsive genes in a grapevine rootstock. **PloS one**, v. 15, n. 7, p. e0236424, 2020.

CHEN, T. *et al.* Molecular mechanisms of salinity tolerance in rice. **The Crop Journal**, v. 9, n. 3, p. 506–520, jun. 2021.

CLARK, R. B. Nutrient solution growth of sorghum and corn in mineral nutrition studies. **Journal of Plant Nutrition**, v. 5, n. 8, p. 1039–1057, jan. 1982.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 12, safra 2024/25, n. 4 quarto levantamento, janeiro 2025. Disponível em https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos

DE AZEVEDO NETO, A. D. *et al.* Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, n. 1, p. 87–94, maio 2006.

DHAGE, S. S.; ANISHETTAR, S. Seed Priming: An Approach to Enhance Weed Competitiveness and Productivity in Aerobic Rice: A Review. **Agricultural Reviews**, n. OF, 16 maio 2020.

EL MOUKHTARI, A. *et al.* How Does Proline Treatment Promote Salt Stress Tolerance During Crop Plant Development? **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 23 jul. 2020.

FAROOQ, M. *et al.* Nutrient homeostasis, metabolism of reserves, and seedling vigor as affected by seed priming in coarse rice. **Canadian Journal of Botany**, v. 84, n. 8, p. 1196–1202, ago. 2006.

FAROOQ, M.; BARSA, S. M. A.; WAHID, A. Priming of field-sown rice seed enhances germination, seedling establishment, allometry and yield. **Plant Growth Regulation**, v. 49, n. 2–3, p. 285–294, jul. 2006.

FORDE, B. G.; LEA, P. J. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2339–2358, 9 mar. 2007.

FUKAGAWA, N. K.; ZISKA, L. H. Rice: Importance for Global Nutrition. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 65, n. Supplement, p. S2–S3, 2019.

GADELHA, C. G. *et al.* Sodium uptake and transport regulation, and photosynthetic efficiency maintenance as the basis of differential salt tolerance in rice cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, v. 192, 1 dez. 2021.

GHOSH, A.; KUMAR, A.; BISWAS, G. Exponential population growth and global food security: challenges and alternatives. **Elsevier eBooks**, p. 1–20, 1 jan. 2024.

GIPSON, A. B. *et al.* Disruptions in valine degradation affect seed development and germination in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 90, n. 6, p. 1029–1039, 1 jun. 2017.

HAKIM, M. A. *et al.* Biochemical and anatomical changes and yield reduction in rice (Oryza sativa L.) under varied salinity regimes. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014a.

HAKIM, M. A. *et al.* The effect of salinity on growth, ion accumulation and yield of rice varieties. **JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 24, n.3, p. 874-885, 30 jun. 2014, 2014b.

HARRIS, D.; TRIPATHI, R. S.; JOSHI, A. On-farm seed priming to improve crop establishment and yield in dry direct-seeded rice. **Direct seeding: Research Strategies and Opportunities**, p. 231-240, 1 jan. 2002, Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284053321>.

HOWELL, S. H. Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 477–499, 29 abr. 2013.

HUANG, Y. *et al.* Salt stress promotes abscisic acid accumulation to affect cell proliferation and expansion of primary roots in rice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, 1 out. 2021.

ISAYENKOV, S. V.; MAATHUIS, F. J. M. Plant salinity stress: many unanswered questions remain. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–11, 15 fev. 2019.

IWATA, Y. *et al.* Inositol-requiring enzyme 1 affects meristematic division in roots under moderate salt stress in Arabidopsis. **Plant Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 159–163, 2017.

JIMÉNEZ-ARIAS, D. *et al.* Lettuce plants treated with L-pyroglutamic acid increase yield under water deficit stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 158, p. 215–222, 1 fev. 2019.

KAUR, S.; GUPTA, A. K.; KAUR, N. Effect of osmo-and hydropriming of chickpea seeds on seedling growth and carbohydrate metabolism under water deficit stress. **Plant growth regulation**, v. 37, p. 17-22, mai. 2002.

KO, D. K.; BRANDIZZI, F. Dynamics of ER stress-induced gene regulation in plants. **Nature Reviews Genetics**, v. 25, n. 7, p. 513–525, 18 mar. 2024.

JOSÉ LEÓN; GAYUBAS, B.; CASTILLO, M.C. Valine-Glutamine Proteins in Plant Responses to Oxygen and Nitric Oxide. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 25 jan. 2021.

LISEC, J. *et al.* Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 387–396, jun. 2006.

LIU, C. *et al.* Salt tolerance in rice: Physiological responses and molecular mechanisms. **The Crop Journal**, v. 10, n. 1, p. 13–25, 1 de fev. 2022.

LIU, L. *et al.* The endoplasmic reticulum-associated degradation is necessary for plant salt tolerance. **Cell Research**, v. 21, n. 6, p. 957–969, jun. 2011.

MALAVOLTA, E. e VITTI, G C e OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas; princípios e aplicações. Piracicaba: Potafos. Acesso em: 18 fev. 2025, 1989

MUTHURAMALINGAM, P. *et al.* Global analysis of threonine metabolism genes unravel key players in rice to improve the abiotic stress tolerance. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

NOIRAUD, N.; MAUROUSSET, L.; LEMOINE, R. Transport of polyols in higher plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 717–728, set. 2001

NOUNJAN, N.; NGHIA, P. T.; THEERAKULPISUT, P. Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 6, p. 596–604, 15 abr. 2012.

OHTA, M.; TAKAIWA, F. OsERdj7 is an ER-resident J-protein involved in ER quality control in rice endosperm. **Journal of Plant Physiology**, v. 245, 1 fev. 2020.

PINTÓ-MARIJUAN, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 12, p. 660–666, dez. 2013.

QIU, X.-M. *et al.* Signaling Role of Glutamate in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 24 jan. 2020.

QUEIROZ, C. S. DE *et al.* Combined NaCl and DTT diminish harmful ER-stress effects in the sorghum seedlings CSF 20 variety. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 147, p. 223–234, 1 fev. 2020.

RADANIELSON, A. M. *et al.* Describing the physiological responses of different rice genotypes to salt stress using sigmoid and piecewise linear functions. **Field Crops Research**, v. 220, p. 46–56, 1 maio 2018.

RANGEL, P. H. N., Pereira, J. A., BARROS, L. C. G., SOARES, D., CUTRIM, V. D. A., FONSECA, J., MENDONÇA J, SANTIAGO C. BRS Alvorada e SCSBRS Tio Taka: novas cultivares de arroz de várzea para a região Nordeste do Brasil. Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado Técnico, 119, nov. 2006.

RAZZAQ, A. *et al.* Salt stress induces physiochemical alterations in rice grain composition and quality. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 1, p. 14–20, 23 dez. 2019.

RHAMAN, M. S. *et al.* Seed Priming Methods: Application in Field Crops and Future Perspectives. **Asian Journal of Research in Crop Science**, p. 8–19, 25 maio 2020.

ROQUE, I. A. *et al.* Biomass, gas exchange and production of cherry tomato cultivated under saline water and nitrogen fertilization. **Revista Caatinga**, v. 35, n. 3, p. 686–696, 12 jul. 2022.

SAITO, K. *et al.* Progress in varietal improvement for increasing upland rice productivity in the tropics. **Plant Production Science**, v. 21, n. 3, p. 145–158, 16 abr. 2018.

UNICEF. The state of food security and nutrition in the world 2021.

VIANA, J. DA S. *et al.* Differential modulation of metabolites induced by salt stress in rice plants. **South African Journal of Botany**, v. 162, p. 245–258, 1 nov. 2023.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, nov. 2003.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994.

YU, Y. *et al.* Regulation Mechanisms of Plant Basic Leucine Zippers to Various Abiotic Stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 20 ago. 2020.

ZAMANN, M.; SHAHIDD, S. A.; HENG, L. Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques. **Springer Nature**, p. 164, 2018.